



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

“El RNA mensajero del gen CDKN3 como biomarcador de sobrevida y potencial blanco terapéutico en las pacientes con cáncer de cérvix”

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
Q. B. P. EIRA VALERIA BARRÓN PALMA**

**TUTOR PRINCIPAL:  
DR. JAIME BERUMEN CAMPOS, FACULTAD DE MEDICINA**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. SUSANA KOFMAN EPSTEIN, FACULTAD DE MEDICINA  
DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA  
CELULAR**

**MÉXICO, D. F., Noviembre del 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

A la Facultad de Medicina UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca estudiantil otorgada para la realización de este proyecto.

A los proyectos de CONACyT 8135/A1 y 24341 y UNAM SDI.PTID.05.2 por el sustento para este proyecto.

A mi tutor principal, el Doctor Jaime Berumen Campos por la dirección del proyecto de investigación, las enseñanzas, guía y apoyo durante mi formación académica.

A las Doctoras Susana Kofman y Alicia González Manjarrez, por formar parte del comité tutorial, por sus observaciones y críticas durante el desarrollo del proyecto y por su participación en mi formación académica.

Al Doctor Juan Carlos Gomora y a la Doctora Martha Pérez quienes participaron activamente en el proyecto.

## ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
1. Introducción	3
1.1 Marco Teórico	3
1.2 Antecedentes	5
2. Justificación	6
3. Hipótesis	7
4. Objetivos	7
5. Materiales y métodos	8
5.1 Declaración de Ética.	8
5.2 Muestras y diseño experimental.	8
5.3 Purificación de DNA y RNA.	10
5.4 Detección y tipificación del VPH.	12
5.5 Identificación del nivel de expresión del gen CDKN3 mediante retro transcripción cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).	12
5.6 Identificación de variantes de mRNA del gen CDKN3 mediante RT-PCR y secuenciación de DNA.	14
5.7 Análisis de sobrevida de las pacientes con cáncer.	15
5.8 Líneas celulares y cultivo de células.	16
5.9 Transfecciones con siRNAs en las líneas celulares CaLo, CaSki, HeLa y SiHa.	17
5.10 Ensayos de inmunofluorescencia.	17
5.11 Inmunohistoquímica.	18
5.12 Western blot.	19
5.13 Ensayos de proliferación.	20
5.14 Ensayos de invasión y migración.	21
5.15 Análisis estadístico.	22
6 Resultados	23
6.1 Expresión del gen CDKN3 en pacientes con cáncer del cuello uterino.	23
6.2 Asociación entre la expresión génica de <i>CDKN3</i> , el estadio clínico y el tipo viral con la sobrevida de las pacientes con CC.	28
6.3 Efecto de la inhibición de la expresión génica de <i>CDKN3</i> en la proliferación, la migración y la invasión de líneas celulares derivadas de CC.	32
6.4 Análisis de las variantes de mRNA y proteína de gen CDKN3.	40
6.5 Localización celular de la proteína CDKN3 en líneas celulares, muestras de CC y muestras normales de cérvix, mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.	45
7. Discusión	48
8. Conclusiones	54
9. Perspectivas	55

10. Referencias	56
11. Publicación derivada del proyecto de tesis doctoral	66
11.1 <i>CDKN3</i> mRNA as a biomarker for survival and therapeutic target in cervical cancer.	66
12. Anexos. Publicaciones	
12.1 Amplified genes may be overexpressed, unchanged, or downregulated in cervical cancer cell lines.	67
12.2 Impact of gene dosage on gene expression, biological processes and survival in cervical cancer: a genome-wide follow-up study.	68

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de pacientes de acuerdo al tipo histológico, estadio clínico y tipo viral.	10
Tabla 2. Lista de oligos utilizados para la identificación de las variantes del gen <i>CDKN3</i> .	14
Tabla 3. Datos clínicos y "fold Change" del nivel de expresión del gen <i>CDKN3</i> en 134 pacientes con CC.	23
Tabla 4. Análisis univariado y multivariado de la sobrevida de las pacientes con CC incluyendo la expresión de <i>CDKN3</i> , el estadio clínico y el tipo de VPH.	31
Tabla 5. Disminución de la cantidad de mRNA de <i>CDKN3</i> en células transfectadas con siRNAs específicos contra <i>CDKN3</i> .	33
Tabla 6. Incremento en el tiempo de duplicación en las células transfectadas con siRNAs específicos contra <i>CDKN3</i> .	38
Tabla 7. Frecuencia de las diferentes variantes de mRNA del gen <i>CDKN3</i> .	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión del gen <i>CDKN3</i> en el epitelio cervical normal y en muestras de cáncer de cuello uterino.	27
Figura 2. Análisis de supervivencia de las mujeres con cáncer de cuello uterino de acuerdo a la estadificación de la FIGO, el tipo de VPH, y la expresión de <i>CDKN3</i> .	30
Figura 3. Detección de la proteína <i>CDKN3</i> por inmunofluorescencia y Western blot en líneas celulares derivadas de CC transfectadas con siRNAs específicos contra <i>CDKN3</i> o siRNAs control.	34
Figura 4. Especificidad del anticuerpo secundario.	35
Figura 5. Curvas de proliferación celular de líneas celulares derivadas de CC transfectadas con siRNAs específicos contra <i>CDKN3</i> o siRNAs control.	37
Figura 6. Migración e invasión celular, de líneas celulares derivadas de CC transfectadas con siRNAs específicos contra <i>CDKN3</i> o siRNAs control.	39
Figura 7. Análisis de los transcritos de <i>CDKN3</i> .	43
Figura 8. Análisis de secuenciación de transcritos de <i>CDKN3</i> .	44
Figura 9. Análisis histológico de la expresión de la proteína <i>CDKN3</i> .	47

## ABREVIATURAS

- **CC:** Cáncer de cérvix
- **mRNA:** RNA mensajero
- **VPH:** Virus del papiloma humano
- **CDKN3:** Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 3 “ Cyclin-dependent kinase inhibitor 3”
- **siRNA:** RNAs interferentes cortos “Short interfering RNA”
- **FIGO:** Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique
- **GAPDH:** Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa “Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”
- **RT-qPCR:** Retro transcription – PCR cuantitativa
- **FC:** Razón de cambio “Fold change”
- **ROC:** Receiver Operator Characteristic
- **MW:** Prueba paramétrica de Mann–Whitney
- **HR:** Razón de riesgo “Hazard ratio”

## RESUMEN

El gen “Inhibidor 3 de cinasa dependiente de ciclina (*CDKN3*)” está implicado en la mitosis y se encuentra sobre expresado en cáncer de cérvix (CC). En este proyecto Investigamos si el RNA mensajero (mRNA) del gen *CDKN3* puede funcionar como biomarcador de sobrevida y potencial blanco terapéutico para las pacientes con CC.

El mRNA del gen *CDKN3* se midió en 134 muestras de tumores con CC y 25 controles epiteliales sanos por medio de PCR cuantitativa. Para evaluar si la elevada expresión del gen *CDKN3* está relacionada con la sobrevida se realizó un estudio de sobrevida a 5 años en 121 de estos pacientes con CC. Además, se utilizaron RNAs interferentes cortos (Short interfering RNA “siRNAs”) específicos contra *CDKN3* para investigar si este gen está implicado en la proliferación, la migración y la invasión en líneas celulares derivadas de CC (SiHa, CaSki, HeLa).

El mRNA de *CDKN3* se encontró en promedio 6.4 veces más alto en los tumores de CC que en los controles sanos ( $P = 8 \times 10^{-6}$ , Mann-Whitney). En total, 68.2% de las pacientes con CC que sobre expresan el gen *CDKN3* ( $FC \geq 17$  veces) murieron durante los dos años posteriores al diagnóstico, independientemente del estadio clínico y el tipo de VPH presente (HR = 5.1, IC del 95%: 2.6 - 10,  $P = 3.0 \times 10^{-6}$ , Modelo de riesgos proporcionales de Cox). En contraste, sólo el 19.2% de las pacientes con baja expresión de *CDKN3* murió en el mismo período. En la inhibición *in vitro* del gen *CDKN3*, se observó una disminución de la proliferación celular en promedio de 67%, aunque no se observó ningún efecto sobre la migración y la invasión celular.

El mRNA del gen *CDKN3* puede ser un buen biomarcador de sobrevida y un potencial blanco terapéutico en CC.

# **EL RNA MENSAJERO DEL GEN *CDKN3* COMO BIOMARCADOR DE SOBREVIVENCIA Y POTENCIAL BLANCO TERAPÉUTICO EN LAS PACIENTES CON CÁNCER DE CÉRVIX.**

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 MARCO TEÓRICO**

El cáncer cervical (CC) es el cuarto tipo de cáncer más común en mujeres en todo el mundo [1]. Cada año se reportan 530.000 nuevos casos de CC y 275.000 muertes por CC en todo el mundo, haciendo que la relación mortalidad-incidencia sea de aproximadamente el 50% [2, 3]. El virus del papiloma humano (VPH) es el principal factor causal para el desarrollo del cáncer cervical (CC) y se encuentra en casi el 100% de estos tumores, a nivel mundial, el tipo viral más frecuente es el VPH16 encontrado aproximadamente en el 50% de los casos, seguido del VPH18 (15%) [4, 5]. Actualmente, las vacunas que se encuentran en el mercado, principalmente previenen la infección por los tipos oncogénicos de VPH 16 y 18, que están asociados con un 65-70% de los CC en todo el mundo [6, 7]. Estas vacunas son muy eficaces para la prevención de la infección y el desarrollo de neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado, sin embargo, las mujeres vacunadas todavía deben someterse a vigilancia para facilitar la detección temprana de CC ya que estas vacunas sólo protegen contra ciertos tipos de virus, y la duración de la protección inmune contra el virus aún se desconoce [8, 9]. En muchos países, las vacunas preventivas para el VPH 16 y 18 se han incorporado en los programas nacionales de vacunación para niñas de 9 a 12 años de edad [10, 11]. Pese a la aplicación de la vacuna, la historia natural de la enfermedad indica que

el mayor impacto en la disminución de incidencia de cáncer de cuello uterino no será visto hasta dentro de algunas décadas. [10, 12]. Además, de acuerdo a la distribución de los tipos de VPH 16 y 18 entre los diversos grupos de edad, aproximadamente la mitad de las mujeres mayores de 50 años con CC no están protegidas por estas vacunas preventivas [13]. Por lo tanto, es necesario mejorar los procedimientos para la detección oportuna y el tratamiento de CC.

Actualmente el CC se trata con cirugía, quimioterapia, radioterapia, o combinaciones de estas terapias, dependiendo del estadio clínico de la enfermedad. El éxito de estas terapias convencionales y la supervivencia de las pacientes disminuye a medida que progresa la enfermedad [14]. A diferencia de otros tipos de cáncer, para los cuales se han desarrollado terapias dirigidas [15], no existen terapias dirigidas específicas contra el CC. La mayoría de los fármacos contra el cáncer se dirigen hacia proteínas mutadas, especialmente proteínas cinasas [16]. Sin embargo, algunos fármacos específicos actúan sobre las proteínas normales que se sobre expresan en los tumores, como es el caso de HER2/neu en el cáncer de mama [17, 18]. El primer paso en el desarrollo de un fármaco dirigido específico para CC es la identificación de dianas moleculares que están presentes en CC y ausentes en el tejido sano, y que sean esenciales para el crecimiento del tumor. La inhibición de la mitosis es una estrategia conocida para combatir el cáncer [19, 20]. Los fármacos que inhiben el proceso de la división celular son generalmente eficaces como agentes anticancerígenos. Los taxanos y vinca alcaloides, que inhiben la formación del huso mitótico, son ejemplos bien conocidos de estos fármacos. Sin embargo, su eficacia es limitada ya que también afectan la red de microtúbulos de células que no se dividen, llegando a afectar las funciones endoteliales y produciendo efectos neurotóxicos.

## 1.2 ANTECEDENTES

En un estudio previo, se demostró que el gen "inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 3" (*CDKN3*) se encuentra sobre expresado en los cánceres cervicales en comparación con el epitelio cervical normal. Además, en una muestra pequeña de pacientes con CC positivos para VPH16 se demostró que el alto nivel de expresión de *CDKN3* está asociado con una menor sobrevida de las paciente [21]. Estos datos sugieren que *CDKN3* está involucrado en la progresión tumoral, al menos en los CC positivos para VPH16. Sin embargo, no se ha demostrado que la inhibición de *CDKN3*, disminuya o inhiba el crecimiento tumoral de todos los CC, independientemente del tipo viral.

*CDKN3* es un gen localizado en el cromosoma 14q22 [22] que codifica para una proteína de la familia de fosfatasas duales específicas, juega un papel importante en la división celular [23]. Se conoce que la proteína *CDKN3* puede defosforilar específicamente e inactivar a *CDK2*, mediante la defosforilación de Thr160 y que también interactúa con *CDK1* (*Cdc2*) controlando la progresión del ciclo celular. Se ha reportado la asociación de éste gen en diversos tipos de cáncer, y se han identificado transcritos variantes de RNA mensajero generados por "splicing" alternativo, que producen proteínas truncas cuyos sitios de unión e interacción con las proteínas blanco como *CDK1* y *CDK2* pudieran estar alterados, ocasionando cambios en la funcionalidad de *CDKN3* [24 - 26].

## 2. JUSTIFICACIÓN

El Cáncer de Cérvix, hoy en día sigue siendo uno de los principales problemas de salud en países sub desarrollados, manteniéndose como la cuarta causa de cáncer en mujeres. Se han desarrollado dos vacunas profilácticas, una divalente (contra VPH 16 y VPH18) y otra cuadrivalente (VPH6, VPH11, VPH16 y VPH18), que se han implementado en el cuadro de vacunación en niñas de 9-12 años de edad; sin embargo, considerando que el pico máximo de incidencia del CC se encuentra en mujeres de 45-50 años de edad, el efecto real de estas vacunas no podrá evaluarse, sino hasta dentro de algunos años. Por lo tanto es necesario el desarrollo de métodos de diagnóstico y terapias que ayuden al diagnóstico oportuno y que brinden tratamientos específicos para las pacientes con CC.

Para demostrar de manera concluyente si la sobreexpresión de *CDKN3* se asocia con una disminución de la sobrevida de las pacientes con CC, se debe realizar un estudio que incluya un mayor número de pacientes que sean positivas a VPH16 y a otros tipos virales. Además, para investigar si *CDKN3* está involucrado en el proceso de carcinogénesis y se pueda proponer como blanco terapéutico, se deberá analizar el efecto de su inhibición, en procesos como proliferación celular, migración e invasión en modelos de líneas celulares.

### 3. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que el gen *CDKN3* se encuentra sobre expresado en muestras de cáncer de cuello uterino positivas para el virus VPH16, por lo tanto, se espera que la sobre expresión del gen se encuentre en muestras de cáncer de cuello uterino positivas para otros tipos virales y que la sobre expresión esté asociada con una menor sobrevida de las pacientes. Considerando que la sobre expresión del gen es un evento común en cáncer de cuello uterino, deberá tener un efecto directo en procesos como proliferación, invasión y metástasis.

### 4. OBJETIVOS

- 1) Investigar si el gen *CDKN3* se encuentra sobre expresado en casos de pacientes con CC independientemente del tipo viral.
- 2) Investigar si existen variantes del RNA mensajero (mRNA) del gen *CDKN3* que puedan estar expresándose en los casos de CC y/o controles sanos.
- 3) Investigar si la sobre expresión del gen *CDKN3* está asociada a un menor tiempo de sobrevida de las pacientes con CC positivas para cualquier tipo de VPH, incluyendo los tipos 16, 18, 31, 45 y otros.
- 4) Investigar si la inhibición del mRNA del gen *CDKN3*, disminuye la proliferación, migración e invasión de células neoplásicas derivadas de CC positivas para el VPH16 (SiHa, CaSki) y el VPH18 (HeLa).

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Declaración de Ética**

El protocolo del estudio fue aprobado por los Comités Científicos y Éticos del Hospital General de México (autorización: DIC/03/311/04/051) y se realizó de acuerdo con los principios éticos descritos en la Declaración de Helsinki de 1964. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes antes de su inclusión en el estudio.

### **5.2 Selección de muestras y diseño experimental**

Se incluyeron 134 pacientes con cáncer del cuello uterino (CC) diagnosticados en el Departamento de Oncología y 25 mujeres con epitelio cervical normal evaluados en el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital General de México. Las muestras fueron seleccionadas de un total de 462 pacientes con CC que se reclutaron de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: diagnóstico clínico de CC invasor, sin tratamiento previo, nacidas y residentes en México, con una ascendencia mexicana de dos generaciones. Las pacientes que cumplieron los criterios de inclusión fueron seleccionadas posteriormente durante los períodos comprendidos entre noviembre del 2003 a abril del 2005 y enero del 2006 hasta julio de 2007, y representan el 80% de las pacientes con diagnóstico de CC durante estos períodos. Los criterios de selección para las muestras de CC incluidas en este trabajo se basaron en la disponibilidad de una biopsia fresca del tumor para extracción de RNA, con más de 70% de células tumorales en el análisis morfológico y el tipo viral. De acuerdo a la calidad del RNA, la mayoría de los casos (88%) fueron seleccionados durante el segundo período de reclutamiento. Los casos de CC incluyeron 90 muestras positivas para VPH16 (42 de ellas previamente reportadas, aunque en este

estudio se actualizó el tiempo de seguimiento para el análisis de sobrevida, y 48 muestras nuevas), y 44 positivas para otros tipos de VPH: 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 53, 58, 59 y 68. Las muestras de mujeres incluidas en este estudio, fueron comparables a aquellas que se excluyeron por razones de edad (media = 50 años), / etnia, histología y estadio clínico. La frecuencia de los tipos de VPH en este subgrupo no es comparable a la frecuencia en la totalidad de la muestra [13], ya que se seleccionó una mayor proporción de tumores positivos para VPH16. Los tumores de las pacientes se clasificaron de acuerdo a la última revisión del protocolo internacional para el cáncer ginecológico (Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique; FIGO) [27], y de acuerdo al tipo histológico y tipo viral (Tabla 1). La edad promedio de las pacientes con CC fue de 51.6 años (23-89 años). Se tomaron una o dos biopsias de los tumores durante el examen colposcópico, una de las biopsias se dividió en 2 partes iguales, 1 parte se fijó en formol amortiguado para el análisis morfológico y la otra parte, junto con la segunda biopsia, fueron congeladas en hielo seco y almacenadas a -80°C hasta su análisis. Las muestras de controles cervicales se obtuvieron de pacientes sometidas a histerectomía por miomatosis. La etnia y la edad media (49 años) de estas pacientes fueron similar a la de las pacientes con CC. Estas pacientes fueron diagnosticadas previamente como sanas, presentando cuello uterino normal mediante citología y colposcopia. Inmediatamente después de recibir un fragmento del cuello uterino de la sala de operaciones, los epitelios exo cervical y endo cervical se disectaron utilizando un microscopio estereoscópico para evitar tomar células del estroma. Los tejidos se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80 °C hasta su uso.

**Tabla 1. Clasificación de pacientes de acuerdo al tipo histológico, estadio clínico y tipo viral.**

Tipo histológico	n
Adenocarcinoma	20
Carcinoma de células escamosas	111
Carcinoma adenoescamoso	2
Indiferenciado	1
Estadio clínico	n
IA1	1
IB1	39
IB2	31
IIA	7
IIB	38
IIIB	13
IV	5
Tipo viral	N
VPH16	90
Otros tipos virales <sup>a</sup>	44

a. Positivos para VPH 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 53, 58, 59 y 68.

### 5.3 Purificación de DNA y RNA

El DNA se purificó a partir de raspados cervicales, especímenes de biopsia y líneas celulares utilizando el sistema PureLink genomic DNA (Invitrogen, CA.) y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. Las extracciones se realizaron de acuerdo al protocolo del proveedor. En el caso de tejidos, se adicionaron 180µL de “Genomic Digestión Buffer” y 20µL de Proteinasa K sobre el tejido y se incubó a 55°C durante cuatro horas. En el caso de los cultivos de células, se cosecharon las células, se retiró el medio de cultivo, se colectaron en tubos de 1.5mL y se lavó en PBS 1x (Buffer salino de fosfatos), se centrifugan a 5000 rpm 3 minutos, se retira el PBS y el pellet se re-suspende en 200µL de PBS nuevo; en ambos casos, después del procedimiento previo, se adicionan 200µL de “Genomic Lysis/Binding Buffer”, 20µL de proteinasa K (solo en el caso de las células) y 20µL de RNAsa, se incuban durante 15 minutos a 55°C en agitación constante, posteriormente se

coloca esta solución en la columna de separación y se centrifuga a 10,000 rpm durante 1 minuto, se descarta la solución filtrada y se adiciona a la columna 500µL de “buffer de lavado”, se centrifuga a 10,000 rpm 1 minuto, se repite este paso, y finalmente se eluye el DNA en 40µL de “buffer de elución” centrifugando a 13,200 rpm durante 3 minutos. La calidad del DNA en todos los casos se corroboró por electroforesis en geles de agarosa, se cuantifica utilizando espectrofotómetro a A260 y se evalúa la calidad del DNA por la relación A260/A280 mayor de 1.9.

El RNA se purificó a partir de raspados cervicales, especímenes de biopsia y líneas celulares utilizando el reactivo de Trizol (Invitrogen, CA.), de acuerdo con el protocolo del fabricante. En un mortero homogenizar la biopsia con hielo seco, adicionar 1mL de trizol y volver a homogenizar, transferir el contenido del mortero a un tubo de 1.5 mL y homogenizar pasando diez veces a través de una jeringa con aguja de 20G. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugar a 12,000 x g 10 minutos a 4°C, recolectar el sobrenadante en tubos de 1.5mL, adicionar 200µL de cloroformo, agitar vigorosamente por 15 segundos. Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente, mezclando cada minuto. Centrifugar a 12,000 x g 15 minutos a 4°C, recolectar el sobrenadante en otro tubo de 1.5mL, adicionar a este sobrenadante 500µL de isopropanol absoluto y agitar por inversión, incubar las muestras a -20°C por 10 min. Al finalizar el tiempo de incubación, centrifugar a 12,000 x g 10 min a 4°C, decantar el sobrenadante y lavar el pellet con 1mL de etanol al 80%, centrifugar a 7,500 x g 5 min a 4°C, realizar dos lavados más con etanol al 80%. Secar el RNA a temperatura ambiente. Finalmente re-suspender el RNA en 50µL de Agua-DEPC (Dietilpolicarbonato), almacenar a -80°C hasta su uso. La calidad del RNA se confirmó por electroforesis en geles de agarosa, demostrándose por la presencia de las bandas de RNA ribosomal intactas, la banda 28s dos veces más intensa que la banda 18s.

#### **5.4 Detección y tipificación del VPH**

La detección se realizó por PCR utilizando oligos universales localizados en el gen L1 de los VPHs, MY09/MY11, GP5+/6+ y L1C1 descrito previamente [28 - 30]. El gen  $\beta$ -globina (HBB) se utilizó como control interno, para evaluar la calidad del DNA. Los tipos de VPH fueron identificados por secuenciación de las bandas amplificadas en las muestras positivas, utilizando un método de secuenciación fluorescente (BigDye Terminator Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA). La secuenciación se generó corriendo los fragmentos marcados de DNA en electroforesis capilar utilizando el analizador genético ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems). Las secuencias de las muestras positivas se analizaron con el programa de similitud de secuencias FASTA, el cual calcula el porcentaje de similitud de las secuencias exploradas con las secuencias reportadas de los VPHs [13, 31]. El porcentaje de identidad promedio de estas secuencias para los tipos de VPH fue del 98,7% (91-100%).

#### **5.5 Evaluación del nivel de expresión del gen *CDKN3* mediante retro transcripción cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)**

La transcripción inversa del RNA total se realizó utilizando el sistema High-Capacity cDNA (Applied Biosystems) en un volumen total de 20  $\mu$ L. La mezcla incluye 2  $\mu$ g de RNA, 2  $\mu$ L del "buffer" RT 10x, 0.8  $\mu$ L de dNTPs 100 mM, 2  $\mu$ L de cebadores aleatorios 10x, 1  $\mu$ L de enzima MultiScribe<sup>TM</sup> transcriptasa inversa (5 U/ $\mu$ L) y 1  $\mu$ L de inhibidor de RNasa (2 U/ $\mu$ L). Incubar las reacciones a 37 °C durante 120 min, y posteriormente almacenar a -20 °C hasta su uso. La expresión del gen *CDKN3* se midió en 134 muestras de CC y 25 controles epiteliales sanos, por medio de la técnica de qRT-PCR. Se utilizó el gen *GAPDH* como control interno en todos los casos. Se utilizaron ensayos con sondas TaqMan para los

genes *CDKN3* y *GAPDH* (Hs00193192\_m1 y Hs02758991\_g1 respectivamente; Applied Biosystems). Los experimentos se realizaron por triplicado en un volumen final de 20  $\mu$ L, incluyendo 200 ng de DNA complementario (cDNA), 10  $\mu$ L de la mezcla "TaqMan Universal PCR Master" 2x (Applied Biosystems), 1  $\mu$ L de la sonda de TaqMan 20x y 7  $\mu$ L de agua libre de RNasa. El programa de ciclos sucesivos se llevó a cabo en el Rotor Gene (Corbett Research, Sydney, Australia), de la siguiente manera: un ciclo de activación a 50 °C durante 2 min, seguido de 95 °C durante 10 min, luego 40 ciclos sucesivos con un periodo de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y un periodo de hibridación/extensión a 60 °C durante 1 min. La medición de la expresión génica se realizó mediante curvas de calibración, construidas a partir de una mezcla de cDNAs de tumores realizando diluciones seriadas con un factor de dilución descendente de 10; los puntos de la curva van desde 500 a 0.05 ng/  $\mu$ L. Las curvas para cada gen se probaron en tres experimentos diferentes, se corrieron por triplicado y los promedios de los coeficientes de correlación (r) fueron mayores que 0.98. La expresión de *CDKN3* se normalizó en cada muestra de tumor y control con la intensidad del gen utilizado como referencia interna (*GAPDH*) utilizando un método descrito previamente [21]. Los valores de intensidad normalizados se midieron en ng/mL. Se llevó a cabo una prueba de normalidad (Shapiro Wilk) para comprobar que los datos de expresión génica seguían una distribución normal. El "fold change" (FC) de la expresión de *CDKN3* se calculó dividiendo la mediana de la intensidad normalizada del tumor entre la mediana de la intensidad normalizada de todos los controles. El valor de significancia estadística entre las medianas de los casos y controles fue calculado con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (MW).

## 5.6 Identificación de variantes de mRNA del gen *CDKN3* mediante RT-PCR y secuenciación de DNA

Las variantes del RNA del gen *CDKN3* se identificaron en el DNA complementario de 45 tumores, 22 epitelios cervicales normales, y en tres líneas celulares (CaSki, Hela, y SiHa) utilizando RT-PCR. Para la RT-PCR se utilizaron oligos reportados anteriormente [24] y oligos diseñados específicamente para variantes ya reportadas [32] (Tabla 2). Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se secuenciaron usando el método fluorescente de ciclo de secuenciación (Reacción Kit BigDye Terminator Ready; Applied Biosystems). La secuenciación se generó corriendo los fragmentos marcados de DNA en electroforesis capilar utilizando el analizador genético ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems). Las secuencias se analizaron con la herramienta de similitud de secuencias FASTA [13, 31], con el software SeqScape (Applied Biosystems), y con el software de alineación de secuencias ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

**Tabla 2. Lista de oligos utilizados para la identificación de las variantes del gen *CDKN3*.**

Oligo ID	Secuencia 5' – 3'
F1*	ACT GGT CTC GAC GTG GGG CG
R1*	GTT GAT AAC ACT GGT TTC
F2*	CCA GCG ATG AAG CCG CCC AG
R5	TGG TTT CAT TTC AAT ACA AAT TAT GCT
R9f	GAC AAG CAG CTA TGT ATT AAG GTT T
F5-e	TGA AGC CGC CCA GTT CAA TAC AA
F6-i	GAT GAA GCC GGC TAT CTT TGT CA
F4	GGA ACA ATT ACA CCA GTC TTC

\* Oligos previamente reportados.

## **5.7 Análisis de sobrevida de las pacientes con cáncer**

En base al estadio clínico FIGO y las recomendaciones de la Sociedad Americana de Cáncer, cada pacientes recibió el tratamiento más apropiado para su caso (Tabla 3, sección de resultados). Una vez completado el tratamiento, cada paciente fue evaluada clínicamente cada 3 o 6 meses por un médico oncólogo. Los datos clínicos del estudio de seguimiento se obtuvieron a partir de la historia clínica de cada paciente. Además, una trabajadora social realizó llamadas telefónicas y visitas domiciliarias a las pacientes cada 6 meses durante el estudio. Los casos registrados como vivas, fueron seguidos exitosamente por más de 2 años, en promedio durante 63 meses, después del tratamiento inicial. El número de meses de seguimiento de las pacientes se indica en la Tabla 3 (sección de resultados). Los casos considerados como desconocidos se refieren a aquellas pacientes que se perdieron durante el seguimiento clínico antes de 15 meses y no se pudo investigar si aún estaban vivas o ya habían fallecido. Para el análisis de sobrevida, aquellas pacientes con estatus de vivas o desconocidas, se consideraron perdidas del seguimiento o “censuradas a la derecha” cuando después del punto de censura (igual al número de meses del seguimiento) no asistieron a las citas médicas para el control de la enfermedad, no respondieron las llamadas telefónicas o no se encontraron en las visitas domiciliarias. En esta cohorte, las pacientes registradas como fallecidas fueron aquellas mujeres cuya causa de muerte principal fue debida al cáncer cervical. La causa de muerte de todas las pacientes, a excepción de una que falleció durante el seguimiento (R221, cuya causa de muerte no se conoce, y para el análisis de sobrevida, se consideró como “desconocida” aunque se siguiera por más de 15 meses), fue confirmada en la historia clínica y el certificado de defunción. De las 134 pacientes con CC incluidas en el análisis con qRT-PCR, sólo se incluyeron 121 en el estudio de sobrevida. Las 13 pacientes excluidas del

estudio no recibieron tratamiento, el tratamiento fue incompleto o no regresaron al Servicio de Oncología después del diagnóstico inicial. El valor de la mediana del seguimiento de las 121 pacientes fue de 60 meses. Para el análisis de la sobrevida se utilizaron como variables la expresión génica de *CDKN3*, el estadio clínico FIGO y la infección por VPH. Para establecer el nivel de corte que permita diferenciar con la mayor sensibilidad y especificidad las pacientes vivas y muertas en relación a la expresión (Fold Change) del gen *CDKN3*, se realizó un análisis "Receiver Operating Curve" (curva ROC). Para ello se establecieron 500 subgrupos de entrenamiento, cada uno con 44 casos seleccionados aleatoriamente. Se calculó el promedio de los valores de corte obtenidos para cada grupo de entrenamiento y posteriormente se analizó como grupo de prueba, el total de las muestras en su totalidad (n=121). Las muestras con valores de expresión genética (FC) iguales o por encima del valor de corte ( $FC \geq 17$ ) se les asignó un valor de 1 y las que tuvieron valores por debajo de la línea de corte, se les asignó un valor de 0. La sobrevida global acumulada fue calculada con el método de Kaplan-Meier y la significancia estadística de las comparaciones entre las curvas se obtuvo con la prueba de log-Rank. A su vez, el estadio clínico FIGO, el tipo de VPH y la expresión de *CDKN3* se incluyeron como co-variables en el modelo de riesgos proporcionales de Cox.

## **5.8 Líneas celulares**

Se utilizaron las líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix positivas para VPH16 (CaSki, SiHa) y VPH18 (HeLa), las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Juan Carlos Gómora del Departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las células se cultivaron en medio Eagle modificado (Gibco® DMEM Cat. 12100-038, Life Technologies) suplementado con suero bovino fetal (Gibco

® Cat. 16000-044, Life Technologies) y una solución de antibiótico-antimicótico (Gibco ® Cat.15240-062, Life Technologies) a 37°C en incubadora de CO<sub>2</sub> al 5%. Las líneas celulares fueron autenticadas por perfiles de Repeticiones cortas en tándem (STR “Short Tandem Repeats”).

### **5.9 Transfecciones con siRNAs en las líneas celulares CaSki, HeLa y SiHa**

Para realizar las transfecciones con siRNAs en cada una de las líneas celulares, se sembraron  $2 \times 10^5$  células/pozo, en placas de doce pozos, y se cultivaron hasta obtener una confluencia del 60-80% antes de la transfección. Las células se transfectaron con un mezcla de tres siRNAs específicos contra el RNA mensajero del gen *CDKN3* o una mezcla de siRNAs que contienen tres secuencias aleatorias que no son específicas de ninguna secuencia de RNA mensajero, como control negativo de transfección (siRNA *CDKN3*: sc-43877, siRNA-R: sc-37007, respectivamente, SantaCruz Biotechnology, Inc) utilizando el reactivo de transfección de siRNAs (sc-29528; SantaCruz Biotechnology, Inc) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se probaron diferentes concentraciones de siRNAs (80, 100 y 120 nM) para investigar la concentración más apropiada para inhibir la mayor cantidad del mRNA de *CDKN3* en las líneas celulares. Para determinar este valor, se realizaron ensayos de qRT-PCR (descrito anteriormente) en cada línea celular 48 horas después de la transfección.

### **5.10 Ensayos de inmunofluorescencia**

La expresión de la proteína *CDKN3* se determinó en las tres líneas celulares transfectadas con siRNAs específicos o siRNAs control. Las células se crecieron directamente en cubreobjetos colocados en los pozos de una placa de 24 pozos. Las células se fijaron a las

96 horas después de la transfección, utilizando etanol absoluto durante 20 min a -20 °C. Posteriormente se adicionó una solución que contiene 5% de albúmina de suero bovino en PBS y Triton X-100 0,05% para la permeabilización de células y se incubó durante 30 minutos. El anticuerpo primario contra CDKN3 (Cat 118702; Abcam, Cambridge, MA), se diluyó 1:200 en la solución permeabilizadora utilizada anteriormente. Se añadió un volumen de 20µl a cada cubreobjetos, los cuales se incubaron durante la noche a 4 °C en cámara húmeda. Después de lavar con PBS, los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron incubando los cubreobjetos con 20µl de anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con FITC (1: 100; ZyMax™, Life Technologies Jackson Lab) 2 horas a temperatura ambiente. Los núcleos celulares se contratiñeron con DAPI [4', 6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro] (1:1000; Invitrogen). Los ensayos se realizaron por triplicado, se incluyeron ensayos de control del anticuerpo primario, para demostrar que el sistema de detección no da señal de fluorescencia por sí solo. Las imágenes se observaron a un aumento de 60× utilizando un microscopio confocal de fluorescencia Olympus (Olympus FV1000, Center Valley, PA), y las imágenes digitales fueron adquiridas con una cámara CCD. La intensidad de fluorescencia se cuantificó en 140 campos de cada experimento utilizando el software ImageJ [33].

## **5. 11 Inmunohistoquímica**

Se exploró la expresión de la proteína CDKN3 en 37 muestras de CC (22 positivas para HPV16 y 15 positivas para otros tipos de VPH) y 21 muestras control por medio de la técnica de inmunohistoquímica (IH). Se construyeron cinco microarreglos de tejidos (TMA), cada uno incluyendo de 10 a 12 muestras de CC y 4 o 5 controles. Los ensayos se realizaron como se ha descrito previamente [21]. Brevemente, los TMA se desparafinaron en xileno y

se rehidrataron secuencialmente con concentraciones crecientes de alcohol. Cada microarreglo se incubó con el anticuerpo primario contra CDKN3 (sc-475, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) preparado a una dilución 1:100 en PBS 1x, se incubaron toda la noche a 4°C, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1x y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, se incubaron 1 hr a temperatura ambiente en oscuridad. El revelado se realizó utilizando 3,3'-diaminobencidina-tetrahydrochloride como un sustrato cromogénico (Cat. KO679 LSAB + Sys / HRP; Dako Cytomation-Carpinteria, CA, EE.UU.). Cada microarreglo se contra tiño con hematoxilina. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se identificó la localización celular de la inmunorreacción, y para cada muestra, se calificó la intensidad en escala de 0-4, donde 0 indica ninguna tinción y 4 la intensidad más alta.

## **5. 12 Western Blot**

Para comprobar la disminución de la expresión de la proteína CDKN3 en las líneas celulares transfectadas con el siRNA-CDKN3, se utilizó la técnica de western blot. Las proteínas se obtuvieron utilizando el buffer de lisis RIPA (Cat: 89.900, Life Technologies). La concentración de proteína de cada lisado se determinó mediante cuantificación por Bradford (Cat: B6916, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA). De cada una de las muestras se tomaron 50 µg de proteína para cargar en el gel de poliacrilamida preparado al 5% (gel concentrador) y al 12% (gel separador), posteriormente las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa. Se bloquearon las membranas con solución de leche descremada al 5% en amortiguador Tris-Tween (TBST), las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-CDKN3 (sc-475 Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y

con el anticuerpo anti-Actina como control de carga (Amablemente donado por el Dr. Manuel Hernández, CINVESTAV). Posteriormente se incubaron las membranas durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios. Después de lavar con TBST, las proteínas se revelaron utilizando el kit de quimioluminiscencia (GE Healthcare Bio-Sciences).

### 5.13 Ensayos de proliferación

Los experimentos se realizaron dos veces por triplicado. Las células CaSki, HeLa y SiHa transfectadas con siRNAs específicos contra CDKN3 y siRNAs control se sembraron por triplicado en pozos de una placa de cultivo de 24 pozos y se cosecharon a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la transfección. La proliferación se midió por el método colorimétrico MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium), basado en la conversión de las sales de tetrazolio a cristales de formazán por las enzimas deshidrogenasas activas en las mitocondrias, utilizando el ensayo comercial de proliferación celular “Vybrant MTT” (V-13154, Molecular Probes). De acuerdo al protocolo del fabricante, mezclar los siRNAs previamente diluidos en medio de cultivo DMEM (específicos contra *CDKN3* y siRNAs control) con el reactivo transfectante e incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Eliminar el medio de cultivo de cada pozo y se sustituir con 400  $\mu$ L de medio de cultivo fresco (DMEM sin rojo de fenol, Gibco, Life Technologies), adicionar a cada pozo 20  $\mu$ L de solución de MTT e incubar a 37°C por 3 horas. Posteriormente, retirar el medio de cultivo, excepto 50  $\mu$ L, y sustituir con 350  $\mu$ L de DMSO (dimetilsulfóxido), agitar suavemente e incubar a 37°C por 10 minutos. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a  $\lambda = 560$  nm (BioPhotometer Eppendorf). Las células se duplican siguiendo un modelo exponencial dado por la ecuación:  $y_t = y_0 * e^{rx}$ , en donde  $y_t$  = absorbancia en el instante  $t > 0$ ,  $x$  = tiempo

de incubación en horas,  $y_0$  = absorbancia en  $t = 0$ , y  $r$  = tasa de crecimiento. El tiempo de duplicación celular ( $T_d$ ) se calculó utilizando la fórmula:  $T_d = (t_2 - t_1) \times [\log 2 / (\log y_{t_2} - \log y_{t_1})]$ , donde  $y_{t_1}$  representa la absorbancia en  $t_1$  (24 h),  $y_{t_2}$  representa la absorbancia en  $t_2$  (96 h). La tasa de duplicación se calculó dividiendo el tiempo de duplicación de las células transfectadas con siRNAs específicos contra *CDKN3*, entre el tiempo de duplicación de las células transfectadas con siRNAs control.

#### **5.14 Ensayos de invasión y migración**

Los experimentos se realizaron dos veces por triplicado. Los ensayos de invasión se realizaron en insertos de policarbonato (PET) con poro de 8.0  $\mu\text{m}$  con matrigel en placa de 24 pozos (BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber #354480; Becton Dickinson). Las células previamente cuantificadas y ajustadas en 500  $\mu\text{l}$  de medio libre de suero ( $5.0 \times 10^4$  células), fueron sembradas por duplicado en los insertos, los insertos se colocaron en cada uno de los pozos de la placa que contienen 750  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo enriquecido con suero fetal bovino como quimio atrayente. Después de incubar 22 horas a 37°C en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%, se retiraron los insertos del pozo y se limpió la superficie de Matrigel con un hisopo de algodón. Las células que migraron a través de la capa de Matrigel del inserto se colectan y se cuantifican mediante el ensayo colorimétrico MTT descrito previamente. Los ensayos de migración se realizan de manera similar, las células fueron sembradas en insertos de policarbonato sin Matrigel (BD BioCoat™ Control Inserts 24-well, Cat#354578; Becton Dickinson) en pozos por duplicado. Las placas se incubaron durante 22 horas a 37°C en ambiente de  $\text{CO}_2$  al 5%. Las células que migraron a través del inserto poroso se colectan y se cuantifican mediante el ensayo colorimétrico MTT descrito previamente.

### 5.15 Análisis estadístico

El valor de significancia estadística de las diferencias en la expresión del gen *CDKN3* entre tumores y controles se calculó con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (MW). Se realizó análisis de curvas ROC y se utilizó el índice de Youden [21] para seleccionar el mejor punto de corte que establezca el valor en donde se considera un FC elevado (considerando el nivel expresión de gen *CDKN3* obtenido por RT-qPCR) y un FC bajo (considerando el nivel expresión de gen *CDKN3* obtenido por RT-qPCR) en el grupo de pacientes seleccionadas. El tiempo de supervivencia global acumulada se calculó por el método de Kaplan-Meier y se analizó mediante la prueba de log-rank. La estadificación FIGO, la expresión génica de *CDKN3* y tipo de VPH fueron incluidas en los modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox univariable y multivariable. El valor de significancia estadística entre las diferencias de medias en las líneas celulares de los experimentos se calculó con la prueba t. Todas las pruebas fueron 2 colas, y los valores de “p” menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Los datos fueron analizados utilizando los programas: Sigma Stat y SPSS ver. 17.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Expresión del gen *CDKN3* en pacientes con cáncer de cuello uterino

En la Tabla 3 se muestran los datos clínicos completos y "fold Change" del nivel de expresión del gen *CDKN3* en cada una de las 134 pacientes con CC. En la gráfica de "box plots" (Figura 1A), se muestra claramente que la expresión del gen *CDKN3* fue mucho mayor en las mujeres con cáncer que en el grupo control, y que esta diferencia es estadísticamente significativa ( $FC = 6.4$ ,  $P = 8 \times 10^{-6}$ , prueba MW). Por otra parte, cuando las muestras de pacientes con CC se agruparon de acuerdo a la positividad del VPH16, la diferencia en la expresión, con respecto al grupo control se mantiene tanto en el grupo de CC positivas para VPH16 ( $FC = 6.6$ ;  $P = 8 \times 10^{-5}$ , prueba MW) como en el grupo de CC positivo para otros tipos de VPH ( $FC = 5$ ;  $P = 8 \times 10^{-6}$ , prueba Mann Whitney) (Figura 1A). Sin embargo, el gen *CDKN3* se encontró sub expresado ( $FC < 1$ ) o con un valor de FC igual o menor de 1.5, en relación con el grupo de control, en el 10.4% ( $n = 14$ ) de los tumores, principalmente de los tumores positivos para otros tipos de VPH (Figura 1B). Estos datos permiten concluir que la expresión del gen *CDKN3* está aumentada en la mayoría de los carcinomas de cérvix independientemente del tipo de VPH.

**Tabla 3. Datos clínicos y "fold Change" del nivel de expresión del gen CDKN3 en 134 pacientes con CC.**

Muestra <sup>a</sup>	Histología <sup>b</sup>	Estadio	Edad (años)	Tratamiento <sup>c</sup>	Seguimiento (meses)	Estatus <sup>d</sup>	Tipo viral	Fold Change <sup>e</sup>
R015	CCE	IIB	42	TELE+HT	66	Viva	VPH16	11.93
R035	CCE	IB2	48	TELE+QUIMIO+HT	73	Viva	VPH16	3.37
R052	ACC	IIB	54	TELE+BRAQUI+HT	19	Muerta	VPH16	6.79
R057	ACC	IB1	32	HT	93	Viva	VPH16	8.69
R070*	CCE	IIB	74	TELE+BRAQUI+QUIMIO	4	Desconocido	VPH16	7.47
R072	CCE	IB1	61	HT+TELE+BRAQUI	86	Viva	VPH16	4.36
R081	ACC	IB1	41	HT	62	Viva	VPH16	5
R093	ACC	IB1	57	HT	53	Viva	VPH16	10.76
R094	CCE	IB1	45	HT	62	Viva	VPH16	5.08
R170	CCE	IIB	67	TELE+QUIMIO+HT	82	Viva	VPH16	5.03
R183	CCE	IB1	64	TELE+BRAQUI	61	Viva	VPH16	5.52
R221	CCE	IB2	41	TELE+BRAQUI+QUIMIO	33	Muerta**	VPH16	5.57
R232	CCE	IB2	45	TELE+BRAQUI+QUIMIO	33	Muerta	VPH16	21.98
R240	CCE	IIIB	31	TELE+BRAQUI+QUIMIO	11	Muerta	VPH16	30.47
R245*	CCE	IB1	64	SIN TRATAMIENTO	19	Muerta	VPH16	14.19
R251	CCE	IB1	61	TELE+BRAQUI	14	Desconocido	VPH18	6.44
R254*	CCE	IB1	23	HT	5	Desconocido	VPH45	4.14
R255	CCE	IIA	45	TELE+BRAQUI+QUIMIO	42	Muerta	VPH16	4.8
R256	CCE	IIA	78	TELE	21	Muerta	VPH51	7.35
R257	CCE	IB1	61	TELE+BRAQUI	2	Muerta	VPH16	41.43
R258	CCE	IB1	36	HT+TELE+BRAQUI	68	Viva	VPH16	5.49
R259	CCE	IVA	46	TELE+BRAQUI+QUIMIO	67	Viva	VPH16	325.34
R260	CCE	IB2	24	TELE+BRAQUI	66	Viva	VPH16	2.2
R261	CCE	IB1	43	HT	77	Viva	VPH18	3.6
R262	CCE	IIB	54	TELE+BRAQUI+QUIMIO	9	Muerta	VPH16	1,203.75
R264	CCE	IIB	49	TELE+BRAQUI+QUIMIO	64	Viva	VPH16	16.9
R265	CCE	IB1	46	TELE+BRAQUI	67	Viva	VPH16	12.78
R266	CCE	IIA	51	TELE+BRAQUI+QUIMIO	77	Viva	VPH18	3.34
R268	CCE	IIB	34	TELE+BRAQUI+QUIMIO	58	Viva	VPH16	5.92
R269*	CCE	IB1	66	SIN TRATAMIENTO	0	Desconocido	VPH16	2.01
R271	CCE	IIB	56	TELE+BRAQUI+QUIMIO	64	Viva	VPH31	1.52
R275	CCE	IIB	54	TELE+BRAQUI+QUIMIO	70	Muerta	VPH16	485.91
R276	CCE	IIB	49	HT+TELE+BRAQUI+QUIMIO	21	Muerta	VPH16	111.92
R278	CCE	IB1	54	HT	13	Desconocido	VPH45	4.35
R282	CCE	IIIB	41	TELE+BRAQUI+QUIMIO	70	Viva	VPH16	1.99
R284	ACC	IB2	33	TELE+BRAQUI+QUIMIO	63	Viva	VPH16	17.56
R289	CCE	IIB	44	TELE+BRAQUI+QUIMIO	12	Desconocido	VPH31	3.55
R291*	CCE	IIB	55	SIN TRATAMIENTO	33	Muerta	VPH16	2.14
R296	CCE	IB2	48	TELE+BRAQUI+QUIMIO	69	Viva	VPH16	6.37
R297	CCE	IIB	47	TELE+BRAQUI+QUIMIO	64	Viva	VPH16	302.39
R307	ACC	IIB	74	TELE+BRAQUI	50	Viva	VPH58	13.7
R308	ACC	IB1	45	TELE+BRAQUI	61	Viva	VPH16	13.97
R312	ACC	IB2	34	TELE+BRAQUI+QUIMIO	68	Viva	VPH16	8.72
R315	CCE	IIIB	41	TELE+BRAQUI+QUIMIO	10	Muerta	VPH16	6.32
R316	CCE	IB1	67	TELE+BRAQUI	65	Viva	VPH51	4.79
R319	CCE	IB1	47	TELE+BRAQUI	74	Viva	VPH68	8.28

Muestra <sup>a</sup>	Histología <sup>b</sup>	Estadio	Edad (años)	Tratamiento <sup>c</sup>	Seguimiento (meses)	Estatus <sup>d</sup>	Tipo viral	Fold Change <sup>e</sup>
R322	CCE	IIIB	74	TELE+BRAQUI	60	Viva	VPH16	18.95
R323*	CCE	IIIB	78	SIN TRATAMIENTO	1	Desconocido	VPH33	5.37
R324	CCE	IB2	28	TELE+BRAQUI+QUIMIO	14	Muerta	VPH16	30.48
R326	CCE	IIB	66	TELE+BRAQUI+QUIMIO	37	Muerta	VPH33	10.99
R330	CCE	IB1	72	TELE+BRAQUI	54	Viva	VPH16	16.36
R333	CCE	IIB	56	TELE+BRAQUI+QUIMIO	66	Viva	VPH16	5.71
R335	ACC	IB1	37	HT+TELE+BRAQUI+QUIMIO	65	Viva	VPH16	10.47
R336	CCE	IB2	36	TELE+BRAQUI+QUIMIO	64	Viva	VPH16	4.48
R338	CAE	IB1	44	TELE+BRAQUI+QUIMIO	64	Viva	VPH16	3.62
R339	CCE	IB2	31	TELE+BRAQUI+QUIMIO	13	Muerta	VPH16	5.82
R340	CCE	IB1	29	HT	63	Viva	VPH45	0
R343	CCE	IB1	49	HT+TELE+BRAQUI	66	Viva	VPH31	2.19
R352	CCE	IIB	43	TELE+BRAQUI+QUIMIO	44	Muerta	VPH16	37
R354	CCE	IIB	56	TELE+BRAQUI	65	Viva	VPH16	2.51
R359	ACC	IB2	34	TELE+BRAQUI+QUIMIO	17	Muerta	VPH16	18.44
R361	CCE	IB2	28	TELE+BRAQUI+QUIMIO	65	Viva	VPH16	10.13
R366	CCE	IB2	41	TELE+BRAQUI+QUIMIO	62	Viva	VPH16	3.13
R367	CCE	IB2	45	TELE+BRAQUI+QUIMIO	42	Muerta	VPH16	5.7
R368	CCE	IIIB	36	TELE+BRAQUI+QUIMIO	70	Viva	VPH16	2.39
R369	CCE	IB1	50	HT	65	Viva	VPH16	6.13
R373	CCE	IIB	41	TELE+BRAQUI+QUIMIO	9	Muerta	VPH16	96.59
R374	CCE	IIB	60	HT+TELE+BRAQUI+QUIMIO	65	Viva	VPH16	3.03
R375	ACC	IB1	54	HT	63	Viva	VPH16	3.15
R376	CCE	IB2	46	TELE+BRAQUI+QUIMIO	63	Viva	VPH16	1.32
R378	CCE	IB2	42	TELE+BRAQUI+QUIMIO	56	Viva	VPH16	6.46
R379	CCE	IB2	59	TELE+BRAQUI	12	Desconocido	VPH18	7.17
R380*	CCE	IIIB	64	SIN TRATAMIENTO	12	Muerta	VPH16	6.37
R381	CCE	IB2	46	TELE+BRAQUI+QUIMIO	60	Viva	VPH31	14.86
R385	CCE	IB2	47	TELE+BRAQUI	48	Muerta	VPH45	8.13
R386	CCE	IB1	73	TELE+BRAQUI	56	Viva	VPH16	6.53
R390	CCE	IB1	51	TELE+BRAQUI+QUIMIO	64	Viva	VPH16	8.27
R392	CCE	IIIB	69	TELE+BRAQUI	61	Viva	VPH16	1.5
R393	CCE	IB1	42	TELE+BRAQUI	58	Viva	VPH33	1.36
R394	ACC	IIB	49	TELE+BRAQUI+QUIMIO	11	Muerta	VPH33	0.12
R396*	ACC	IB2	53	TELE+BRAQUI+QUIMIO	7	Desconocido	VPH16	4.21
R397	CCE	IB2	42	TELE+BRAQUI+QUIMIO	63	Viva	VPH16	7.91
R398	ACC	IB2	46	TELE+BRAQUI+QUIMIO	64	Viva	VPH45	5.83
R399	CCE	IIB	42	TELE+BRAQUI+QUIMIO	58	Viva	VPH16	5.46
R400	CCE	IB2	32	TELE+BRAQUI+QUIMIO	54	Viva	VPH59	7.48
R401	CCE	IA1	73	HT	71	Viva	VPH16	7.05
R403	CCE	IIB	34	TELE+BRAQUI+QUIMIO	64	Viva	VPH16	7.27
R405	CCE	IB1	51	TELE+BRAQUI+QUIMIO	71	Viva	VPH33	3.99
R407	ACC	IIB	53	TELE+BRAQUI	43	Muerta	VPH51	20.17
R409	CCE	IB2	68	TELE+BRAQUI+QUIMIO	42	Viva	VPH16	11.08
R411	CCE	IB1	34	HT+TELE+BRAQUI	60	Viva	VPH16	12.65
R412	CCE	IB2	33	TELE+BRAQUI+QUIMIO	63	Viva	VPH16	8.31
R413*	CCE	IB2	54	SIN TRATAMIENTO	0	Muerta	VPH31	4.89

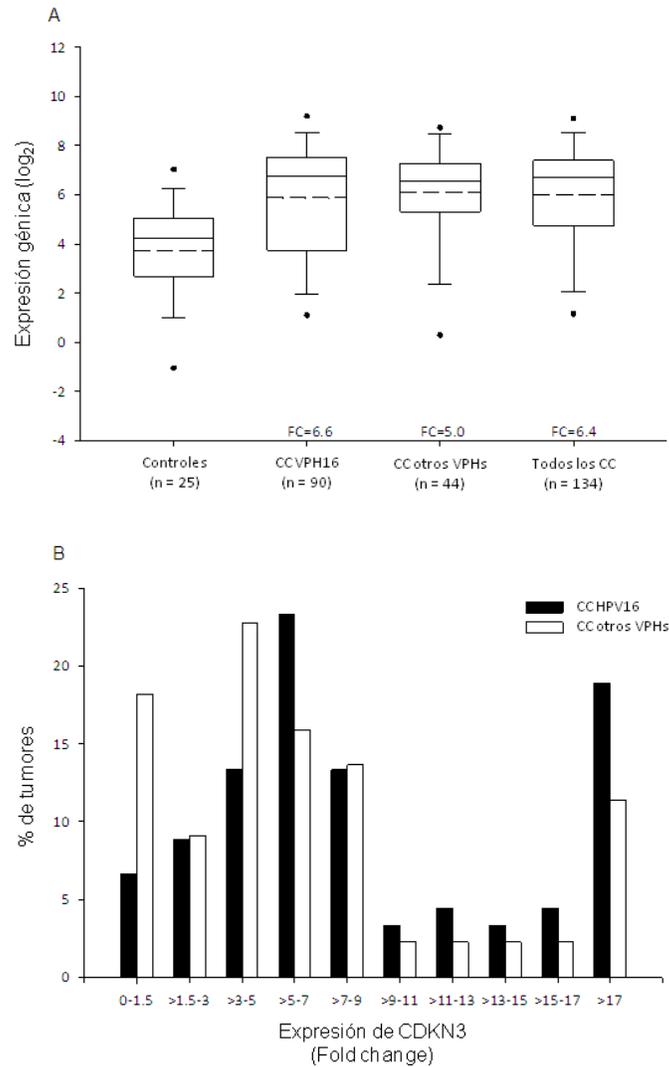
Muestra <sup>a</sup>	Histología <sup>b</sup>	Estadio	Edad (años)	Tratamiento <sup>c</sup>	Seguimiento (meses)	Estatus <sup>d</sup>	Tipo viral	Fold Change <sup>e</sup>
R415	CAE	IIB	55	TELE+BRAQUI+QUIMIO	59	Viva	VPH16	8.75
R418	ACC	IIB	61	TELE+BRAQUI+QUIMIO	3	Muerta	VPH16	14.04
R420	CCE	IIB	46	TELE+BRAQUI+QUIMIO	32	Viva	VPH59	22.67
R421*	CCE	IIIB	61	TELE+BRAQUI	4	Desconocido	VPH51	0.42
R422	CCE	IVB	57	TELE	29	Muerta	VPH16	1.51
R425	CCE	IB1	64	TELE+BRAQUI	72	Viva	VPH59	5.02
R426	CCE	IIB	67	TELE+BRAQUI+QUIMIO	23	Muerta	VPH16	0.38
R428	CCE	IB1	45	HT	61	Viva	VPH16	4.01
R429	CCE	IB2	46	TELE+BRAQUI+QUIMIO	27	Viva	VPH52	7.17
R430	ACC	IB1	64	HT	59	Viva	VPH16	8.28
R432*	CCE	IIIB	57	TELE	7	Desconocido	VPH45	0.04
R434	ACC	IB1	34	HT+TELE+BRAQUI	61	Viva	VPH16	7.57
R437	CCE	IIA	72	HT	65	Viva	VPH16	3.25
R440	CCE	IB2	45	TELE+BRAQUI+QUIMIO	70	Viva	VPH16	15.44
R441	ACC	IIB	24	TELE+BRAQUI+QUIMIO	11	Desconocido	VPH16	15.21
R443	CCE	IB1	34	HT+TELE+BRAQUI	61	Viva	VPH16	7.08
R444*	CCE	IIB	71	SIN TRATAMIENTO	26	Muerta	VPH16	1.32
R446	ACC	IB1	43	HT	59	Viva	VPH16	5.73
R451	CCE	IB2	36	TELE+BRAQUI	59	Viva	VPH45	1.14
R455	CCE	IIA	67	TELE+BRAQUI	60	Viva	VPH16	49.97
R457	CCE	IIIB	60	TELE+BRAQUI	15	Muerta	VPH31	34.4
R458	CCE	IIB	76	TELE+ HT	64	Viva	VPH59	2.19
R460	CCE	IIB	77	TELE+BRAQUI	29	Muerta	VPH16	2.56
R462	CCE	IVB	76	CUIDADOS PALIATIVOS	2	Muerta	VPH53	0.17
R465	CCE	IIB	45	TELE+BRAQUI+QUIMIO	64	Viva	VPH35	4.22
R466*	CCE	IB	89	SIN TRATAMIENTO	39	Muerta	VPH33	1.23
R468	CCE	IB2	62	TELE+BRAQUI	67	Viva	VPH33	9.49
R469	CCE	IVB	60	CUIDADOS PALIATIVOS	1	Muerta	VPH58	17.17
R470	IND	IIB	51	TELE+BRAQUI+QUIMIO	3	Muerta	VPH58	3.01
R475	CCE	IIIB	73	TELE+QUIMIO	14	Muerta	VPH52	2.02
R478	CCE	IB1	46	TELE+BRAQUI	60	Viva	VPH16	18.64
R481	CCE	IIB	77	TELE	6	Muerta	VPH16	1,158.26
R482	CCE	IB2	61	TELE+BRAQUI+QUIMIO	60	Viva	VPH16	6.42
R483	CCE	IVB	51	CUIDADOS PALIATIVOS	11	Muerta	VPH16	5.32
R485	CCE	IIA	60	TELE+BRAQUI	59	Viva	VPH16	0.02
R487	CCE	IB1	73	TELE+BRAQUI	14	Muerta	VPH45	6.71
R488	CCE	IIA	55	TELE+BRAQUI+QUIMIO	29	Muerta	VPH58	5.27
R493	CCE	IIB	50	TELE+BRAQUI+QUIMIO	67	Viva	VPH45	6.55
R495	CCE	IIB	68	TELE+BRAQUI	62	Viva	VPH16	0.06
R496	CCE	IIIB	52	TELE+BRAQUI+QUIMIO	63	Viva	VPH16	6.77
R503	CCE	IIB	35	TELE+BRAQUI+QUIMIO	13	Muerta	VPH45	20.42

a. Un total de 134 muestras fueron seleccionadas para evaluar la expresión de *CDKN3* por RT-qPCR, pero sólo 121 pacientes fueron incluidos en el estudio de sobrevida. Los pacientes que no recibieron tratamiento (n = 8) o se perdieron durante el seguimiento en los primeros 10 meses (n = 5) no se incluyeron en el análisis de sobrevida (marcados con un asterisco).

b. ACC, Adenocarcinoma. CCE, Carcinoma de células escamosas. CAE, Carcinoma Adenoescamoso. IND, Indiferenciado.

c. HT, Histerectomía radical. Tele, teleterapia. Braqui, braquiterapia. Chimio, Quimioterapia con Cisplatino.

- d. El estatus viva se registró en aquellas pacientes en el último seguimiento, el estatus muerta, se registró cuando la muerte fue causada por el tumor primario de cáncer de cérvix, excepto el caso marcado con doble asterisco (R221), y los casos registrados como desconocidos fueron aquellos que se perdieron durante el estudio de seguimiento. La causa de la muerte de la paciente marcada con doble asterisco se desconoce.
- e. Se calculó el fold change (FC) de la siguiente manera: expresión de *CDKN3* de cada tumor / mediana de la expresión de *CDKN3* en el grupo de controles.

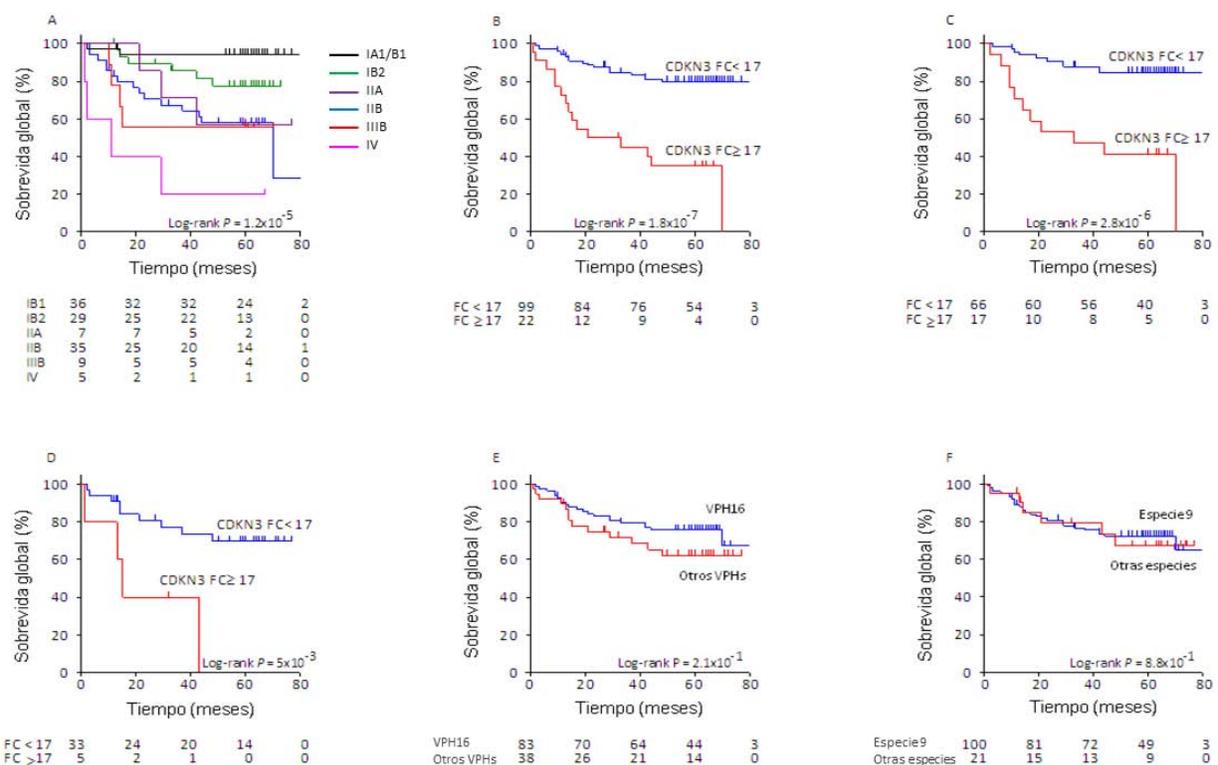


**Figura 1. Expresión del gen *CDKN3* en el epitelio cervical normal y en muestras de cáncer de cuello uterino.** En el panel A se muestran los gráficos de caja de las intensidades de la expresión génica, expresado en valores de Log<sub>2</sub>. Los límites superior e inferior de las cajas representan los percentiles 75 y 25, respectivamente. Las líneas negra y punteada dentro de los recuadros representan los valores de la mediana y la media respectivamente, y los bigotes representan los valores máximos y mínimos que se encuentran dentro del rango intercuartil. Los valores fuera de este rango están representados por círculos negros. El “fold change” (FC) se calculó dividiendo la mediana de cada grupo de CC entre la mediana del grupo control. Las diferencias estadísticas entre los grupos se calcularon utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. El panel B muestra la frecuencia (%) de la distribución del FC de *CDKN3*, que se calcula en cada tumor teniendo en cuenta la media del grupo control.

## **6.2 Asociación entre la expresión génica de *CDKN3*, el estadio clínico y el tipo viral con la sobrevida de las pacientes con CC**

Se investigó si la sobre expresión de *CDKN3* está asociada a un menor tiempo de sobrevida en 121 pacientes con CC, y si es independiente del estadio clínico y el tipo de VPH de los tumores. De las 121 muestras, 83 fueron positivas para el VPH 16 y 38 para otros tipos virales (Tabla 3). La mediana del tiempo de seguimiento de las pacientes fue de 60 meses a partir del diagnóstico inicial. Los estadios clínicos (FIGO) de las 121 pacientes fueron los siguientes: IA1 (n = 1), IB1 (n = 35), IB2 (n = 29), IIA (n = 7), IIB (n = 35), IIIB (n = 9), and IV (n = 5). La supervivencia global de todas las pacientes fue de 71.9% y para cada uno de los estadios clínicos FIGO IA1/IB1, IB2, IIA, IIB, IIIB y IV fue del 94.4%, 79.3%, 57.1%, 57.1%, 55.6% y 20% respectivamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $P = 1.2 \times 10^{-5}$ , log-rank test, Figura 2A). Cuando se analizó la expresión de *CDKN3* con las curvas de Kaplan-Meier, se observó que las pacientes con alta expresión del gen *CDKN3* ( $FC \geq 17$ ) tuvieron una menor sobrevida que las que tuvieron una expresión baja de *CDKN3*, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $P = 1.8 \times 10^{-7}$ , log-rank test; Figura 2B). La supervivencia global de las pacientes con niveles altos de expresión de *CDKN3* ( $FC \geq 17$ ) fue de solo 31.8 % y la mediana del tiempo de sobrevida de las pacientes fallecidas (68.2%) fue de 14 meses. En contraste, la sobrevida global de las pacientes con niveles de expresión bajos de *CDKN3* ( $FC < 17$ ) fue de 80.8% y la mediana del tiempo de sobrevida de las mujeres fallecidas (19.2%) fue de 19 meses. Por otra parte, se realizó un análisis de sobrevida considerando el nivel de expresión *CDKN3* segregando a las pacientes en dos grupos de acuerdo a la positividad para el VPH16. En los dos grupos de pacientes, la sobrevida global fue mucho menor en los pacientes con alta expresión de *CDKN3* ( $P < 0.01$ , prueba de log-rank; Figuras 2C, 2D). Esto indica que la

menor sobrevida asociada a la sobre expresión del gen *CDKN3* se presenta no sólo en los CC positivas para VPH16 (Figura 2C), sino también en CC positivas para otros tipos de VPHs (Figura 2D). Por otra parte, no hubo diferencia en el nivel de sobrevida entre pacientes positivas para VPH16 y otros tipos de VPH (Figura 2E), ni entre los pacientes infectados con los tipos de VPH de la especie 9 (grupo relacionado con el VPH16) y pacientes infectadas con virus de otros especies (Figura 2F). El FC de la expresión de *CDKN3*, el estadio clínico FIGO y el tipo de VPH se analizaron individualmente y en conjunto a través de un modelo de riesgos proporcionales de Cox. Debido al tamaño pequeño de la muestra en algunos estadios clínicos FIGO, estos se reagruparon en 3 grupos. El grupo I (n = 65) incluye a los estadios clínicos IA1, IB1 y IB2, el grupo II (n = 42) incluye los estadios clínicos IIA y IIB, y el grupo III (n = 14) incluye los estadios clínicos IIIB y IV. La razón de riesgo (HR) para el FC  $\geq 17$  en la expresión del gen *CDKN3* fue de 5.1 (IC 95%: 2.6-10,  $P = 3 \times 10^{-6}$ ; Tabla 4). A su vez, tomando el grupo I como referencia, el HR del FIGO reagrupado fue de 4.2 (IC 95%: 1.8-9.6,  $P = 7.7 \times 10^{-4}$ ) y de 6.8 (IC 95%: 2.5-18.1,  $P = 1.4 \times 10^{-4}$ ) para los grupos II y III, respectivamente. Considerando al grupo de pacientes positivas para VPH16 como referencia, el HR para el grupo de pacientes con otro tipo viral fue de 0.6 (IC 95%: 0.3- 1.3,  $P = 2.1 \times 10^{-1}$ , Tabla 4), lo que confirma no hay diferencia entre estos dos grupos de tumores. Cuando el estadio clínico FIGO re-agrupado y la expresión de *CDKN3* se incluyeron dentro del mismo modelo de COX, el HR para *CDKN3* se mantuvo significativo (HR = 3.4, IC 95%: 1.7-6.8,  $P = 7 \times 10^{-4}$ , Tabla 4). Cuando el tipo viral y la expresión de *CDKN3* se incluyeron en el modelo de Cox, el HR para *CDKN3* se mantuvo significativo (HR = 5.6, IC 95%: 2.8-11.2,  $P = 1.1 \times 10^{-6}$ ; datos no mostrados). Estos datos indican que la menor sobrevida en las pacientes con CC que presentan altos niveles de expresión de *CDKN3* es independiente del estadio clínico FIGO y el tipo de VPH.



**Figura 2. Análisis de supervivencia de las mujeres con cáncer de cuello uterino de acuerdo a la estadiación de la FIGO, el tipo de VPH, y la expresión de *CDKN3*.** Se muestran las curvas de Kaplan-Meier de las pacientes con CC, considerando el tipo viral, el estadio clínico y la expresión del gen Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 3 (*CDKN3*). Las pacientes fueron seguidas durante al menos 60 meses. Se muestran las gráficas de supervivencia global analizada con curvas de Kaplan-Meier en las pacientes con CC clasificadas por estadio FIGO (Panel A), por nivel de expresión de *CDKN3* (en el Panel B se observa el grupo completo de pacientes con CC, el panel C muestra solo las pacientes con CC VPH16 positivas, el panel D muestra las pacientes con CC positivas para otros tipos de VPH), por tipo de VPH (Panel E) y por especie de VPH (Panel F). En todos los paneles, el valor *P* se calculó comparando las curvas con la prueba de log-rank. El número de pacientes en riesgo en cada intervalo de tiempo se observa en los cuadros que se encuentran debajo de cada panel. Las pacientes censuradas están representadas con barras verticales (ver materiales y métodos). FC, Fold change.

**Tabla 4. Análisis univariado y multivariado de la sobrevida de las pacientes con CC incluyendo la expresión de CDKN3, el estadio clínico y el tipo de VPH.**

Variable	<i>n</i>	Univariado (HR) <sup>a</sup>	<i>p</i> <sup>b</sup>	Intervalo de confianza 95%	Multivariado (HR) <sup>c</sup>	<i>p</i> <sup>b</sup>	Intervalo de confianza 95%
Expresión de <i>CDKN3</i> (FC) <sup>d</sup>							
Baja (< 17)	99	1			1		
Alta (≥ 17)	22	5	3.3 x 10 <sup>-6</sup>	2.5 - 10.0	3.3	9.2 x 10 <sup>-4</sup>	1.6 - 6.8
FIGO							
IB1/IB2	65	1			1		
IIA/IIB	42	4.1	1.0 x 10 <sup>-3</sup>	1.8 - 9.3	3.1	9.6 x 10 <sup>-3</sup>	1.3 - 7.3
IIIB/IVB	14	6.9	1.2 x 10 <sup>-4</sup>	2.6 - 18.4	4.5	3.9 x 10 <sup>-3</sup>	1.6 - 12.7
Tipo viral							
VPH16	83	1					
Otros tipos virales <sup>e</sup>	38	0.6	1.9 x 10 <sup>-1</sup>	0.3 - 1.3			

a. Hazard Ratio no ajustado. El análisis univariado se realizó para cada variable.

b. Modelo de riesgos proporcionales de Cox.

c. Hazard Ratio ajustado. El análisis multivariado se realizó considerando la expresión de *CDKN3* (FC) y la clasificación FIGO.

d. FC, fold change, expresión de *CDKN3* en los tumores en relación con el promedio de la expresión del grupo control.

e. Tumores positivos para los VPH 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 53, 58, 59 y 68.

### **6.3 Efecto de la inhibición de la expresión génica de *CDKN3* en la proliferación, la migración y la invasión de líneas celulares derivadas de CC**

La asociación del elevado nivel de expresión del gen *CDKN3* con una menor supervivencia en los pacientes con CC sugiere que este gen puede estar involucrado en la progresión tumoral. Para investigar si este gen es esencial para la proliferación, la migración y la invasión de células cancerosas, se inhibió la expresión del gen *CDKN3* en líneas celulares derivadas de CC (HeLa, CaSki y SiHa) utilizando siRNAs específicos. Como ya se mencionó en materiales y métodos, se evaluaron diferentes concentraciones de siRNAs específicos contra el gen *CDKN3*, para utilizar aquella en donde se obtuviera la máxima reducción del mRNA de *CDKN3*; las concentraciones óptimas de siRNAs fueron: 80 nM para SiHa y 100 nM para CaSki, y HeLa. Con estas concentraciones, se obtuvo en promedio una reducción del 47% en el mRNA de *CDKN3* ( $P < 1 \times 10^{-4}$ , prueba de t, Tabla 5) y en promedio una reducción del 53% en la expresión de la proteína de *CDKN3*, considerando la cuantificación de la intensidad de fluorescencia ( $P < 1 \times 10^{-10}$ , prueba de t; Figuras 3A y 3B) en las tres líneas celulares; además se demostró que el anticuerpo contra *CDKN3* es específico (señal positiva FITC, Figura 3A) ya que en el ensayo donde solo se incuban las laminillas con el anticuerpo secundario (Figura 4) no se observa señal positiva. En el ensayo de Western blot, se observa que en las líneas transfectadas con siRNAs específicos contra *CDKN3*, la cantidad de proteína disminuye, principalmente en las líneas celulares CaSki y HeLa (Figura 3C), comprobando el efecto de la disminución de la expresión al inhibir el mRNA con siRNAs contra *CDKN3*.

**Tabla 5. Disminución de la cantidad de mRNA de CDKN3 en células transfectadas con siRNAs específicos contra CDKN3.**

Línea celular	Nivel de mRNA <sup>a</sup>		% of disminución <sup>d</sup>	Valor de p <sup>e</sup>
	Promedio ± S.D.			
	siRNA Control <sup>b</sup>	siRNA <i>CDKN3</i> <sup>c</sup>		
CaSki	21.6 ± 2.1	8.6 ± 2.4	60.2	3 x 10 <sup>-5</sup>
HeLa	211.3 ± 17.1	109.1 ± 15.4	48.3	8 x 10 <sup>-7</sup>
SiHa	264.9 ± 31.5	173.1 ± 17.3	34.7	8 x 10 <sup>-7</sup>

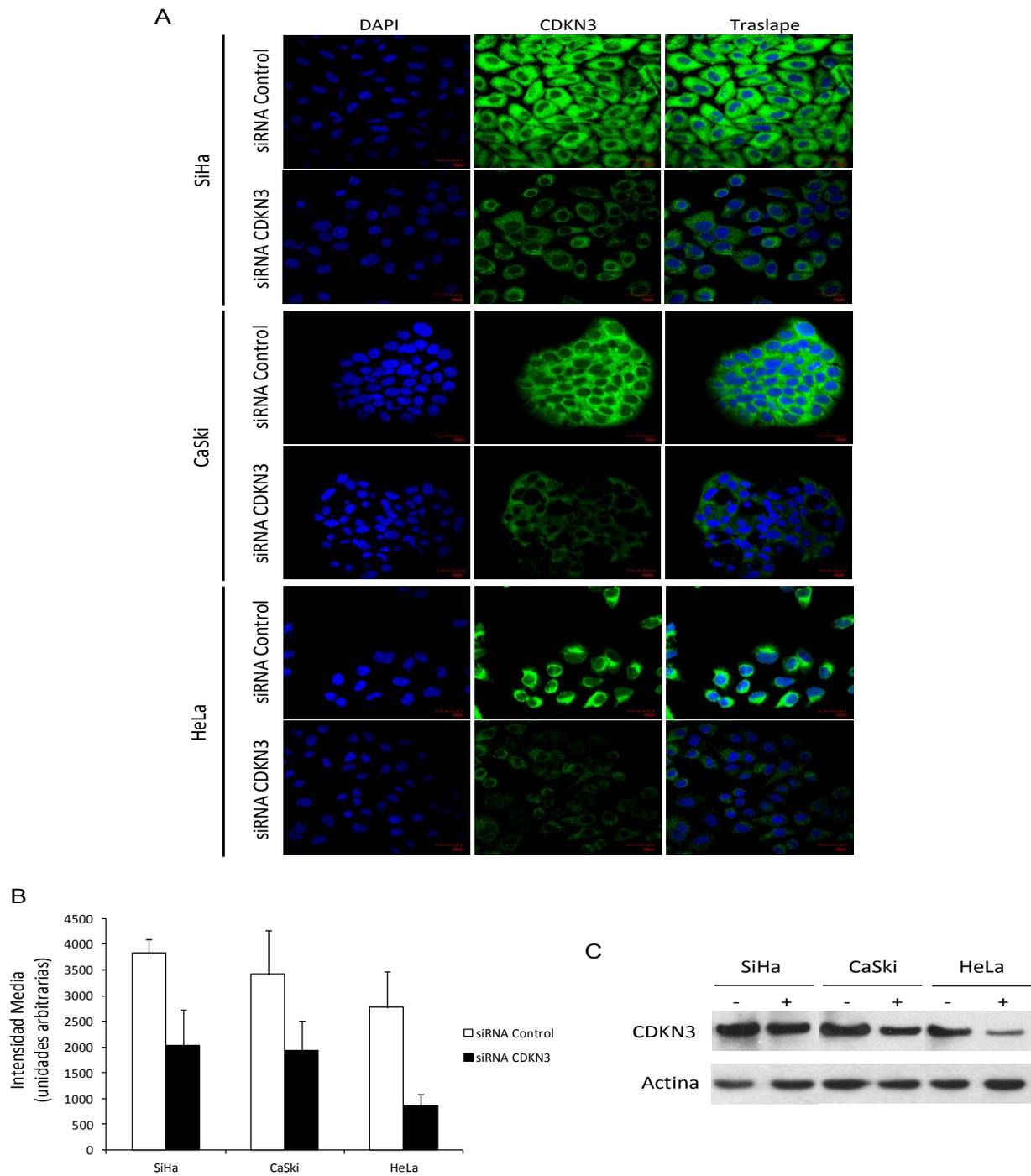
a. Nivel de mRNA normalizado con el control interno (*GAPDH*).

b. Células transfectadas con una mezcla de 3 siRNAs aleatorios.

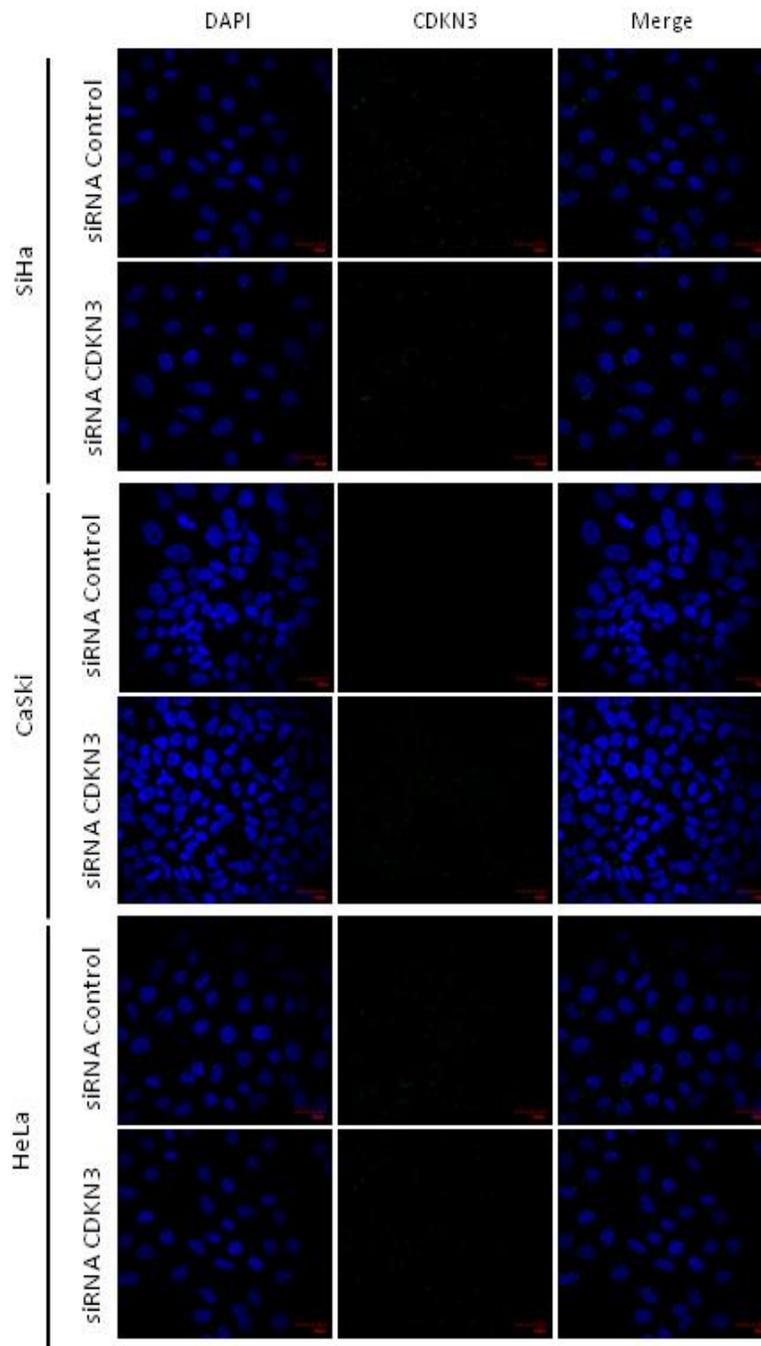
c. Células transfectadas con una mezcla de 3 siRNAs específicos contra *CDKN3*.

d. % of Disminución= 100 - (siRNA *CDKN3*/siRNA Control)\*100

e. Prueba de T.

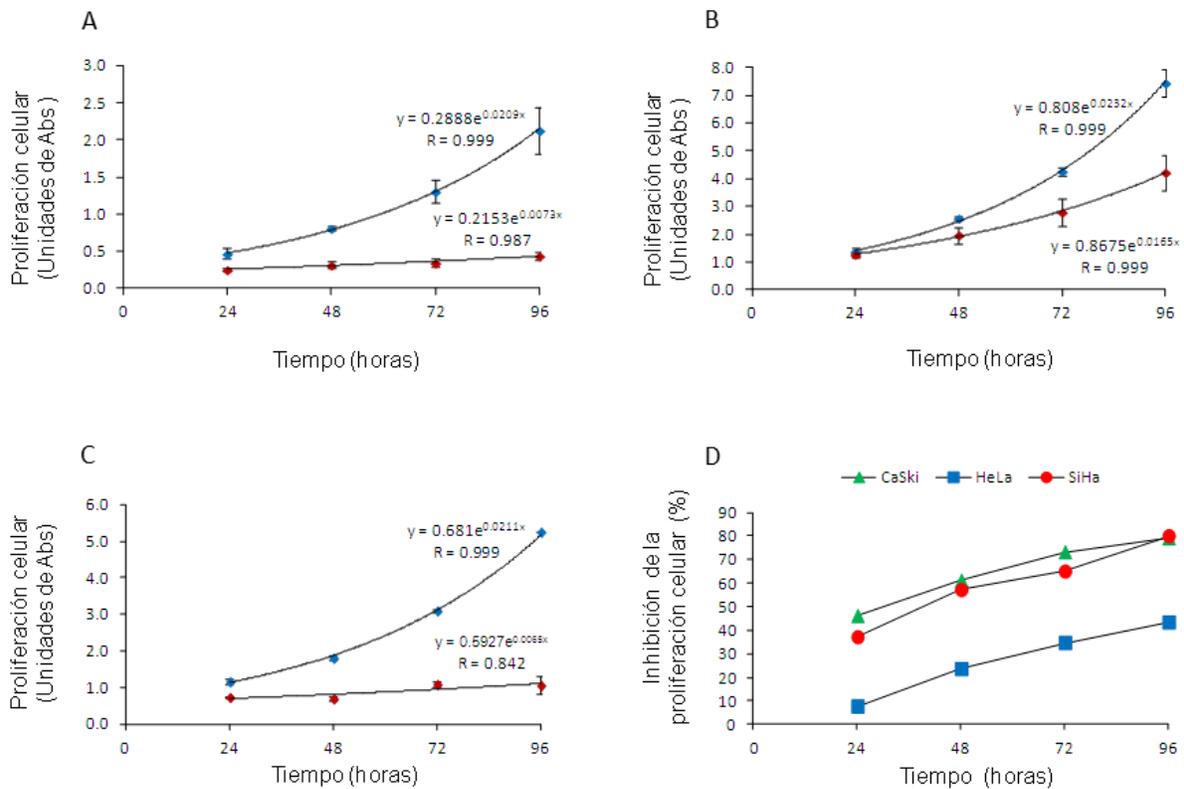


**Figura 3. Detección de la proteína CDKN3 por inmunofluorescencia y Western blot en líneas celulares derivadas de CC transfectadas con siRNAs específicos contra CDKN3 o siRNAs control.** Las líneas celulares derivadas de cáncer cervical (CC) positivas para el VPH16 (CaSki, SiHa) y VPH18 (HeLa) se transfectaron con siRNAs específicos contra *CDKN3* o siRNAs aleatorios control. (A) Se observa la tinción por inmunofluorescencia para la proteína CDKN3 en las líneas celulares usando un anticuerpo primario anti-CDKN3 y un anticuerpo secundario-FITC. Las imágenes fueron fotografiadas a 60× (Microscopio de fluorescencia Olympus FV 1000, cámara CCD). (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las células teñidas con anticuerpo anti-CDKN3. Los valores representan la media  $\pm$  S.D. de 140 campos medidos en cada experimento. (C) Expresión de la proteína CDKN3 mediante western blot en las líneas celulares transfectadas con siRNAs control (-) y específicos contra CDKN3 (+), su utilizó actina como control interno.



**Figura 4. Especificidad del anticuerpo secundario.** Las líneas celulares derivadas de cáncer cervical (CC) positivos para el VPH16 (CaSki, SiHa) y VPH18 (HeLa) se transfectaron con siRNAs específicos contra CDKN3 y siRNAs aleatorios control. Las células se cosecharon a las 96 h después de la transfección. Como control negativo de la técnica de inmunofluorescencia, las células se tiñeron como en la Figura 3, pero sin el anticuerpo primario contra CDKN3. Las imágenes fueron fotografiadas a 60 × magnificación utilizando el microscopio de fluorescencia Olympus VF 1000.

Las líneas celulares transfectadas con siRNAs control mostraron un crecimiento exponencial típico, lo que indica que la transfección con los siRNAs control no afecta el crecimiento celular (diamantes azules en la figura 5A, 5B y 5C). En contraste, la proliferación de las células disminuyó significativamente en las tres líneas celulares después de que fueron transfectadas con siRNAs específicos contra *CDKN3* (diamantes rojos en la Figura 5A, 5B y 5C). La inhibición del crecimiento celular se observó a partir del primer tiempo considerado (24 horas) en las líneas celulares CaSki y SiHa (Figura 5A y 5C, pero no en la línea celular HeLa (Figura 5B), esta inhibición incrementa de manera lineal conforme incrementa el tiempo de incubación (Figura 5D). El nivel más alto de inhibición se alcanza a las 96 horas, el último punto de tiempo medido. El mayor porcentaje de inhibición se observó en SiHa (80%), a continuación en CaSki (79%) y finalmente en HeLa (43%) (Figura 5D). En consecuencia, el tiempo de duplicación celular aumentó en las tres líneas celulares, principalmente en la línea celular SiHa, en donde el tiempo de duplicación se triplica (Tabla 6), por lo tanto se puede concluir que el gen *CDKN3* participa en la proliferación de las líneas celulares estudiadas.



**Figura 5. Curvas de proliferación celular de líneas celulares derivadas de CC transfectadas con siRNAs específicos contra *CDKN3* o siRNAs control.** Las líneas celulares derivadas de cáncer cervical (CC) positivas para el VPH16 (CaSki, SiHa) y VPH18 (HeLa) se transfectaron siRNAs específicos contra *CDKN3* (diamantes azules) o siRNAs aleatorios control (rombos rojos). Las células se cosecharon a las 24, 48, 72, y 96 horas post transfección. La proliferación celular se midió utilizando el método de MTT, y se leyeron las placas con un espectrofotómetro a 540 nm. En cada panel se muestran la media  $\pm$  desviación estándar de triplicados, la línea de tendencia de crecimiento, y las ecuaciones del modelo de crecimiento exponencial para CaSki (panel A), HeLa (panel B) y SiHa (panel C). El crecimiento celular sigue una tendencia exponencial predicha por la ecuación  $y_t = y_0 * e^{rx}$ , donde  $y_t$  = absorbancia a un tiempo específica,  $x$  = tiempo de incubación en horas,  $y_0$  = constante de la absorbancia en el tiempo = 0, y  $r$  = tasa de crecimiento. En el panel D, se calculó el porcentaje de inhibición de la proliferación celular de las líneas celulares CaSki, HeLa y SiHa a las 24, 48, 72 y 96 h después de la transfección. En cada punto de tiempo, se grafica la absorbancia promedio de triplicados de las células transfectadas con siRNAs específicos contra *CDKN3*, considerando las células transfectadas con siRNAs control, como proliferación del 100%.

**Tabla 6. Incremento en el tiempo de duplicación en las células transfectadas con siRNAs específicos contra *CDKN3*.**

Línea celular	Tiempo de duplicación <sup>a</sup> (horas)		Tasa de duplicación <sup>d</sup>
	siRNA Control <sup>b</sup>	siRNA <i>CDKN3</i> <sup>c</sup>	
CaSki	33.2	95.0	2.8
HeLa	29.9	42.0	1.4
SiHa	32.9	106.6	3.2

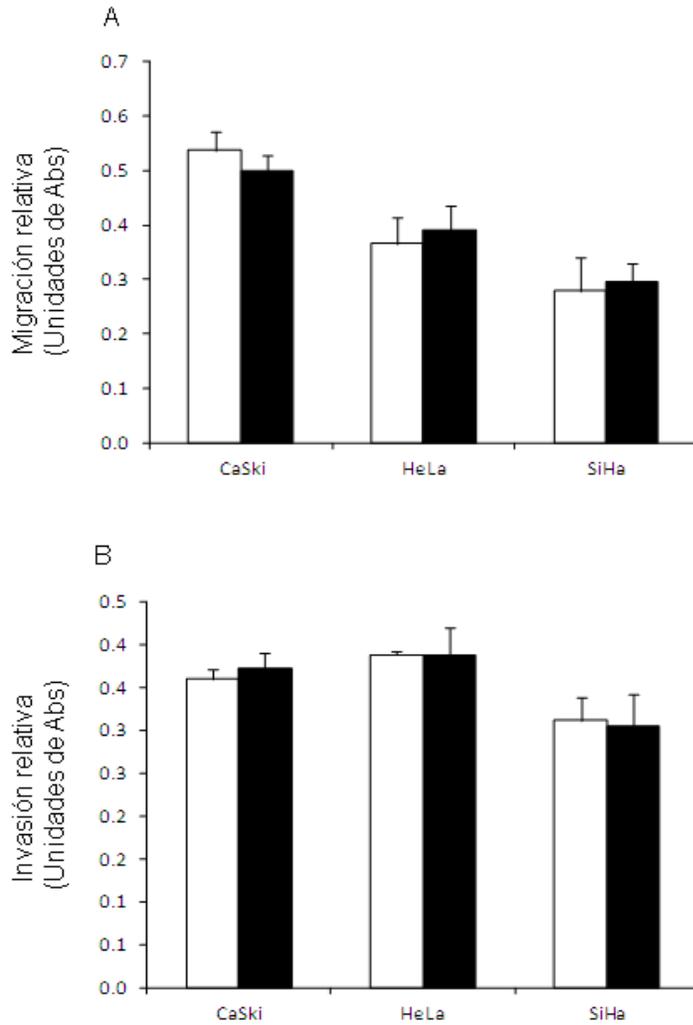
a. Calculado usando la ecuación de crecimiento exponencial proveniente en cada célula de la figura 4.

b. Células transfectadas con una mezcla de 3 siRNAs aleatorios.

c. Células transfectadas con una mezcla de 3 siRNAs específicos contra *CDKN3*

d. Tasa de duplicación = (siRNA *CDKN3*/siRNA Control).

La capacidad de migrar e invadir observada en cada una de las líneas celulares transfectadas con siRNAs específicos contra *CDKN3* fue similar a la capacidad de migrar e invadir en las células transfectadas con siRNAs control (Figura 6). Esto indica que la disminución de la expresión génica *CDKN3* no afecta a la capacidad de migración e invasión, al menos en estas tres líneas celulares exploradas.



**Figura 6. Migración e invasión celular de líneas celulares derivadas de CC transfectadas con siRNAs específicos contra *CDKN3* o siRNAs control.** Las líneas celulares fueron transfectadas con siRNAs específicos contra *CDKN3* (barras negras) o siRNAs aleatorios control (barras blancas). Las células se cosecharon a las 48 horas post transfección. Los ensayos de migración celular (panel A) e invasión celular (panel B) se realizaron en placas de 24 pozos con insertos de policarbonato y con insertos de Matrigel, respectivamente. Después del tiempo de incubación, las células que migraron a través de los filtros o invadieron a través de las membranas de Matrigel se cosecharon y se cuantificaron con el ensayo colorimétrico MTT. La figura muestra la media  $\pm$  SD de los experimentos.

## 6.4 Análisis de las variantes de mRNA y proteína de gen *CDKN3*

Las variantes del mRNA del gen *CDKN3* fueron analizadas en 45 tumores, 22 controles, y las tres líneas celulares con RT-PCR. Los diferentes transcritos que se obtienen por “splicing” alternativo (transcritos variantes) se identificaron por electroforesis o secuenciación de las bandas de cDNA amplificado, o ambos. El producto de transcripción normal del gen *CDKN3* (wt*CDKN3*) se encontró en todos los tumores y líneas celulares, así como la mayoría de los controles (86.3%) analizados (Tabla 7). El transcrito wt*CDKN3* corresponde a la banda superior de 756 pb (variante "a") en el panel A de la Figura 6. Se detectó una segunda banda justo debajo de la banda del transcrito wt*CDKN3* pero no corresponde a ningún producto de transcripción del gen *CDKN3* de acuerdo al análisis de alineación de secuencia de este producto de cDNA (datos no mostrados). Por debajo de estas bandas, se observaron bandas tenues en algunas muestras y líneas celulares (panel A de la figura7). Para amplificar estas bandas, se realizó una RT-PCR anidada utilizando oligos internos (F2 y R5 en la Tabla 2, panel B). En el panel B se observa el transcrito del gen wt*CDKN3* (721 pb) como banda principal, pero en muchas muestras, incluyendo las líneas celulares, se observan varias bandas de tamaño más bajo. Cinco de estas bandas (<200, 200, 400, 450, y 500 pb) fueron secuenciadas (Figura 7) y nombradas como variantes cx2, cx1, cx3, cx4, cx5 y, respectivamente, en la Figura 7. Tres de estas variantes excluyen los exones VII y VIII del marco de lectura abierto (ORF); uno por splicing (cx1) y dos por la presencia de codones de terminación temprano (cx4 y cx5, figura 8A). La variante cx2 excluye al exón VII por splicing y sólo la variante cx3 presenta los exones VII y VIII dentro del ORF. Estos dos exones, junto con la porción N-terminal de la proteína CDKN3 están involucrados en la interacción con la proteína CDK2 [25]. Aunque se observaron diferencias en cuanto a las frecuencias de éstas cinco variantes entre tumores con CC y

controles, y entre las pacientes vivas y muertas, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 7).

De los transcritos previamente reportados ([28], Tabla 7), solo se identificaron, además del transcrito wtCDKN3, el transcrito "f" (panel C en la Figura 7), el transcrito "i" (panel D en la figura 7), y el transcrito "k" (panel E en la Figura 7) tanto en tumores, como en controles, y en las líneas celulares. Junto con el transcrito "f" (453 pb), en la mayoría de las muestras y líneas celulares, se detectó una segunda banda de 370 pb (cx6, Figura 8) que no había sido reportada previamente, esta banda se observa con una intensidad similar a la intensidad de la banda "f". El transcrito correspondiente a esta banda, presenta un codón de terminación temprano que excluye los exones V, VI, VII, y VIII del ORF (Figura 8). La frecuencia de todos los transcritos encontrados fue similar en los tumores y controles, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, la intensidad de señal de todos los transcritos, principalmente el transcrito wtCDKN3 y exceptuando el transcrito "i", fue más débil en los controles respecto a los tumores (Figura 7 paneles A, B, C, y E). La intensidad de señal en el transcrito "i" fue similar en los tumores y los controles (Figura 7 Panel D). Los oligos y las sondas TaqMan utilizados para la qPCR se localizan en los exones VI y VII de la secuencia del gen *CDKN3*, y estos exones están presentes solamente en los transcritos "a" e "i"; por lo tanto, la diferencia en la expresión encontrada en *CDKN3* entre los tumores y controles mediante qPCR representa principalmente las variaciones debidas al transcrito "a". Los transcritos del gen *CDKN3* se exploraron en las líneas celulares transfectadas con siRNAs inespecíficos (bandas marcadas como "-" en la Figura 7) o siRNAs específicos contra *CDKN3* (bandas marcadas como "+" en la Figura 7). En estos experimentos, sólo la banda del transcrito wtCDKN3 (marcado con una flecha en la Figura 7A) disminuyó después de la transfección con siRNAs específicos contra *CDKN3*

en comparación con los siRNAs inespecíficos. La proteína de CDKN3 se analizó mediante western blot en las tres líneas celulares transfectadas con siRNAs e inespecíficos y específicos contra *CDKN3*; solo se detectó la banda correspondiente a la proteína “wild type” en estos experimentos (34 kDa, Figura 3C). Igual que en el caso de la medición del mRNA de CDKN3, observamos que la proteína wtCDKN3, disminuye después de la transfección con siRNAs específicos (Figura 3C). Estos datos coinciden con los resultados observados en el análisis de inmunofluorescencia (Figura 3A).

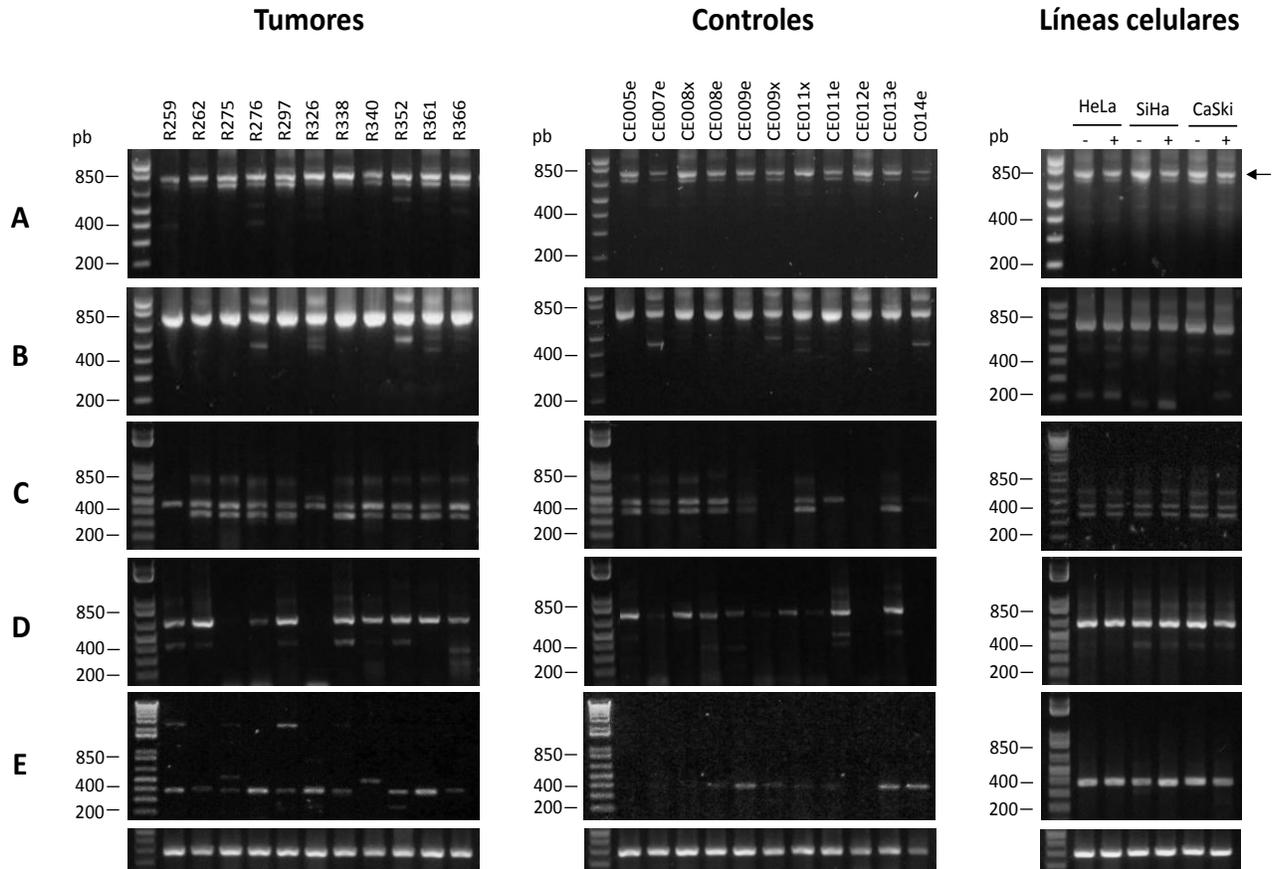
**Tabla 7. Frecuencia de las diferentes variantes de mRNA del gen *CDKN3*.**

Variantes de mRNA <sup>a</sup>	Frecuencia (%)				
	Tumores			Líneas celulares (n=3) <sup>b</sup>	Epitelio normal cervical (n=22)
	Pacientes muertas (n=16)	Pacientes vivas (n=29)	Todas las pacientes (n=45)		
a <sup>c</sup>	16 (100)	29 (100)	45 (100)	3 (100)	19 (86.3)
b	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
c	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
e	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
f	16 (100)	26 (89.6)	42 (93.3)	3 (100)	19 (86.4)
i	13 (81.3)	29 (100)	42 (93.3)	3 (100)	21 (95.5)
k	13 (81.3)	26 (89.6)	39 (86.7)	3 (100)	15 (68.2)
cx1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33.3)	1 (4.5)
cx2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33.3)	0 (0)
cx3	0 (0)	4 (13.8)	4 (8.9)	0 (0)	2 (9.1)
cx4	5 (31.3)	4 (13.8)	9 (20)	0 (0)	1 (4.5)
cx5	1 (6.3)	8 (27.6)	9 (20)	0 (0)	3 (13.6)
cx6	14 (93.3)	24 (88.9)	38 (90.5)	3 (100)	19 (86.4)

a. Las variantes a, b, c, e, f, i, y k han sido reportadas previamente en otros tipos de cáncer, mientras que las variantes cx1–cx6 se reportan por primera vez. Las variantes cx1–cx5 fueron amplificadas en una RT-PCR anidada usando una dilución 1:5 del product de RT-PCR de la variante a. La variante cx6 fue amplificada simultaneamente usando el mismo juego de oligos que para la variante f.

b. Las líneas celulares exploradas fueron CaSki, HeLa, and SiHa.

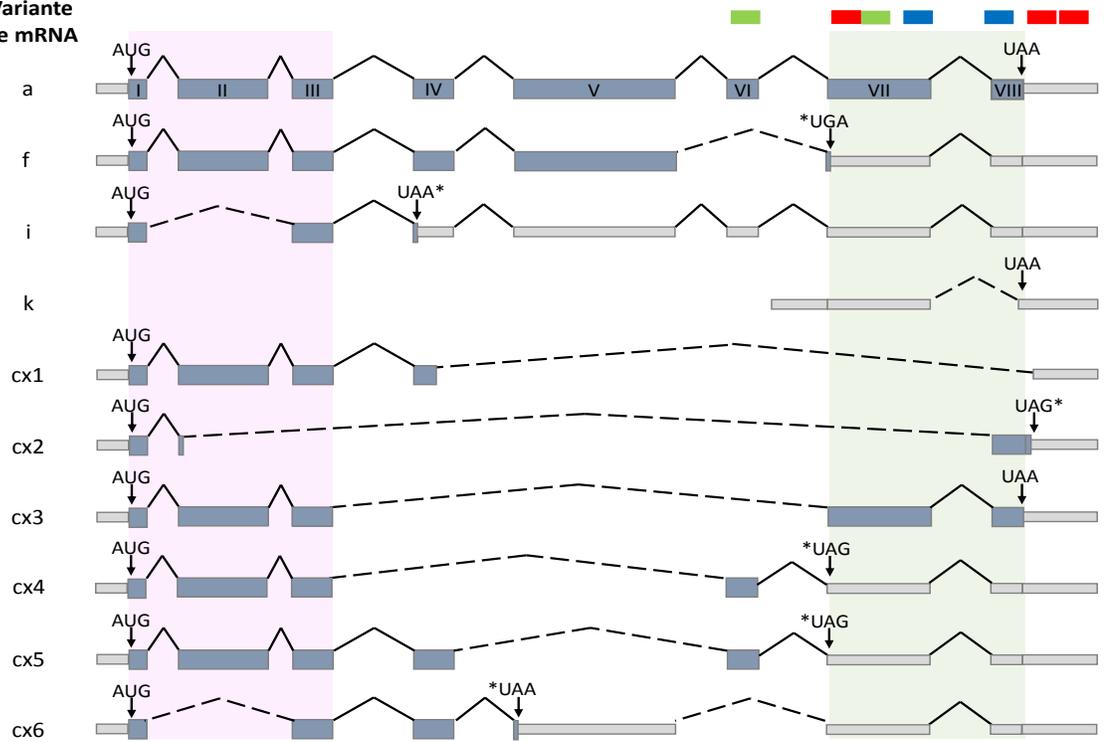
c. La variante "a" es el transcrito normal (wild type, wt) del gen *CDKN3*.



**Figura 7. Análisis de los transcritos de *CDKN3*.** La figura muestra la electroforesis en gel de las variantes del mRNA del gen *CDKN3* identificadas en muestras con CC, controles y líneas celulares mediante PCR inversa (RT-PCR). En los paneles A y B se observa la variante normal (wt) del mRNA de *CDKN3*. (A) Esta RT-PCR se realizó con los oligos externos F1 / R1 (756 pb, flecha negra). (B) Se observa el producto de RT-PCR re-amplificado de la PCR anterior utilizando los oligos F2 / R5 (RT-PCR anidada); en algunas de las muestras, se observan otras bandas débiles debajo del transcrito wtCDKN3 (721 pb) denominadas variantes cx1, cx2, cx3, cx4, y cx5 (200, <200, 400, 450, y 500 pb, respectivamente). (C) Producto de RT-PCR utilizando los oligos F1 / R9f que corresponde a la variante "f" (453 pb); en la mayoría de las muestras se observa una banda inferior adicional (variante cx6, 370 pb). (D) Producto de RT-PCR utilizando los oligos F6i / R5 que corresponde a la variante "i" (633 pb). (E) Producto de RT-PCR utilizando los oligos F4 / R5 que corresponde a la variante "k" (392 pb). En el panel inferior se observa el producto de RT-PCR correspondiente al gen "gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa" (GAPDH) como control interno. Las líneas celulares fueron transfectadas con siRNAs inespecíficos (-) o específicos contra CDKN3 (+). La RT-PCR en las líneas celulares se realizó en RNAs extraídos 48 h después de las transfecciones.

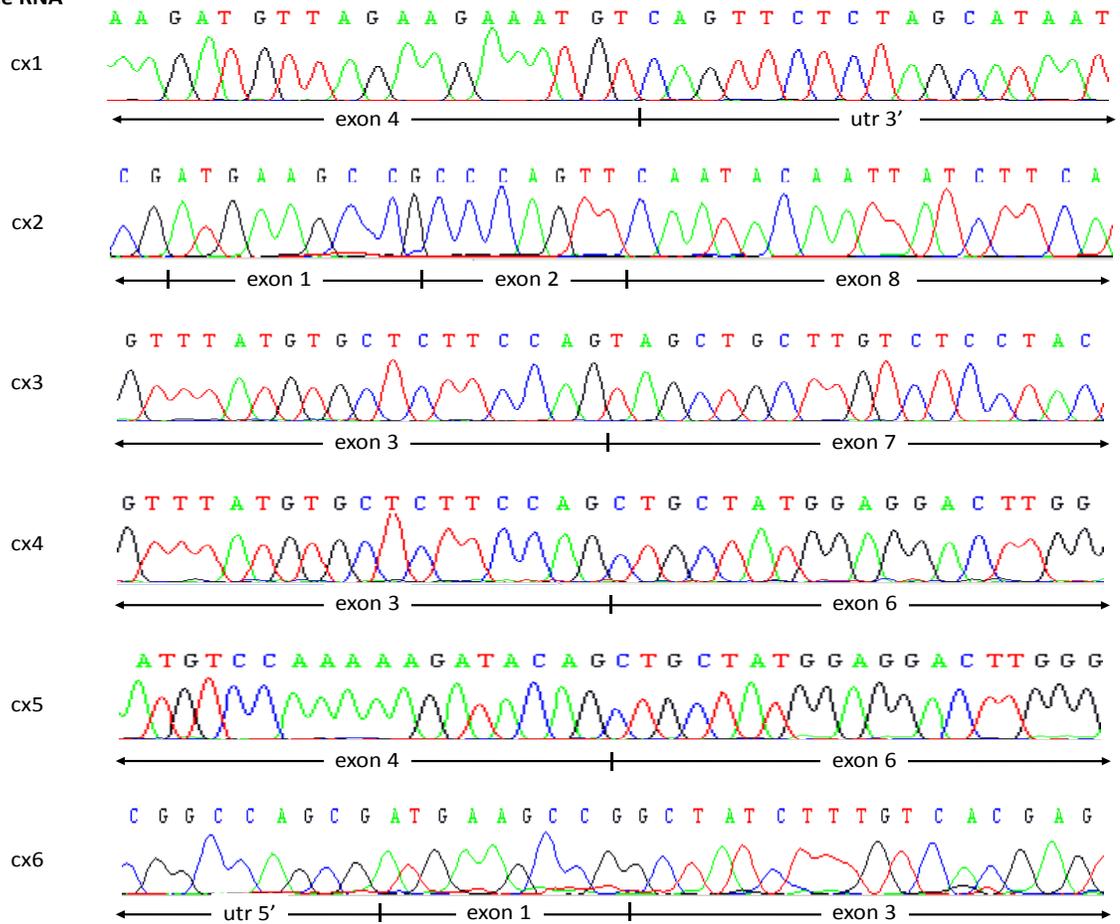
A

Variante de mRNA



B

Variante de RNA

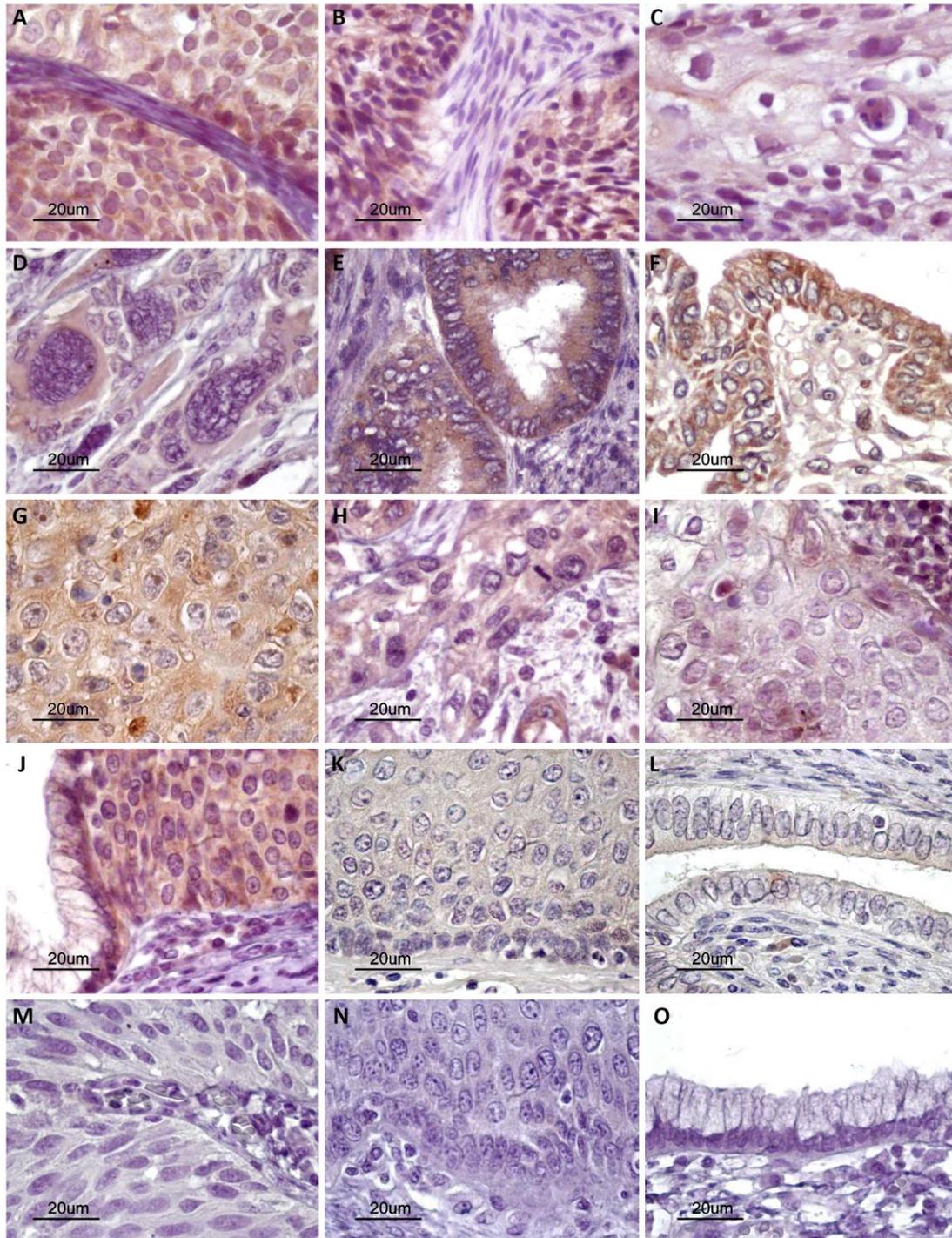


**Figura 8. Análisis de secuenciación de transcritos de CDKN3.** Todas las variantes del gen CDKN3 encontrados en las muestras analizadas fueron secuenciadas. (A) Representación gráfica de los resultados de secuenciación de las variables detectadas en las muestras; se incluyen exones, intrones, splicings alternativos, y codones de terminación. La variante "a" representa el transcrito normal "wild type" (wt) del mRNA de *CDKN3*, las variantes f, i, y k son transcritos previamente reportados que también fueron detectados en nuestras muestras. Se muestran también las representaciones de las variantes que se detectaron en nuestras muestras y que no habían sido reportadas previamente (cx1, cx2, cx3, cx4, cx5 y cx6), estos esquemas se construyeron de acuerdo a la secuenciación que se muestra parcialmente en (B). Los rectángulos grises representan los extremos 3'UTR, 5'UTR y las secuencias no traducidas, los rectángulos azules representan exones codificables, las líneas continuas representan a los intrones, las líneas punteadas representan los empalmes alternativos. Se muestran los codones de inicio (AUG) en cada caso y los codones de terminación normal (UAA) y aquellos generados por splicing alternativo (\*). La región sombreada con un rectángulo rosa en el extremo 5' representa la región codificante de los primeros 34 aminoácidos necesarios para la interacción con CDK2. La región sombreada con un rectángulo verde en el extremo 3' representa la porción carboxilo terminal de CDKN3, que participa en la estabilización de la interacción CDK2. Las barras verdes, azules y rojas mostradas arriba de las variantes en (A), representan los sitios de reconocimiento de las sondas TaqMan, el sitio de reconocimiento del anticuerpo anti-CDKN3 y los sitios de reconocimiento de los siRNA contra CDKN3, respectivamente.

## **6.5 Localización celular de la proteína CDKN3 en líneas celulares, muestras de CC y muestras normales de cérvix, mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica**

Es muy interesante notar que la proteína CDKN3 se encontró localizada exclusivamente en el citoplasma de las células en las tres líneas celulares exploradas por inmunofluorescencia (Figura 3A). Para investigar la localización celular de la proteína en los tumores invasores y en muestras de cuello uterino normal, se realizó la búsqueda de la proteína CDKN3 por inmunohistoquímica en 37 tumores invasores y en 21 controles. El porcentaje de tumores positivos para CDKN3 fue de 89,2%, aunque la mayoría de los controles presentaron señal de CDKN3 (80%), las señales fueron mucho más débiles de lo que se observa en los tumores ( $\leq 1+$ ). Esta diferencia en la positividad fue consistente con los datos obtenidos con la qRT-PCR. Se observó señal tanto en el citoplasma, como en el núcleo; sin embargo, en los tumores positivos para el virus VPH16 (n = 22) la señal fue más fuerte (3+ vs. 1+) y

fue predominantemente en el citoplasma en lugar de en el núcleo ( $64,5 \pm 33,2$  vs.  $39 \pm 37\%$ ,  $p < 0,05$ , prueba t, Figura 9, paneles A-F). En los tumores positivos para otros tipos de VPH ( $n = 15$ ), la señal fue más débil de lo que se observa en los tumores positivos para VPH16 (1+ vs. 3+); sin embargo, la distribución fue similar en el citoplasma y el núcleo ( $66,7 \pm 42$  y  $74 \pm 27\%$ , Figura 9, paneles G-I).



**Figura 9. Análisis histológico de la expresión de la proteína CDKN3.** Se determinó la expresión de la proteína CDKN3 por inmunohistoquímica utilizando secciones de tejido incluidas en parafina fijado en formol. Se muestran experimentos representativos en carcinomas de células escamosas positivos para VPH16 (A-D) y en adenocarcinomas (E y F); también en carcinomas de células escamosas positivos para otros tipos de virus (G-I). La señal específica para la proteína CDKN3 se observa de color marrón (contra teñido con hematoxilina, aumento original  $\times 800$ ; barras 20 micras). Se muestran lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (J), epitelio cervical normal (K y L) y los controles experimentales sin anticuerpo primario (M-O).

## 7. DISCUSIÓN

En este estudio, hemos demostrado que alrededor del 70% de las pacientes con CC que presentan sobre expresión del gen *CDKN3* mueren dentro de los dos años siguientes al diagnóstico, independientemente de la etapa clínica en la que se encuentren y el tipo de VPH identificado. También se encontró que la inactivación o inhibición parcial de la expresión génica de *CDKN3* disminuye drásticamente la proliferación de líneas células derivadas de CC *in vitro*. Con base en los resultados del estudio, podemos concluir que el nivel de expresión de mRNA de *CDKN3* podría ser un buen marcador predictivo para evaluar la sobrevida de las pacientes, así como la agresividad del tumor. También podemos concluir que el gen *CDKN3*, a nivel de mRNA, podría ser un buen blanco terapéutico para la inhibición del crecimiento tumoral. En otros estudios, se han identificado varios genes, como probables marcadores y se han asociado con una disminución en la sobrevida de las pacientes con CC, entre ellos se encuentran: cinasa LIM 1 [34], galectina 7 [35], miRNA-224 [36], NF-kB [37] y caspasa 3 [38]. Sin embargo, ninguno de estos marcadores se ha asociado con una tasa de mortalidad global mayor del 45%, en comparación con el 70% reportado para *CDKN3* en este estudio, aunque estas diferencias podrían depender de las diferentes poblaciones estudiadas, la variación entre los marcadores propuestos y *CDKN3* es grande.

La asociación de *CDKN3* con una disminución de la sobrevida en las pacientes con CC y la relación con la observada función indispensable de proliferación celular indican claramente que este gen podría estar implicado en la progresión del CC. La inhibición parcial de este gen (35-50%) sugiere que su implicación en la progresión tumoral puede deberse a la inducción de la proliferación celular a través de una acción directa sobre el ciclo celular. Aunque nuestros resultados no hayan mostrado efecto de la participación del

gen *CDKN3* en la migración y la invasión tumoral, no podemos descartar completamente su participación en estos eventos, ya que otras señales, no relacionados con *CDKN3*, pueden ser fundamentales para la regulación de la migración celular y la invasión en el CC [39, 40]. El gen *CDKN3* se ha encontrado sobre expresado en diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, próstata, ovario, pulmón, renal, glioblastoma, hígado, neuroendocrino y cánceres orales [24, 41 - 48]. De acuerdo con nuestros datos, la sobre expresión de *CDKN3*, junto con otros genes, se ha asociado con una menor sobrevida en los pacientes con cáncer de pulmón [43] y con astrocitoma [26]. Además, la inhibición de *CDKN3* en muchas líneas celulares disminuye la proliferación celular, lo que sugiere que este gen actúa como un oncogén [49]. Sin embargo, también se ha asociado la sobreexpresión de *CDKN3* con la inhibición de la proliferación celular en glioblastoma [23, 45] y en líneas celulares derivadas de leucemia [50]. Además, *CDKN3* se ha propuesto como un gen supresor de tumor en tumores cerebrales [23, 26] y se ha reportado su participación en el control de la mitosis [23]. De hecho, la proteína *CDKN3* se une a *Cdk2* y la desfosforila en la posición Thr160 degradando la subunidad ciclina asociada. Debido a que la fosforilación de Thr160 es necesaria para la actividad completa de *Cdk2* y la consecuente progresión del ciclo celular, la desfosforilación de Thr160 inhibe la progresión del ciclo celular [23]. Sin embargo, en algunos tumores, algunas proteínas aberrantes de *CDKN3* generadas por splicing alternativo, pueden competir con la proteína *wtCDKN3* por el sitio de unión a *Cdk2*, evitando así la desfosforilación de la posición Thr160 [25, 26]. En el presente estudio, no encontramos transcritos mutados de *CDKN3* y en todas las muestras de CC y líneas celulares analizadas, encontramos predominantemente el transcrito *wtCDKN3*; sin embargo, en algunas muestras y en las líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix, se identificaron transcritos variantes del mRNA reportados previamente

(variantes f, i, y k) y nuevas variantes de mRNA generados por splicing alternativo, con codones de terminación tempranos. Sin embargo, fueron escasos y se detectaron sólo después de realizar una PCR anidada. De hecho, en el análisis de proteína por western blot en las líneas celulares, sólo se detectó la proteína “wild type”. Aunque no pudimos explorar la proteína CDKN3 en muestras tumorales por western blot, los datos observados en las líneas celulares y el predominio de la variante del mRNA *wtCDKN3* en los tumores, sugiere que era la proteína CDKN3 será la que se encuentre predominantemente en las muestras de CC y en las líneas celulares. Por lo tanto, el mecanismo de la inhibición mediada por la competencia entre las variantes de mRNA parecería estar ausente en CC. Por otro lado, las oncoproteínas del VPH de alto riesgo estimulan a las células para salir de la fase G1 y entrar en el ciclo celular mediante la promoción de la inhibición o degradación de las proteínas RB, p53, y p27. Sin embargo, no hay evidencia de que estas proteínas virales también inhiban a la proteína CDKN3.

En este estudio, hemos demostrado de manera concluyente que la proteína CDKN3 se encuentra exclusivamente en el citoplasma de las tres líneas celulares derivadas de CC exploradas. En los tumores de CC, también se observó principalmente en el citoplasma, aunque la señal de la proteína también puede observarse en el núcleo. El agotamiento de CDKN3 en el núcleo o su reubicación hacia el citoplasma, parecería ser un mecanismo compensatorio para evitar la desfosforilación de CDK2 por CDKN3; de hecho, los resultados preliminares no mostraron cambios en la proporción de proteína fosforilada y no fosforilada en la posición Thr160 de CDK2 en las líneas celulares transfectadas con siRNAs específicos contra *CDKN3* o con los siRNAs no específicos (datos no mostrados). No se sabe si este traslado de CDKN3 al citoplasma está relacionada con las proteínas virales o

es un mecanismo de regulación de las células cancerosas que confiere una ventaja selectiva de crecimiento.

Es relevante que el transcrito *wtCDKN3* fue el que disminuyó después de transfectar las líneas celulares de cáncer cervical con los siRNAs específicos, como se muestra en la Figura 6. Estos resultados sugieren que la disminución del transcrito *wtCDKN3* y la proteína correspondiente, que se encuentra principalmente en el citoplasma, este relacionada con la inhibición o disminución de la proliferación celular in vitro; aunque no se descarta que otras funciones no relacionadas con la inhibición de CDK2 puedan estar involucrados. De hecho, la proteína CDKN3, que es una proteína fosfatasa de doble especificidad perteneciente al grupo de fosfatasas Cdc14, también parece ser esencial en la regulación de la salida de mitosis; interactúa con CDK1 (CDC2) e inhibe su actividad, y desfosforila muchas de las proteínas fosforilados por CDK1 [23, 49]. CDKN3 y otras fosfatasas Cdc14 parecen ser esenciales como antagonistas de la actividad de CDK en la fase tardía de la mitosis, permitiendo que las células salgan de mitosis y entren a citocinesis. La regulación de la citocinesis puede ser una función conservada de las fosfatasas Cdc14 [23]. Por lo tanto, la inhibición del gen *CDKN3* impediría la salida de la fase M, para iniciar un nuevo ciclo celular. Sin embargo, todavía es necesario demostrar citometría de flujo (FACs), cuál de las fases del ciclo celular se altera cuando se disminuye la expresión de *CDKN3*. En los modelos en donde *CDKN3* funciona como un gen supresor de tumores, como por ejemplo, en la línea celular leucémica K562, la sobre expresión de *wtCDKN3* retrasa la transición G1/S, pero no tiene efecto significativo en la transición de G2/M/G1 [50]. Es importante esclarecer el papel de *CDKN3* en el cáncer de cuello uterino para poder diseñar estrategias adecuadas en donde se proponga como blanco terapéutico.

Es muy prometedor el uso potencial del perfil de expresión de *CDKN3* para seleccionar aquellas pacientes que necesitaran de tratamientos más agresivos, por ejemplo, a aquellas pacientes con altos niveles de expresión de *CDKN3* ( $FC \geq 17$ ), se podrían proponer tres opciones de tratamiento adicionales. En primer lugar, la inclusión de la quimioterapia neoadyuvante con paclitaxel y carboplatino [51, 52], en segundo lugar, el uso de bloqueadores de angiogénesis, tales como bevacizumab [53, 54], y en tercero, el uso de inhibidores del receptor de factor de crecimiento epidérmico como erlotinib [55] . Sin embargo, se requiere de los ensayos clínicos pertinentes para investigar el valor clínico de la medición del mRNA de *CDKN3* y considerarlo como un indicador para el uso de la quimioterapia neoadyuvante o la terapia adicional específica en CC.

Varios factores hacen de *CDKN3* un blanco potencial para el tratamiento de CC. En primer lugar, *CDKN3* se sobre expresa en los tumores de pacientes con CC, en promedio 6 veces más que en mujeres con epitelio cervical sano. En segundo lugar, *CDKN3* está involucrado en la mitosis. En tercer lugar, la inhibición de la expresión génica de *CDKN3* reduce la proliferación celular en un promedio de 67% en las líneas celulares derivadas de CC. Es importante señalar que a pesar de haber obtenido una reducción en aproximadamente la mitad del mRNA de *CDKN3* y en la expresión de la proteína, al inhibir con siRNAs específicos, la reducción de la proliferación fue en promedio de 67%. Esto sugiere que una mayor inhibición de *CDKN3* aumentaría la reducción en la proliferación. Aunque la inhibición de *CDKN3* no parece tener efecto sobre la migración y la invasión de las líneas celulares derivadas de CC, el efecto en la disminución de la proliferación celular por sí solo hace de *CDKN3* un potencial blanco terapéutico. De hecho, si pudiéramos bloquear la proliferación celular al 100%, de manera secundaria bloquearíamos la migración y la invasión, ya que no habría células para migrar e invadir. Por otra parte, no hay fármacos contra el cáncer que

bloquen específicamente todos los procesos biológicos relacionados con el cáncer, sin embargo, pese a baja especificidad, muchos se usan actualmente para tratar a los pacientes [56, 57]. Sin embargo, no sabemos si el efecto de la inhibición de *CDKN3* en la proliferación celular *in vitro*, se podrá reflejar en la reducción del crecimiento tumoral en un modelo de ratón. Por otra parte, tampoco se conoce el efecto de la inhibición de *CDKN3* en la proliferación de células normales (no neoplásicas), aunque, debido a que *CDKN3* se sobre expresa en las células cancerosas, se espera que su efecto en las células normales sea mínimo. El uso de siRNAs específicos para bloquear o inhibir la actividad de genes, es una metodología bien establecida en modelos *in vitro*, particularmente usados para investigar la función de genes [58 - 60]; sin embargo, el uso de siRNAs como agentes terapéuticos en modelos de tumor no ha sido satisfactorio, especialmente en modelos de cánceres invasivos o metastásicos [61, 62]. La primera etapa para diseñar o identificar fármacos selectivos o específicos contra el cáncer es identificar blancos presentes en tejidos cancerosos y ausentes en los tejidos normales; claramente, *CDKN3* parece ser un buen blanco en el caso de pacientes con CC, pero se necesitan más estudios para identificar o desarrollar ya sea un fármaco que inhiba específicamente a *CDKN3* en las células neoplásicas o una estrategia para la administración sistémica efectiva para introducir siRNAs específicos contra *CDKN3* en células cancerígenas [63].

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados que se presentan en este estudio pueden ayudar a desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento del CC. Se ha demostrado que alrededor del 70% de las pacientes con CC que sobre expresan el gen *CDKN3* mueren dentro de los dos años posteriores al diagnóstico, independientemente de la etapa clínica y el tipo de VPH. También se encontró que la inactivación o inhibición parcial de la expresión génica de *CDKN3* disminuye drásticamente la proliferación de células derivadas de CC *in vitro*. El uso potencial del perfil de expresión de *CDKN3* para seleccionar los pacientes que necesitan ser tratados con un tratamiento más agresivo es muy prometedor. Por otro lado, como *CDKN3* parece ser indispensable para la proliferación de células de cáncer, podría ser un buen blanco terapéutico para la inhibición del crecimiento tumoral.

## 9. PERSPECTIVAS

Además de los trabajos realizados por nuestro equipo de trabajo [21, 64], solo se encuentra un reporte en donde se asocia la sobreexpresión de CDKN3 y CC [65]. Sin embargo, es un hecho que el gen *CDKN3* se puede utilizar como biomarcador de sobrevida, ya que en este estudio se muestra cómo disminuye la sobrevida de manera significativa en las pacientes con CC independientemente del estadio clínico y el tipo viral. Para determinar si dependiendo del nivel de expresión del gen *CDKN3* las pacientes con CC pueden verse beneficiadas con tratamientos alternativos o más agresivos comparados con las terapias convencionales, será necesario hacer los ensayos clínicos correspondientes. Del mismo modo, para evaluar el papel del gen como blanco terapéutico, es necesario realizar modelos en ratón, que permitan conocer si el efecto de la inhibición del mensajero de *CDKN3* se mantiene en condiciones *in vivo*, y desarrollar estrategias experimentales que permitan introducir los siRNAs de manera sistémica o desarrollar fármacos que inhiban selectivamente a *CDKN3*. Así como también se deberá evaluar el efecto que tiene la inhibición del gen *CDKN3* en células normales.



- cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomized, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol* 2012;13(1):89-99. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70286-8. PMID: 22075171
8. Romanowski B. Long term protection against cervical infection with the human papillomavirus: review of currently available vaccines. *Hum Vaccine* 2011;7:161-9. PMID: 21307652
  9. Cuzick J. Long-term cervical cancer prevention strategies across the globe. *Gynecol Oncol* 2010;117(2 Suppl):S11-4. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.01.025 PMID: 20129652
  10. Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, Chesson HW, Curtis CR, Unger ER. Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2007;56(RR-2):1-24. PMID: 17380109
  11. Natunen K, Lehtinen J, Namujju P, Sellors J, Lehtinen M. Aspects of prophylactic vaccination against cervical cancer and other human papillomavirus-related cancers in developing countries. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2011;2011:675858. doi: 10.1155/2011/675858 PMID: 21785556
  12. Van de Velde N, Boily MC, Drolet M, Franco EL, Mayrand MH, Kliewer EV, et al. Population-level impact of the bivalent, quadrivalent, and nonavalent human papillomavirus vaccines: a model-based analysis. *J Natl Cancer Inst* 2012;104(22):1712-23. doi: 10.1093/jnci/djs395 PMID: 23104323
  13. Guardado-Estrada M, Juárez-Torres E, Román-Bassaure E, Medina-Martinez I, Alfaro A, Benuto RE, et al. The Distribution of High-Risk Human Papillomaviruses Is Different in Young and Old Patients with Cervical Cancer. *PLoS ONE* 2012;9(10):e109406. doi: 10.1093/jnci/djs395 PMID: 23104323

14. Andrae B, Andersson TM, Lambert PC, Kemetli L, Silfverdal L, Strander B, et al. Screening and cervical cancer cure: population based cohort study. *BMJ* 2012;344:e900. doi: 10.1136/bmj.e900. PMID: 22381677
15. Torti D, Trusolino L. Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: promises and perils. *EMBO Mol Med* 2011;3(11):623-36. doi: 10.1002/emmm.201100176 PMID: 21953712
16. Knight Z, Lin H, Shokat KM. Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nature Cancer Rev* 2010;10(2):130-7. doi: 10.1038/nrc2787 PMID: 20094047
17. Saxena R, Dwivedi A. ErbB family receptor inhibitors as therapeutic agents in breast cancer: current status and future clinical perspective. *Med Res Rev* 2012;32(1):166-215. doi: 10.1002/med.20209 PMID: 22183797
18. Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Cancer Rev* 2012;12(8):553-63. doi: 10.1038/nrc3309 PMID: 22785351
19. Bryant C, Scriven K, Massey AJ. Inhibition of the checkpoint kinase Chk1 induces DNA damage and cell death in human Leukemia and Lymphoma cells. *Molecular Cancer* 2014;13:147. doi: 10.1186/1476-4598-13-147 PMID: 24913641
20. Yu Y, Wang XY, Sun L, Wang YL, Wan YF, Li XQ, et al. Inhibition of KIF22 suppresses cancer cell proliferation by delaying mitotic exit through upregulating CDC25C expression. *Carcinogenesis* 2014;35(6):1416-25. doi: 10.1093/carcin/bgu065 PMID: 24626146
21. Espinosa AM, Alfaro A, Roman-Besaure E, Guardado-Estrada M, Palma Í, Serralde C, et al. Mitosis is a source of potential markers for screening and survival and therapeutic targets in cervical cancer. *PLoS ONE* 2013;8(2):e55975. doi: 10.1371/journal.pone.0055975 PMID: 23405241

22. Demetrick DJ, Matsumoto S, Hannon GJ, Okamoto K, Xiong Y, et al. Chromosomal mapping of the genes for the human cell-cycle proteins Cyclin-C (Ccnc), Cyclin-E (Ccne), P21 (Cdkn1) and Kap (Cdkn3). *Cytogenet Cell Genet.* 1995;69(3-4):190-2. PMID: 7698009
23. Nalepa G, Barnholtz-Sloan J, Enzor R, Dey D, He Y, Gehlhausen JR, et al. The tumor suppressor CDKN3 controls mitosis. *J. Cell Biol* 2013;201(7):997-1012. doi: 10.1083/jcb.201205125 PMID: 23775190
24. Yeh, CT, Lu SC, Chen TC, Peng CY, Liaw YF. Aberrant transcripts of the cyclin-dependent kinase associated protein phosphatase in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2000;60(17):4697-4700. PMID: 10987270
25. Yeh CT, Lu SC, Chao CH, Chao ML. Abolishment of the interaction between cyclin-dependent kinase 2 and Cdk-associated protein phosphatase by a truncated KAP mutant. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305(2):311-4. PMID: 12745075
26. Yu Y, Jiang X, Schoch BS, Carroll RS, Black PM, Johnson MD. Aberrant Splicing of Cyclin-Dependent Kinase–Associated Protein Phosphatase KAP Increases Proliferation and Migration in Glioblastoma. *Cancer Res* 2007;67(1):130-8. PMID: 17210692
27. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet* 2009;105(2):103-4. PMID: 19367689
28. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38: 357-61. PMID: 10618116
29. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+

primers. *J Clin Microbiol* 2008;46(3):1050-9. doi: 10.1128/JCM.02227-07 PMID: 18199790

30. Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Cancer Sci* 1991;82: 524–531. PMID: 1648051
31. Guardado-Estrada M, Medina-Martínez I, Juárez-Torres E, Roman-Bassaure E, Macías L, Alfaro A, et al. The Amerindian mtDNA haplogroup B2 enhances the risk of HPV for cervical cancer: de-regulation of mitochondrial genes may be involved. *J Hum Genet* 2012;57(4):269-76. PMID: 1648051
32. Thierry-Mieg D and Thierry-Mieg J. AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation, *Genome Biology* 2006;7 Suppl 1:S12.1-14. PMID: 16925834
33. Mathew M, Zaineb K, Verma R. GM-CSF-DFF40: a novel humanized immunotoxin induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Apoptosis* 2013;18(7):882-95. doi: 10.1007/s10495-013-0840-8 PMID: 23529188
34. Chhavi, Saxena M, Singh S, Negi MP, Srivastava AK, Trivedi R, et al. Expression profiling of G2/M phase regulatory proteins in normal, premalignant and malignant uterine cervix and their correlation with survival of patients. *J Cancer Res Ther* 2010;6(2):167-71. doi: 10.4103/0973-1482.65242 PMID: 20622363
35. Tsai CJ, Sulman EP, Eifel PJ, Jhingran A, Allen PK, Daevers MT, et al. Galectin-7 levels predict radiation response in squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 2013;131(3):645-9. doi: 10.4103/0973-1482.65242 PMID: 20622363
36. Shen SN, Wang LF, Jia YF, Hao YQ, Zhang L, Wang H. Upregulation of microRNA-224 is associated with aggressive progression and poor prognosis in human cervical cancer. *Diagn Pathol* 2013;8:69. doi: 10.1186/1746-1596-8-69 PMID: 23631806

37. Wu Z, Peng X, Li J, Zhang Y, Hu L. Constitutive Activation of Nuclear Factor  $\kappa$ B Contributes to Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Expression and Promotes Human Cervical Cancer Progression and Poor Prognosis. *Int J Gynecol Cancer* 2013;23(5):906-15. doi: 10.1097/IGC.0b013e318292da82 PMID: 23640294
38. Hu Q, Peng J, Liu W, He X, Cui L, Yang M, et al. Elevated cleaved caspase-3 is associated with shortened overall survival in several cancer types. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(8):5057-70. PMID: 25197379
39. Wan HY, Li QQ, Zhang Y, Tian W1, Li YN, Liu, et al. MiR-124 represses vasculogenic mimicry and cell motility by targeting amotL1 in cervical cancer cells. *Cancer Lett* 2014;355(1):148-58. doi: 10.1016/j.canlet.2014.09.005 PMID: 25218344
40. Feng M, Wang Y, Chen K, Bian Z, Jinfang Wu, Gao Q. IL-17A Promotes the Migration and Invasiveness of Cervical Cancer Cells by Coordinately Activating MMPs Expression via the p38/NF- $\kappa$ B Signal Pathway. *PLoS* 2014;9(9):e108502. doi: 10.1371/journal.pone.0108502 PMID: 25250801
41. Lee SW, Reimer CL, Fang L, Iruela-Arispe ML, Aaronson SA. Overexpression of kinase-associated phosphatase (KAP) in breast and prostate cancer and inhibition of the transformed phenotype by antisense KAP expression. *Mol Cell Biol* 2000;20(5):1723-32. PMID: 1066974
42. Li T, Xue H, Guo Y. CDKN3 is an independent prognostic factor and promotes ovarian carcinoma cell proliferation in ovarian cancer. *Oncol Rep* 2014;31(4):1825-31. doi: 10.3892/or.2014.3045 PMID: 24573179
43. MacDermed DM, Khodarev NN, Pitroda SP, Edwards DC, Pelizzari CA, Huang L, et al. MUC1-associated proliferation signature predicts outcomes in lung adenocarcinoma

patients. BMC Med Genomics 2010;3:16. doi: 10.1186/1755-8794-3-16 PMID: 20459602

44. Lai MW, Chen TC, Pang ST, Yeh CT. Overexpression of cyclin-dependent kinase associated protein phosphatase enhances cell proliferation in renal cancer cells. Urol Oncol 2012;30(6):871-8. doi: 10.1016/j.urolonc.2010.09.010 PMID: 21396835

45. Lee J, Sung CO, Lee EJ, Do IG, Kim HC, SH, Yoon SH, et al. Metastasis of neuroendocrine tumors are characterized by increased cell proliferation and reduced expression of the ATM gene. PLoS ONE 2012;7(4):e34456. doi: 10.1371/journal.pone.0034456 PMID: 22485171

46. Lin WR, Lai MW, Yeh CT. Cyclin-dependent kinase-associated protein phosphatase is overexpressed in alcohol-related hepatocellular carcinoma and influences xenograft tumor growth. Oncol Rep 2013;29(3):903-10. doi: 10.3892/or.2012.2208 PMID: 23292002

47. Xing C, Xie H, Zhou L, Zhou W, Zhang W, Ding S, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes tumor cell proliferation. Biochem Biophys Res Commun 2012;420(1):29-35. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.107 PMID: 22390936

48. Hunter KD, Thurlow JK, Fleming J, Drake PJ, Vass JK, Kalna G, et al. Divergent routes to oral cancer. Cancer Res 2006;66(15):7405-7413. PMID: 16885335

49. Berumen J, Espinosa AM, Medina I. Targeting CDKN3 in cervical cancer. Expert Opin Ther Targets 2014;18(10):1149-62. doi: 10.1517/14728222.2014.941808 PMID: 25152075

50. Chen Q, Chen K, Guo G, Li F, Chen C, Wang S, et al. A critical role of CDKN3 in Bcr-Abl-mediated tumorigenesis. *PLoS ONE* 2014;9(10):e111611. doi: 10.1371/journal.pone.0111611 PMID: 25360622
51. Singh R, Chander S, Mohanti BK, Pathy S, Kumar S, Bhatla N, et al. Neoadjuvant chemotherapy with weekly paclitaxel and carboplatin followed by chemoradiation in locally advanced cervical carcinoma: A pilot study. *Gynecol Oncol* 2013;129(1):124-8. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.01.011 PMID: 23353129
52. McCormack M, Kadalayil L, Hackshaw A, Hall-Craggs MA, Symonds RP, Warwick V, et al. A phase II study of weekly neoadjuvant chemotherapy followed by radical chemoradiation for locally advanced cervical cancer. *Br J Cancer* 2013;108(12):2464-9. doi: 10.1038/bjc.2013.230 PMID: 23695016
53. Suh D, Kim J-W, Kang S, Kim HJ, Lee KH. Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2013. *J Gynecol Oncol* 2014;25(3):236-48. doi: 10.3802/jgo.2014.25.3.236 PMID: 25045437
54. Jackson M, Rusthoven Ch, Fisher Ch, Scheffer TE. Clinical potential of bevacizumab in the treatment of metastatic and locally advanced cervical cancer: current evidence. *OncoTargets Ther* 2014;7:751-9. doi: 10.2147/OTT.S49429 PMID: 24876784
55. Nogueira-Rodrigues A, Moralez G, Grazziotin R, Carmo CC, Small IA, Alves FV, et al. Phase 2 trial of erlotinib combined with cisplatin and radiotherapy in patients with locally advanced cervical cancer. *Cancer* 2014;120(8):1187-93. doi: 10.1002/cncr.28471 PMID: 24615735
56. Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res* 2008;68(22):9280-90. doi: 10.1158/0008-5472 PMID: 19010901

57. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell* 2014;25(18):2677-81. doi: 10.1091/mbc PMID: 25213191
58. Cao T, Gao Z, Gu L, Chen M, Yang B, Cao K, et al. AdipoR1/APPL1 Potentiates the Protective Effects of Globular Adiponectin on Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy and Fibrosis in Neonatal Rat Atrial Myocytes and Fibroblasts. *PLoS ONE* 2014;9(8):e103793. doi: 10.1371/journal.pone.0103793 PMID: 25099270
59. Schimmack S, Taylor A, Lawrence B, Alaimo D, Schmitz-Winnenthal H, Büchler MW, et al. A mechanistic role for the chromatin modulator, NAP1L1, in pancreatic neuroendocrine neoplasm proliferation and metastases. *Epigenetics Chromatin* 2014;7:15. doi: 10.1186/1756-8935-7-15 PMID: 25071868
60. Wen X, Zhu J, Dong L, Chen Y. The role of c2orf68 and PI3K/Akt/mTOR pathway in human colorectal cancer. *Med Oncol* 2014;31(8):92. doi: 10.1007/s12032-014-0092-7 PMID: 25023051
61. Liu L, Liu X, Xu Q, Wu P, Zuo X, Zhang J, et al. Self-assembled nanoparticles based on the c(RGDfk) peptide for the delivery of siRNA targeting the VEGFR2 gene for tumor therapy. *Int J Nanomedicine* 2014;9:3509-26. doi: 10.2147/IJN.S63717 PMID: 25114522
62. Pappano W, Zhang Q, Tucker L, Tse C, Wang J. Genetic inhibition of the atypical kinase Wee1 selectively drives apoptosis of p53 inactive tumor cells. *BMC Cancer* 2014;14:430. doi: 10.1186/1471-2407-14-430 PMID: 24927813
63. Gavrillov K, Saltzman WM. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med* 2012;85(2):187-200. PMID: 22737048
64. Medina-Martínez I, Barrón V, Roman-Bassaure E, Juárez-Torres E, Guardado-Estrada M, Espinosa AM, et al. Impact of Gene Dosage on Gene Expression, Biological

Processes and Survival in Cervical Cancer: A Genome-Wide Follow-Up Study. PLoS ONE 2014;9(5):e97842. doi: 10.1371/journal.pone.0097842 PMID: 24879114

65. Santin AD, Zhan F, Bignotti E, Siegel ER, Cané S, Bellone S, et al. Gene expression profiles of primary HPV16-and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology* 2005;331(2):269-91. PMID: 15629771

## 11. PUBLICACIÓN DERIVADA DEL PROYECTO DE TESIS DOCTORAL

### 11.1 CDKN3 mRNA as a biomarker for survival and therapeutic target in cervical cancer

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0137397>



#### RESEARCH ARTICLE

## CDKN3 mRNA as a Biomarker for Survival and Therapeutic Target in Cervical Cancer

Eira Valeria Barrón<sup>1,2</sup>, Edgar Roman-Bassaure<sup>3</sup>, Ana Laura Sánchez-Sandoval<sup>4</sup>, Ana María Espinosa<sup>1</sup>, Mariano Guardado-Estrada<sup>1</sup>, Ingrid Medina<sup>1</sup>, Eligia Juárez<sup>1</sup>, Ana Alfaro<sup>1</sup>, Miriam Bermúdez<sup>1</sup>, Rubén Zamora<sup>5,6</sup>, Carlos García-Ruiz<sup>1</sup>, Juan Carlos Gomora<sup>4</sup>, Susana Kofman<sup>7</sup>, E. Martha Pérez-Armedariz<sup>7\*</sup>, Jaime Berumen<sup>1,2,\*</sup>

**1** Unidad de Medicina Genómica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México/ Hospital General de México, México City, México, **2** Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México, **3** Servicio de Oncología, Hospital General de México, México City, México, **4** Departamento de Neuropatología Molecular, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México, **5** Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México, **6** Laboratorio de Biología Molecular, Asociación para Evitar la Ceguera en México Hospital Dr. Luis Sánchez-Bulnes, México City, México, **7** Servicio de Genética, Hospital General de México/Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

\* Current address: Departamento de Biología, Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México  
\* jaimeberumen@hotmail.com



#### OPEN ACCESS

**Citation:** Barrón EV, Roman-Bassaure E, Sánchez-Sandoval AL, Espinosa AM, Guardado-Estrada M, Medina I, et al. (2015) CDKN3 mRNA as a Biomarker for Survival and Therapeutic Target in Cervical Cancer. *PLoS ONE* 10(9): e0137397. doi:10.1371/journal.pone.0137397

**Editor:** Zhi-Ming Zheng, National Institute of Health—National Cancer Institute, UNITED STATES

**Received:** December 18, 2014

**Accepted:** August 17, 2015

**Published:** September 15, 2015

**Copyright:** © 2015 Barrón et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT, [www.conacyt.mx](http://www.conacyt.mx)), grant numbers 8126A1, 24041 (to JB), National University of Mexico ([www.unam.mx](http://www.unam.mx)), grant number SDLP10.05.2 (to JB), and National Council of Science and Technology (CONACYT, [www.conacyt.mx](http://www.conacyt.mx)), scholarship (to EVB). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

The cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3) gene, involved in mitosis, is upregulated in cervical cancer (CC). We investigated CDKN3 mRNA as a survival biomarker and potential therapeutic target for CC. CDKN3 mRNA was measured in 134 CC and 25 controls by quantitative PCR. A 5-year survival study was conducted in 121 of these CC patients. Furthermore, CDKN3-specific siRNAs were used to investigate whether CDKN3 is involved in proliferation, migration, and invasion in CC-derived cell lines (SiHa, CaSki, HeLa). CDKN3 mRNA was on average 6.4-fold higher in tumors than in controls ( $p = 8 \times 10^{-6}$ , Mann-Whitney). A total of 68.2% of CC patients over expressing CDKN3 gene (fold change  $\geq 17$ ) died within two years of diagnosis, independent of the clinical stage and HPV type (Hazard Ratio = 5.0, 95% CI: 2.5–10,  $p = 3.3 \times 10^{-6}$ , Cox proportional-hazards regression). In contrast, only 19.2% of the patients with lower CDKN3 expression died in the same period. In vitro inactivation of CDKN3 decreased cell proliferation on average 67%, although it had no effect on cell migration and invasion. CDKN3 mRNA may be a good survival biomarker and potential therapeutic target in CC.

## Introduction

Cervical cancer (CC) is the fourth most common cancer in women worldwide [1]. Each year 530,000 new cases are reported, making it the leading cause of death by cancer in women from developing countries [2, 3]. Human papillomavirus (HPV) is present in almost 100% of CCs

## 12. ANEXOS

Como parte del desarrollo académico, se generaron las siguientes publicaciones. No se anexan en la presente como parte principal de la tesis doctoral.

### 12.1 Amplified genes may be overexpressed, unchanged, or downregulated in cervical cancer cell lines.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0032667>

OPEN ACCESS Freshly available online

PLOS ONE

## Amplified Genes May Be Overexpressed, Unchanged, or Downregulated in Cervical Cancer Cell Lines

Oscar Vazquez-Mena<sup>1</sup>, Ingrid Medina-Martínez<sup>1</sup>, Eligia Juárez-Torres<sup>1</sup>, Valeria Barrón<sup>1</sup>, Ana Espinosa<sup>1</sup>, Nicolás Villegas-Sepulveda<sup>2</sup>, Laura Gómez-Laguna<sup>3</sup>, Karem Nieto-Martínez<sup>3</sup>, Lorena Orozco<sup>4</sup>, Edgar Roman-Basauré<sup>5</sup>, Sergio Muñoz Cortez<sup>6</sup>, Manuel Borges Ibañez<sup>6</sup>, Carlos Venegas-Vega<sup>3</sup>, Mariano Guardado-Estrada<sup>1</sup>, Angélica Rangel-López<sup>7</sup>, Susana Kofman<sup>3</sup>, Jaime Berumen<sup>1,8\*</sup>

**1** Unidad de Medicina Genómica, Facultad de Medicina, Hospital General de México, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Distrito Federal, México, **2** Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México, Distrito Federal, México, **3** Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Hospital General de México, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Distrito Federal, México, **4** Laboratorio de Genómica de Enfermedades Complejas, Instituto Nacional de Medicina Genómica, México, Distrito Federal, México, **5** Servicio de Oncología, Hospital General de México, México, Distrito Federal, México, **6** Servicio de Ginecología, Hospital General de México, México, Distrito Federal, México, **7** Unidad de Investigación Médica Enfermedades Nefrológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, Distrito Federal, México, **8** Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Distrito Federal, México

### Abstract

Several copy number-altered regions (CNAs) have been identified in the genome of cervical cancer, notably, amplifications of 3q and 5p. However, the contribution of copy-number alterations to cervical carcinogenesis is unresolved because genome-wide there exists a lack of correlation between copy-number alterations and gene expression. In this study, we investigated whether CNAs in the cell lines CaLo, CaSki, HeLa, and SiHa were associated with changes in gene expression. On average, 19.2% of the cell-line genomes had CNAs. However, only 2.4% comprised minimal recurrent regions (MRRs) common to all the cell lines. Whereas 3q had limited common gains (13%), 5p was entirely duplicated recurrently. Genome-wide, only 15.6% of genes located in CNAs changed gene expression; in contrast, the rate in MRRs was up to 3 times this. Chr 5p was confirmed entirely amplified by FISH; however, maximum 33.5% of the explored genes in 5p were deregulated. In 3q, this rate was 13.4%. Even in 3q26, which had 5 MRRs and 38.7% recurrently gained SNPs, the rate was only 15.1%. Interestingly, up to 19% of deregulated genes in 5p and 73% in 3q26 were downregulated, suggesting additional factors were involved in gene repression. The deregulated genes in 3q and 5p occurred in clusters, suggesting local chromatin factors may also influence gene expression. In regions amplified discontinuously, downregulated genes increased steadily as the number of amplified SNPs increased ( $p < 0.01$ , Spearman's correlation). Therefore, partial gene amplification may function in silencing gene expression. Additional genes in 1q, 3q and 5p could be involved in cervical carcinogenesis, specifically in apoptosis. These include *PAAP1* in 1q, *TNFSF10* and *ECT2* in 3q and *CLPTM1L*, *AHRH*, *PDCD6*, and *DAP* in 5p. Overall, gene expression and copy-number profiles reveal factors other than gene dosage, like epigenetic or chromatin domains, may influence gene expression within the entirely amplified genome segments.

Citation: Vazquez-Mena O, Medina-Martínez I, Juárez-Torres E, Barrón V, Espinosa A, et al. (2012) Amplified Genes May Be Overexpressed, Unchanged, or Downregulated in Cervical Cancer Cell Lines. PLoS ONE 7(3): e32667. doi:10.1371/journal.pone.0032667

Editor: Alessandro Marcello, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Italy

Received September 5, 2011; Accepted January 30, 2012; Published March 7, 2012

Copyright: © 2012 Vazquez-Mena et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT), grant numbers 8135/A1, 24341 (to JB) and 80680 (to SK), and the National University of Mexico (UNAM), grant number SDLPDID.05.2 (to JB). ONM, AE, BWW, and VB were recipients of a scholarship from CONACYT. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: jaimeberumen@hotmail.com

### Introduction

Cervical cancer (CC) is the second most common cancer in women worldwide, affecting 500,000 individuals each year, and it is the main cause of death of women with cancer in developing countries [1]. The viral oncoproteins E6 and E7 of the high-risk human papillomaviruses (HPV) play an important role in carcinogenesis. They inhibit various cellular targets, including the tumor-suppressor proteins p53 and pRb, disrupt key cellular processes, such as apoptosis and cell-cycle control, and lead to genomic instability and neoplastic development [2]. Despite the damage caused by the oncoviral proteins, CC is a rare complication of the viral infection because most infections are

transient and do not evolve into neoplastic lesions. On average, it takes 12–15 years before a persistent HPV infection may, via the premalignant stages of cervical intraepithelial neoplastic lesions (CIN), lead to CC [3]. These findings suggest HPV infection alone does not cause the disease and other factors, such as abnormal host genes, could be associated with the development of invasive cancer. Several genomic regions have been identified with changes in the number of DNA copies (copy number-altered regions, CNAs) in CC through the analysis of the tumor genome by using methods such as comparative genomic hybridization (CGH), fluorescence in situ hybridization (FISH), and microarrays of SNPs. Gains in 1q, 3q, 5p, 8q, and 20q and deletions in 2q, 3p, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 11q, 13q, 18q, and Xq have been frequently

## 12.2 Impact of gene dosage on gene expression, biological processes and survival in cervical cancer: a genome-wide follow-up study.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0097842>

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE



# Impact of Gene Dosage on Gene Expression, Biological Processes and Survival in Cervical Cancer: A Genome-Wide Follow-Up Study

Ingrid Medina-Martínez<sup>1</sup>, Valeria Barrón<sup>1</sup>, Edgar Roman-Bassaure<sup>2</sup>, Eligia Juárez-Torres<sup>1</sup>, Mariano Guardado-Estrada<sup>1</sup>, Ana María Espinosa<sup>1</sup>, Miriam Bermudez<sup>1</sup>, Fernando Fernández<sup>3</sup>, Carlos Venegas-Vega<sup>3</sup>, Lorena Orozco<sup>4</sup>, Edgar Zenteno<sup>5</sup>, Susana Kofman<sup>3</sup>, Jaime Berumen<sup>1,6\*</sup>

**1** Unidad de Medicina Genómica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México/Hospital General de México, México, D.F. México, **2** Servicio de Oncología, Hospital General de México, México, D.F. México, **3** Servicio de Genética, Hospital General de México/Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México, **4** Laboratorio de Genómica de Enfermedades Complejas, Instituto Nacional de Medicina Genómica, México, D.F. México, **5** Departamento de Biología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México, **6** Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México

### Abstract

We investigated the role of tumor copy number (CN)-altered genome (CN-AG) in the carcinogenesis of cervical cancer (CC), especially its effect on gene expression, biological processes, and patient survival. Fifty-nine human papillomavirus 16 (HPV16)-positive CCs were investigated with microarrays=31 for mapping CN-AG and 55 for global gene expression, with 27 CCs in common. Five-year survival was investigated in 55 patients. Deletions and amplifications >2.5 Mb were defined as CN alterations. The %CN-AG varied from 0 to 32.2% (mean = 8.1 ± 8.5). Tumors were classified as low (mean = 0.5 ± 0.6, n = 11), medium (mean = 5.4 ± 2.4, n = 10), or high (mean = 19.2 ± 6.6, n = 10) CN. The highest %CN-AG was found in 3q, which contributed an average of 55% of all CN alterations. Genome-wide, only 5.3% of CN-altered genes were deregulated directly by gene dosage. In contrast, the rate in fully duplicated 3q was twice as high. Amplification of 3q explained 23.2% of deregulated genes in whole tumors ( $r^2 = 0.232$ ,  $p = 0.006$ ; analysis of variance), including genes located in 3q and other chromosomes. A total of 862 genes were deregulated exclusively in high-CN tumors, but only 22.9% were CN altered. This suggests that the remaining genes are not deregulated directly by gene dosage, but by mechanisms induced in trans by CN-altered genes. Anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C)-dependent proteasome proteolysis, glycolysis, and apoptosis were upregulated, whereas cell adhesion and angiogenesis were downregulated exclusively in high-CN tumors. The high %CN-AG and upregulated gene expression profile of APC/C-dependent proteasome proteolysis were associated with poor patient survival ( $p < 0.05$ , log-rank test). Along with glycolysis, they were linearly associated with FIGO stage ( $r > 0.38$ ,  $p < 0.01$ , Spearman test). Therefore, inhibition of APC/C-dependent proteasome proteolysis and glycolysis could be useful for CC treatment. However, whether they are indispensable for tumor growth remains to be demonstrated.

Citation: Medina-Martínez I, Barrón V, Roman-Bassaure E, Juárez-Torres E, Guardado-Estrada M, et al. (2014) Impact of Gene Dosage on Gene Expression, Biological Processes and Survival in Cervical Cancer: A Genome-Wide Follow-Up Study. PLoS ONE 9(5): e97842. doi:10.1371/journal.pone.0097842

Editor: Robert D. Burk, Albert Einstein College of Medicine, United States of America

Received December 6, 2013; Accepted April 25, 2014; Published May 30, 2014

Copyright: © 2014 Medina-Martínez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT, [www.conacyt.mx](http://www.conacyt.mx)), grant numbers 8135A1, 24341 (to JB), 80580 (to SK) and 133273 (to FF) and the National University of Mexico ([www.unam.mx](http://www.unam.mx)), grant number SOUTRO.05.2 (to JB). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: [jaimerberumen@hotmail.com](mailto:jaimerberumen@hotmail.com)

### Introduction

Cervical cancer (CC) is the second most common cancer in women worldwide, affecting 500,000 individuals each year; it is the leading cause of cancer death among women in developing countries [1]. The viral oncoproteins E6 and E7 of the high-risk human papillomavirus (HPV) play an important role in carcinogenesis. They inhibit various cellular targets, including the tumor-suppressor proteins p53 and pRb, disrupt key cellular processes, such as apoptosis and cell cycle control, and lead to genomic instability and neoplastic development [2]. Despite the damage caused by these oncoviral proteins, CC is a rare complication of the viral infection; most infections are transient and do not evolve into neoplastic lesions. On average, 12–15 years can pass before a persistent HPV infection leads to CC via the premalignant stages

of cervical intraepithelial neoplastic lesions [3]. These findings suggest that HPV infection alone does not cause the disease and that other factors, such as abnormal host genes, are associated with the development of invasive cancer.

Genomic imbalances can contribute to deregulated expression of oncogenes and tumor suppressor genes in cancer cells, and the accumulation of such altered genes has been correlated with tumor progression [4]. Several copy number (CN)-altered regions (CNAs) have been identified in CC through tumor genome analysis using methods such as comparative genomic hybridization, fluorescence in situ hybridization, and microarrays (MAs). Gains of 3q [5–11] and 5p [5,12–15] are the most frequent chromosomal alterations in CCs, and they have also been described in other solid tumors [16–18]. The smallest consensus region of 3q amplification in CC