



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

**Entidad Académica
Facultad de Medicina**

**Localización celular de B-catenina
en adenocarcinoma pulmonar**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

DOLORES AGUILAR CÁZARES

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta Tesis fue realizada en el **Laboratorio de Cáncer Pulmonar** del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Manuel Cosío Villegas”, bajo la dirección del Dr. José Sullivan López González y con apoyo de **CONACYT** (Proyecto 34444-M).

Los miembros del **Comité Tutorial**:

Dr. Raúl Mancilla Jiménez

Dr. Ricardo Lascurain Ledesma

Dr. José Sullivan López González

Quiero agradecer a todos los que me apoyaron a lo largo de este trabajo, a mis compañeros del Laboratorio de Cáncer Pulmonar: Paty, Heriberto, Manuel, Federico, Lorenzo y Héctor.

También quiero agradecer a mis Papás Estela y Carlos. Así como a Ro, Juan y Sonia.

Al Dr. Sullivan le agradezco su gran paciencia.

En especial y con todo mi corazón le quiero dar las gracias infinitas a Mario y a Esteban, por estar ausente muchas veces durante el desarrollo de este trabajo. Los amo.

INDICE GENERAL i

INDICE DE FIGURAS ;Error! Marcador no definido.

RESUMEN ;Error! Marcador no definido.

SUMMARY ;Error! Marcador no definido.

1. INTRODUCCIÓN ;Error! Marcador no definido.

1.1 CANCER ;Error! Marcador no definido.

1.1.1 ORIGEN DEL CÁNCER ;Error! Marcador no definido.

1.1.2 CARCINOGENESIS ;Error! Marcador no definido.

1.1.2.1 INICIACIÓN DEL TUMOR **;Error! Marcador no definido.**

1.1.2.2 PROMOCIÓN DEL TUMOR **;Error! Marcador no definido.**

1.1.2.3 CONVERSIÓN MALIGNA **;Error! Marcador no definido.**

1.1.2.4 ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMOR **;Error! Marcador no definido.**

1.1.2.5 PROGRESIÓN DEL TUMOR **;Error! Marcador no definido.**

1.1.3 CÁNCER DE PULMÓN ;Error! Marcador no definido.

1.1.4 CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER	¡Error! Marcador no definido.
1.1.4.1 INVASIÓN Y METÁSTASIS (INCISO 6)	¡Error! Marcador no definido.
1.2 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	¡Error! Marcador no definido.
1.2.1 INTEGRINAS	¡Error! Marcador no definido.
1.2.2 SELECTINAS	¡Error! Marcador no definido.
1.2.3 SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS	¡Error! Marcador no definido.
definido.	
1.2.4 CADHERINAS	¡Error! Marcador no definido.
1.2.4.1 COMPLEJO DE ADHESIÓN	¡Error! Marcador no definido.
1.2.4.2 LA α -CATENINA	¡Error! Marcador no definido.
1.3 LA β-CATENINA	¡Error! Marcador no definido.
1.3.1 EL COMPLEJO AXINA, APC Y GSK-3 β	¡Error! Marcador no definido.
1.3.2 APC	¡Error! Marcador no definido.
1.3.3 AXINA	¡Error! Marcador no definido.
1.3.4 GSK-3 β	¡Error! Marcador no definido.
1.3.5 LA VÍA WNT.	¡Error! Marcador no definido.
1.3.6 LA VÍA WNT/CA ²⁺	¡Error! Marcador no definido.
1.3.7 LA VÍA PCP	¡Error! Marcador no definido.
1.3.8 LA VÍA CLÁSICA WNT.	¡Error! Marcador no definido.
1.3.9 LA β -CATENINA EN CÁNCER	¡Error! Marcador no definido.
2. ANTECEDENTES	¡Error! Marcador no definido.

3. JUSTIFICACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
4. HIPÓTESIS	¡Error! Marcador no definido.
5. OBJETIVO GENERAL	¡Error! Marcador no definido.
6. OBJETIVOS PARTICULARES	¡Error! Marcador no definido.
7. MATERIALES Y MÉTODOS	¡Error! Marcador no definido.
7.1 MUESTRAS DE TEJIDO	¡Error! Marcador no definido.
7.2 CULTIVOS CELULARES	¡Error! Marcador no definido.
7.3 ANTICUERPOS	¡Error! Marcador no definido.
7.4 INMUNOHISTOQUÍMICA	¡Error! Marcador no definido.
7.4.1 CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE RESULTADOS	¡Error! Marcador no definido.
7.5 INMUNOCITOQUÍMICA	¡Error! Marcador no definido.
7.6 INMUNOPRECIPITACIÓN Y WESTERN BLOT	¡Error! Marcador no definido.
7.6.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES	¡Error! Marcador no definido.
7.6.2 FRACCIÓN MEMBRANAL Y CITOPASMÁTICA (PROTEÍNAS SOLUBLES EN TRITÓN X-100)	¡Error! Marcador no definido.

7.6.3 FRACCIÓN DE CITOESQUELETO (PROTEÍNAS NO SOLUBLES EN TRITÓN X-100)	¡Error! Marcador no definido.
7.6.4 FRACCIÓN NUCLEAR	¡Error! Marcador no definido.
7.7 INMUNOPRECIPITACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
7.8 WESTERN BLOT	¡Error! Marcador no definido.
7.9 WESTERN BLOT DE LA FRACCIÓN NUCLEAR	¡Error! Marcador no definido.
7.10 INMUNOFLUORESCENCIA	¡Error! Marcador no definido.
8. RESULTADOS	¡Error! Marcador no definido.
8.1 INMUNOHISTOQUÍMICA EN CORTES HISTOLÓGICOS	¡Error! Marcador no definido.
8.2 INMUNOCITOQUÍMICA EN LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA PULMONAR	¡Error! Marcador no definido.
8.3 INMUNOPRECIPITACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
8.4 WESTERN BLOT DE LA FRACCIÓN NUCLEAR	¡Error! Marcador no definido.
8.5 INMUNOFLUORESCENCIA	¡Error! Marcador no definido.
9. DISCUSIÓN	¡Error! Marcador no definido.
10. CONCLUSIONES	¡Error! Marcador no definido.
11. BIBLIOGRAFÍA	¡Error! Marcador no definido.
INDICE DE FIGURAS	

Figura 1. Etapas de la carcinogénesis.	2
Figura 2. Características del cáncer	9
Figura 3. Uniones célula-célula.	12
Figura 4. Estructura de E-cadherina.	14
Figura 5: Estructura de β -catenina.	16
Figura 6: Estructura de β -catenina.	17
Figura 7. Formación del complejo Axina/APC/GSK-3b.	18
Figura 8. Activación de la vía Wnt.	22
Figura 9. Papel de la b-catenina en el núcleo celular.	25
Figura 10. La vía clásica de Wnt.	26
Figura 11. Localización basolateral de β -catenina en epitelio pulmonar.	44

Figura 12. Localización nuclear de β -catenina en hepatocarcinoma.	44
Figura 13. Expresión de β -catenina en carcinoma pulmonar	45
Figura 14. Expresión membranal de E-cadherina/catenina en la línea celular MDCK.	46
Figura 15 Localización de E-cadherina, β -catenina y APC en líneas tumorales pulmonares.	47
Figura 16. Extractos celulares de la línea celular MDCK..	49
Figura 17. Inmunoprecipitación con anti- β -catenina de extractos celulares de la línea celular A-427	51
Figura 18. Extracto de fracción citoplásmica de la línea A-427 Inmunoprecipitación con anti β -catenina..	52
Figura 20. Fracción nuclear de las líneas celulares SW480 y A-427..	56
Figura 21. Línea celular SW480. Inmunofluorescencia	57

Figura 22. Línea celular A-427. Inmunofluorescencia. 58

Figura 23. Localización celular de β -catenina fosforilada en serina 33

59

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CANCER

1.1.1 ORIGEN DEL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad de origen multifactorial que se caracteriza por una proliferación celular anormal excesiva. Una célula normal que ha sufrido una mutación puede originar el desarrollo de un tumor. Las mutaciones pueden ser producidas por distintos agentes: biológicos, químicos o físicos, proporcionándole a la célula pérdida o ganancia de funciones.

1.1.2 CARCINOGENÉISIS

La carcinogénesis (Fig. 1) es el proceso por el cual una célula, a través de cambios genéticos y epigenéticos, se convierte en una célula maligna con capacidad de invadir y generar metástasis. La carcinogénesis se divide en cuatro etapas: iniciación del tumor, promoción, conversión maligna y progresión del tumor (Balmain and Harris, 2007). La iniciación y promoción fueron reconocidas y distinguidas a través de estudios con virus y carcinógenos químicos realizados en roedores. El estudio en humanos es más complejo, ya que influyen otros factores como el estilo de vida y ocupación del individuo, así

como la edad, el género y los antecedentes familiares (Weston and Harris, 2003).

1.1.2.1 Iniciación del tumor

Un carcinógeno químico causa un error genético al modificar la estructura molecular del DNA (Fig. 1) por formación de aductos entre los grupos funcionales del carcinógeno y los del DNA, lo que deriva en una mutación tras la síntesis del DNA. La formación de aductos en el DNA es un requisito pero no es suficiente para la iniciación del tumor. Recientemente, estudios moleculares en tejidos preneoplásicos de pulmón y de colón de origen humano han reportado cambios epigenéticos (metilación del DNA en las regiones promotoras de genes supresores de tumor) como evento muy temprano y contundente en la iniciación del tumor (Weston and Harris, 2003).

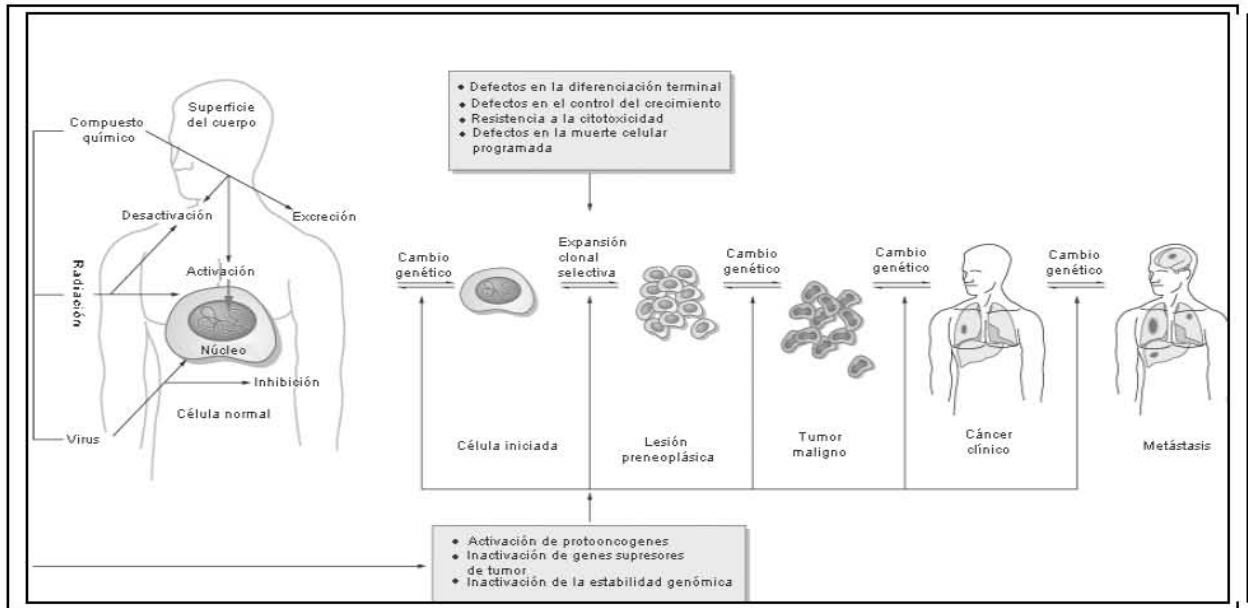


Figura 1. Etapas de la carcinogénesis.

1.1.2.2 Promoción del tumor

En la promoción del tumor se lleva a cabo la expansión clonal de la célula iniciada, produciendo una población de células capaces de transformarse a células malignas (Fig. 1). Las sustancias promotoras de la expansión clonal no son mutagénicas, ni carcinogénicas y median su efecto biológico sin actividad metabólica (Weston and Harris, 2003).

1.1.2.3 Conversión maligna

La transformación de las células iniciadas hacia la expresión de un fenotipo maligno (Fig. 1) se denomina conversión maligna. Este proceso requiere de incrementar los cambios genéticos mediante la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumor (Loeb and Cheng, 1990).

1.1.2.4 Oncogenes y genes supresores de tumor

Los proto-oncogenes son genes que codifican proteínas que participan en la división y diferenciación celular (Pierotti et al., 2003). Los oncogenes son genes mutados a partir de proto-oncogenes. Un oncogen le proporciona a la célula ganancia de función, permitiéndole proliferar de manera descontrolada. Los proto-oncogenes pueden ser genes que codifiquen para: a) Factores de crecimiento como son: el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento transformante beta, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, etc. b) Receptores para los factores de crecimiento indicados anteriormente. c) Transductores de señales como la proteína Ras, que se activa en respuesta a una señal mitótica y que puede activar a otras proteínas para promover la división celular y d) Proteínas que regulan la apoptosis, como la proteína Bcl-2 que muestra actividad anti-apoptótica (Lewin, 2004).

En cambio, los genes supresores de tumor codifican proteínas que inhiben la división celular y al mutarse generan pérdida de función (Park and Volgestein, 2003). Entre ellos se encuentran: a) Genes que controlan la división celular, como es el caso de RB (retinoblastoma), b) Genes involucrados en la

reparación de DNA, como son BRCA1 y BCRA2 y c) Genes que participan en la apoptosis, como P53. Se han propuesto varias hipótesis para explicar la disfuncionalidad de estos genes, como son: a) pérdida de heterocigocidad (del inglés LOH), en la cual la mutación del alelo de un gen es suficiente para iniciar la transformación maligna, b) la hipótesis del doble golpe propuesta por Knudson (Knudson, 1996) que explica la predisposición a padecer cáncer y que plantea la mutación de un alelo en etapa germinal y una mutación somática en el segundo alelo durante la vida del individuo, lo que daría como resultado la iniciación/progresión de un tumor y c) la haplo-insuficiencia, término empleado cuando el producto de un gen es la mitad del nivel normal, esto puede deberse a varios factores, el más común es el que una de las dos copias de un gen sufra una deleción, lo que lleva a que los niveles del producto del gen supresor de tumor son insuficientes para inhibir la actividad de las proteínas involucradas en la estimulación de la división celular (Macleod, 2000).

1.1.2.5 Progresión del tumor

Como resultado de las alteraciones antes indicadas, algunas células llevan a cabo la expresión del fenotipo maligno y la tendencia a invadir los tejidos

adyacentes (Weston and Harris, 2003). Estas células transformadas alteran el patrón de expresión de las moléculas de adhesión, lo que favorece su separación de las células vecinas y su migración hacia la membrana basal. Además, cuando las células tumorales sintetizan enzimas proteolíticas, pueden degradar la membrana basal y “atravesar” las células endoteliales, llegando así al sistema vascular o linfático por donde viajan y pueden llegar a establecerse en otros órganos, desarrollando tumores secundarios; evento que se conoce como metástasis.

1.1.3 CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón es la forma más común de cáncer en el mundo, tan solo en el año 2000 se considera que surgieron 1.2 millones de nuevos casos (Minna et al., 2002). El tabaquismo es la principal causa del cáncer pulmonar, incrementando en los fumadores el riesgo de esta enfermedad en un 80-90%.

Se ha establecido que la principal causa del cáncer de pulmón es la inhalación de las sustancias químicas carcinogénicas que se encuentran en los productos de la combustión del humo y el alquitrán del cigarrillo (Proctor, 2001). El humo del cigarro contiene una mezcla química de miles de sustancias de las que más de 40 pueden dañar al DNA. De éstas, las más tóxicas son el benzo(a)pireno y las nitrosaminas. Pequeñas dosis de nitrosaminas administradas por vía subcutánea, oral o tópica, causan la aparición predominante de tumores pulmonares en animales de experimentación (Borczuk and Powell, 2007).

Los fumadores no son los únicos que incrementan el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón, también los fumadores pasivos incrementan en un 30% el riesgo de tener esta enfermedad, comparado con las personas que viven en áreas libres del humo de tabaco (Minna et al., 2002). El cáncer de pulmón también se ha asociado con agentes carcinogénicos ocupacionales y ambientales, como son la exposición a asbesto, arsénico, berilio, a los éteres clorometilados, los hidrocarburos aromáticos y al radón.

El cáncer de pulmón se divide histológicamente en dos tipos principales (Panani and Roussos, 2006): el carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) el cual tiene un origen neuroendocrino y el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés). Este último grupo se divide a su vez en: carcinoma epidermoide, el carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma que es la forma más común de cáncer pulmonar en el mundo.

El mejor pronóstico para un paciente con cáncer pulmonar depende del diagnóstico del tumor en un estadio temprano de su evolución, lo que permite su resección quirúrgica y el uso de distintos tipos de terapia, lo que a su vez incrementa en un 50% la sobrevida del paciente a cinco años. Desafortunadamente, los síntomas generados por el carcinoma pulmonar

localizado son generalmente inespecíficos, lo que no permite su diagnóstico temprano; en contraste, el cuadro clínico (tos, pérdida de peso, dolor torácico y disnea) se presenta frecuentemente en los estadios avanzados de la enfermedad, donde ya no es posible realizar resección quirúrgica y el uso de terapia sistémica es paliativa (Martín-Ruiz et al., 2004).

Por lo anterior, el cáncer de pulmón es un importante problema de salud pública a nivel mundial que cada vez se presenta en personas más jóvenes.

Además de que la mayoría de los pacientes son detectados en etapas avanzadas donde las distintas formas de tratamiento sólo proporcionan al paciente una expectativa menor a un año de sobrevida.

1.1.4 CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER

Hanahan y Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000) han propuesto que una célula tumoral presenta seis características principales, indicadas en la Fig. 2, que son: 1) Autosuficiencia para las señales de crecimiento (inciso 1), las células normales requieren señales mitogénicas para poder proliferar, estas señales provienen del microambiente que los rodea. En el caso de las células tumorales, ellas generan sus propias señales mitogénicas, mutando genes como *PTEN* (gen supresor de tumor) que regula el ciclo celular o como *P14* (inhibidor del ciclo celular) por lo que ya no pueden llevar a cabo su función; lo anterior permite a las células ganar independencia en su propia proliferación. 2)

Insensibilidad a las señales que regulan el crecimiento (inciso 2). En un tejido normal, las señales antiproliferativas generadas por el microambiente impiden a las células proliferar de manera autónoma. En un cáncer inicial, estas señales pueden ser evadidas por las células tumorales, mutaciones generalmente en *Rb* mantienen a esta proteína fosforilada permitiéndole a la célula transformada avanzar a la fase G1 del ciclo celular y proliferar; otras moléculas que permanecen activadas constantemente son la RARB2 que pertenece a la familia de receptores de ácido retinoico y P16 que participa en el ciclo celular.

3) Evasión de la apoptosis (inciso 3), la resistencia a la apoptosis puede ser adquirida por las células tumorales a través de varias estrategias, una de ellas es la mutación del regulador proapoptótico *P53*, el cual es un censor de daño al DNA y si se encuentra mutado no puede iniciar la apoptosis; también se ha encontrado nula actividad de Apaf-1 que es un componente del apoptosoma y al estar ausente inhibe la apoptosis.

4) Potencial replicativo ilimitado (inciso 4), independientemente de la autonomía que tenga una célula para proliferar tiene un límite para hacerlo, pero las células tumorales han podido llegar a la inmortalización, es decir a dividirse infinitamente. En muchos casos, esto se debe a la presencia de la enzima telomerasa, la cual esta presente en el 85 a 90% de todos los tumores, proporcionándole a la célula un potencial replicativo ilimitado. También la presencia constante de ciclina D2 permite que la célula tenga un potencial replicativo ilimitado.

5) Angiogénesis sostenida (inciso 5), el nuevo tumor necesita oxígeno y nutrientes para poder desarrollarse, por lo que

secreta factores solubles como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento para fibroblastos (FGF1 y FGF2). También secreta proteasas para degradar moléculas anti-angiogénicas como la plasmina que degrada a la angiostastina; lo anterior para desarrollar una nueva vascularización que permita el crecimiento del tumor.

CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER

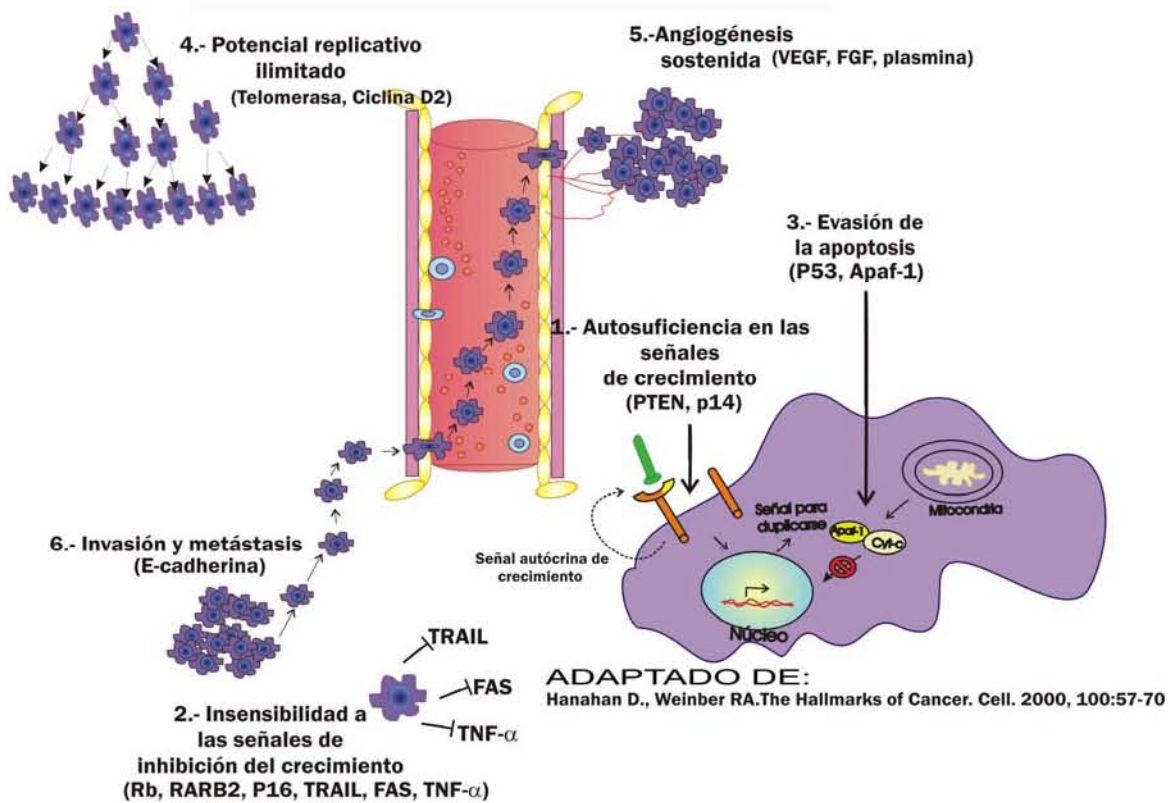


Figura 2. Características del cáncer

1.1.4.1 Invasión y metástasis (inciso 6)

Los procesos de invasión y de metástasis son muy complejos y permiten al tumor primario invadir el tejido aledaño (invasión) así como órganos a distancia (metástasis), lo que causa finalmente la muerte de los pacientes con cáncer

(Hanahan and Weinberg, 2000). Las *moléculas de adhesión* juegan un papel primordial en la invasión y la metástasis de los tumores.

1.2 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Las moléculas de adhesión son glicoproteínas transmembranales que llevan a cabo uniones en la superficie celular y determinan la especificidad de reconocimiento entre célula-célula (Fig. 3) (CAM's) y célula-matriz extracelular (SAM's) (Siu, 1996b). Estas interacciones regulan procesos relacionados con la forma y polaridad de la célula lo que determina la arquitectura del tejido, así mismo activan la motilidad celular y pueden inducir la expresión de factores de crecimiento y de proliferación celular.

Las moléculas de adhesión de superficie celular se agrupan de acuerdo a su similitud estructural en cuatro familias:

1.2.1 Integrinas

Las integrinas son una gran familia de glicoproteínas transmembranales que median uniones célula-célula (CAM's) y célula-matriz extracelular (SAM's) (Brodt and Dedhear, 1996). Las integrinas están formadas por una unidad α y una unidad β . Existen por lo menos 15 cadenas α y 8 cadenas β las cuales pueden interaccionar en una amplia gama de combinaciones. Generalmente se clasifican de acuerdo a su cadena β , pero se prefiere dar una clasificación de acuerdo a su función. Las subunidades β de todas las integrinas son muy

similares entre ellas ya que comparten una secuencia de aminoácidos homóloga con características estructurales específicas bien conservadas en una amplia variedad de especies. Las integrinas juegan un papel importante durante la adhesión-migración, la cual se ha observado principalmente en la extravasación de leucocitos.

1.2.2 Selectinas

Son glicoproteínas transmembranales compuestas por tres dominios extracelulares (Mayadas, 1996). La familia de las selectinas está constituida por tres moléculas relacionadas, la P-selectina que se localiza en las plaquetas, la L-selectina, que se localiza en los leucocitos y la E-selectina se localiza en las células endoteliales. Las selectinas median las interacciones heterotípicas entre células sanguíneas y células endoteliales, en el proceso de anclaje y adhesión del leucocito, lo que le permite al leucocito “rodar” a través del endotelio vascular en dirección del flujo sanguíneo.

1.2.3 Superfamilia de las inmunoglobulinas

Los miembros que integran esta familia de moléculas poseen en común una estructura homóloga a las inmunoglobulinas, que consiste de 70 a 110 aminoácidos organizados en dos cadenas paralelas β -plegadas y estabilizadas por puentes disulfuro (Siu, 1996a). Entre ellos se encuentran las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), el receptor de la célula T, el

receptor para el factor de crecimiento de plaquetas, etc; así como otras moléculas importantes de adhesión celular como: la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM), la molécula de adhesión celular vascular (VCAM), las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3), etc.

1.2.4 Cadherinas

Las cadherinas participan en dos distintos tipos de uniones célula-célula (Fig. 3), se encuentran formando parte las de uniones adherentes y de los desmosomas.

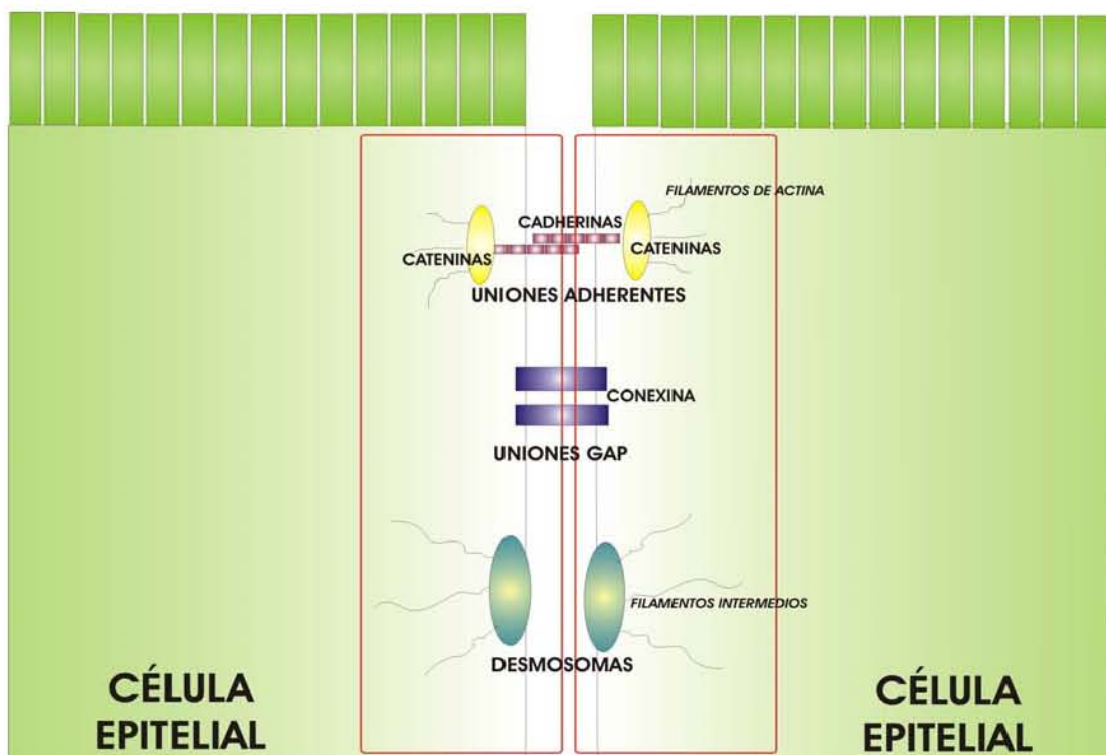


Figura 3. Uniones célula-célula.

Las cadherinas son proteínas glicosiladas y evolutivamente bien conservadas. Dentro de la familia de las cadherinas se encuentran las cadherinas clásicas

que son tejido específicas, así la E-cadherina se localiza en epitelio, la N-cadherina en sistema nervioso, la P-cadherina en placenta.

La E-cadherina se localiza en la región basolateral de las células epiteliales (uniones adherentes) y es de gran importancia en el desarrollo del tejido en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Rowlands et al., 2000) ya que mantiene el contacto célula-célula y la estructura tridimensional del tejido.

La E-cadherina (Fig. 4), miembro de las cadherinas clásicas, consta de cinco dominios extracelulares, un dominio transmembranal y dos dominios citoplásmicos altamente conservados que asocian proteínas intracelulares conocidas como cateninas. Las cadherinas promueven la adhesión célula-célula de forma homofílica; es decir, la E-cadherina se une selectivamente a otra E-cadherina formando una estructura de zipper entre las células. Los dominios extracelulares están altamente conservados y unen calcio. El calcio confiere a la proteína un cambio conformacional que la inmoviliza (Fig. 4) (Beavon, 2000; Steinberg and McNutt, 1999). La E-cadherina, a través de los dominios citoplásmicos se une con otras moléculas intracelulares conocidas como cateninas (cadena) que son indispensables para que se lleve a cabo la adhesión celular. La β -catenina se une directamente al dominio citoplásmico de la E-cadherina y a la vez se une a la α -catenina, la que se une a los filamentos de actina y en conjunto forman el complejo de adhesión (Beavon, 2000).

En el humano, muchos cánceres tienen origen en el tejido epitelial. Se ha observado que la E-cadherina pierde su expresión a medida que progresa la malignidad del tumor (Hirohashi and Kanai, 2003). Basados en datos descriptivos y funcionales, se ha propuesto que la pérdida de E-cadherina es un prerrequisito para que las células tumorales invadan y lleven a cabo la metástasis. Se ha demostrado que el reestablecimiento del complejo de adhesión E-cadherina-cateninas resulta en una regresión del fenotipo maligno (mesenquimatoso invasivo) a un fenotipo epitelial benigno. Se ha llegado a la conclusión de que la pérdida de E-cadherina es uno de los pasos iniciales en la progresión del adenoma a carcinoma y subsecuente formación de metástasis. Por lo anterior, se ha considerado al gen de la E-cadherina como un gen supresor de tumor. Se ha demostrado que la reducida o nula expresión de E-cadherina en los tumores puede deberse a: hipermetilación, rearrreglos en la estructura de la cromatina o pérdida del factor de transcripción para el gen de E-cadherina. Estos eventos coinciden con la supresión en la actividad del promotor del gen de la E-cadherina en los tumores. En general, el promotor del gen para E-cadherina (*CDH1*) se encuentra hipermetilado en el 83% de los tumores (Christofori and Semb, 1999). Otra causa de la baja expresión de E-cadherina son mutaciones (deleciones o inserciones) que se presentan en el gen y que alteran el marco de lectura del gen, produciendo una proteína truncada (Kremer et al., 2003).



Figura 4. Estructura de E-cadherina. CITO: citoplasma, TM: transmembranal, β -cat: sitio de unión a β -catenina.

En otro aspecto, se ha reportado una degradación de E-cadherina por metaloproteasas de matriz extracelular, ya que algunas líneas tumorales liberan fragmentos solubles de E-cadherina.

Receptores con actividad de tirosin cinasas tales como el receptor de crecimiento epidermal (EGFR), el receptor de crecimiento de hepatocitos (HGFR) y el receptor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), que generalmente se encuentran activos en los tumores, provocan que el complejo de adhesión E-cadherina-cateninas se desensamble ya que inducen la fosforilación de tirosinas en la E-cadherina y en la β -catenina (Thomson et al., 2005).

1.2.4.1 Complejo de adhesión

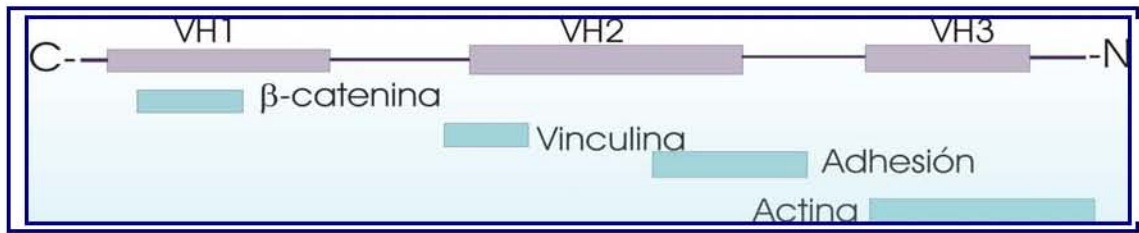
Como se indicó anteriormente, este complejo esta formado por E-cadherina, β -catenina y α -catenina, es calcio dependiente y se asocia con los filamentos de actina.

1.2.4.2 La α -catenina

La α -catenina (Fig. 5) es una proteína de 102 kDa que está unida por su extremo carboxilo terminal a la β -catenina y por su región amino terminal a los filamentos de actina. Se ha observado que las células que no expresan α -catenina no forman uniones adherentes estables (Provost and Rimm, 1999).

La α -catenina puede formar interacciones binarias con distintas proteínas, incluida la vinculina, la α -actinina, la spectrina, ZO-1, la afadina, etc. Estas interacciones se han demostrado mediante ensayos de co-inmunoprecipitación o empleando proteínas recombinantes.

Estudios realizados con α -catenina, E-cadherina o β -catenina quiméricas han demostrado que existe una unión excluyente de α -catenina con β -catenina y α -catenina con actina, por lo que recientemente se ha considerado que la unión del complejo de adhesión E-cadherina-cateninas con actina pudiera ser mediado por alguna de las proteínas antes mencionadas como son: la vinculina, la α -actinina, la spectrina, ZO-1, la afadina, etc. (Weis and Nelson, 2006).



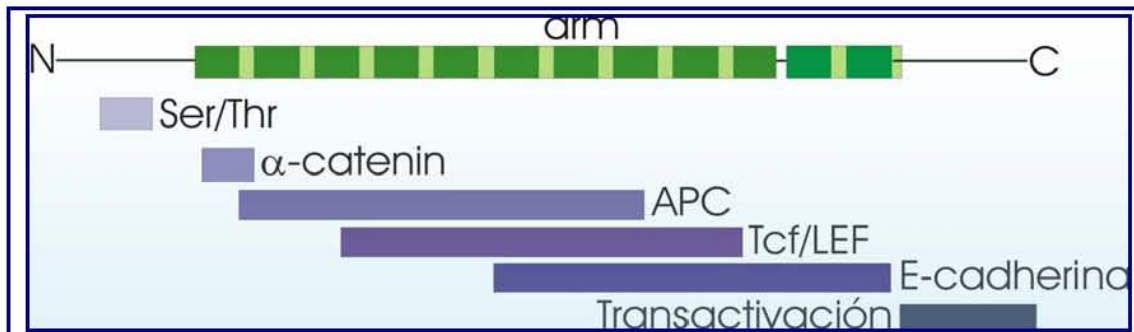
Curr Op Cell Biol 1999, 11:567-572

Figura 5: Estructura de α -catenina. β -catenina: sitio de unión a β -catenina, Adhesión: dominio regulador de adhesión, Vinculina y Actina: sitios por donde se une al citoesqueleto.

1.3 LA β -CATENINA

La proteína β -catenina juega un papel dual en las células, actúa como molécula de adhesión entre las células epiteliales y, en el núcleo actúa como un factor transcripcional. La β -catenina fue descubierta como parte del complejo de adhesión al co-precipitar con E-cadherina.

La β -catenina es una proteína de 97 kDa y su estructura primaria consta de 130 aminoácidos en la región amino terminal, con 12 repeticiones de 42 aminoácidos en la región central que se conocen como repeticiones arm (Armadillo), y que comparte con otras proteínas como la p120 y la adenomatous polyposis coli (APC); además tiene 100 aminoácidos en la región carboxilo terminal. La β -catenina tiene una estructura tridimensional parecida a una campana, donde el extremo amino y el carboxilo se encuentran muy cercanos. Diversas proteínas, con funciones mutuamente excluyentes, se unen a la región armadillo (Fig. 6).



Curr Op Cell Biol 1999, 11:567-572

Figura 6: Estructura de β -catenina. Ser/Thr: sitio de fosforilación para ubiquitinización, α -catenina: sitio de unión a α -catenina, APC: sitio de unión a APC, Tcf/LEF: sitio de unión a los factores de transcripción de la familia Tcf/LEF, E-cadherina: sitio por el cual se une a E-cadherina y transactivación: sitio de unión al DNA.

La función del complejo E-cadherina-cateninas es regulada por la fosforilación de la β -catenina. La β -catenina al fosforilarse en tirosinas por la cinasa Fer, se disocia de α -catenina; pero si es fosforilada por Src o por el EGFR, entonces se disocia de E-cadherina. Se ha demostrado que la β -catenina disociada del complejo de adhesión, es ubiquitinizada y degradada por el proteasoma (Fig. 7). Estos eventos ocurren de manera posterior a la participación de un complejo proteico formado por axina, el producto del gen APC y la serin-treonin cinasa GSK-3 β .

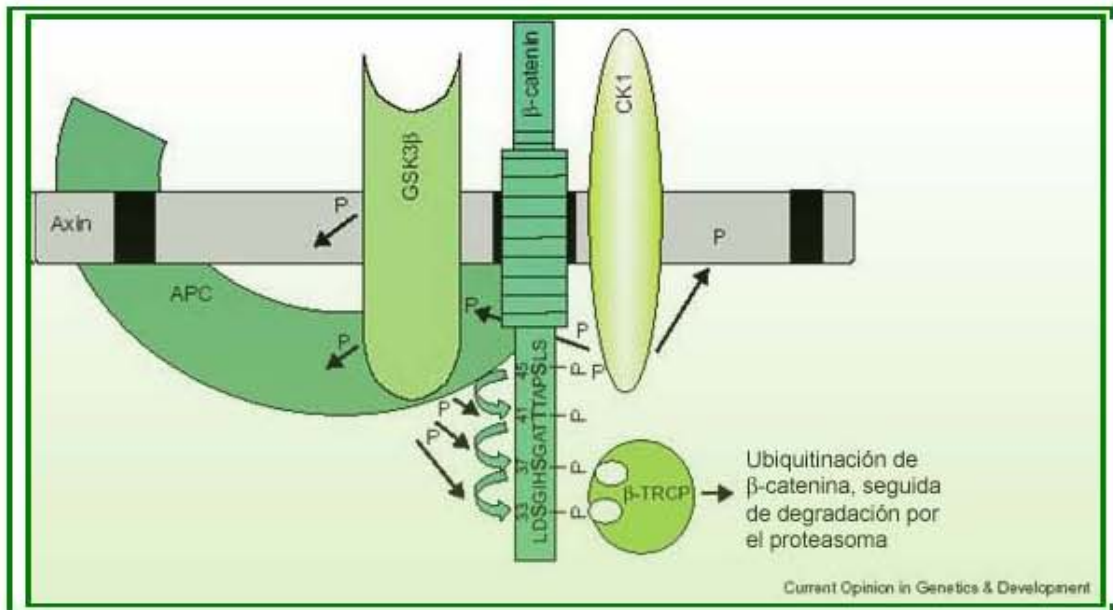


Figura 7. Formación del complejo proteico propuesto para la fosforilación y ubiquitinación de β-catenina.

1.3.1 El complejo Axina, APC y GSK-3β

En la formación de este complejo, axina actúa como proteína acarreadora; es decir, recluta tanto a APC como a GSK-3β promoviendo la fosforilación de β-catenina en serinas y treoninas, tras lo cual se ubiquitina y es degradada por el proteasoma (figura 7).

1.3.2 APC

La proteína adenomatous polyposis coli (APC) es una proteína de 350 kDa y contiene diversos dominios por los que interacciona con muchas otras proteínas. Las mutaciones germinales en el gen para APC son responsables de la poliposis adenomatosa, enfermedad que si no es tratada a tiempo deriva en cáncer de colón. Por lo que en cáncer de colón, la proteína APC se encuentra

mutada en el 80% de los casos. Las mutaciones en el gen para APC dan como resultado una proteína truncada que no puede llevar a cabo su función (Fearbhead et al., 2001). Se ha encontrado que APC participa en la organización de los cinetocoros durante la mitosis, además se le ha localizado formando parte del citoesqueleto nuclear y de los microtúbulos, aunque se desconoce su participación en estos sitios (Mimori-Kiyosue and Tsikita, 2001). La función más estudiada de APC es la regulación negativa de la β -catenina. La APC pierde su región central al mutarse el gen. Al no contar APC con esta región, la β -catenina no se une a ella, favoreciendo la permanencia de β -catenina en el citoplasma para su posterior translocación al núcleo de las células.

1.3.3 Axina

La axina es una proteína importante en la formación del "axis" en *Xenopus*, es un regulador negativo ya que al estar mutado el gen, el embrión de *Xenopus* muestra duplicación de este órgano. La axina al igual que APC, es una proteína reguladora de β -catenina; la axina recluta a las proteínas del complejo de degradación, además de servir como plataforma para la unión de estas proteínas, facilitando que la GSK-3 β fosforile a la β -catenina en serinas y treoninas (Luo and Lin S., 2004).

1.3.4 GSK-3 β

La cinasa glicógeno sintetasa 3 β (GSK-3 β) es una serina-treonina cinasa que participa en varias vías de señalización mediadas por la insulina, el EGF y Wnt (Dajani et al., 2003; Diel et al., 1998). Esta cinasa participa en la fosforilación de ciclina D para su ubiquitinación y degradación por el proteasoma. En el caso de β -catenina, la GSK-3 β hiperfosforila a la β -catenina para que sea ubiquitinizada. Una vez formado el complejo Axina-APC/GSK-3 β / β -catenina/CKI, la casein cinasa I (CKI), que también es una serina-treonina cinasa (Gao et al., 2002), inicia la fosforilación de β -catenina en Ser45 para que, posteriormente, la GSK-3 β actué directamente en β -catenina fosforilandola en Ser29, Ser33, Ser37 y Thr41. La fosforilación de β -catenina es esencial para que sea ubiquitinizada y degradada por el proteasoma a través de la β -TrCP ubiquitin ligasa (Aberle et al., 1997).

La ubiquitina es una proteína altamente conservada de 8 kDa que se une covalentemente a residuos de lisina (Haglund and Dikic, 2005). En general, la degradación de proteínas por la maquinaria del proteasoma involucra tres componentes principales: enzimas activadoras de ubiquitina (E1), enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) y ubiquitin ligasas (E3) (Shackelford and Pagano, 2004). La subunidad 19S del proteasoma reconoce a la β -catenina ubiquitinizada, la desubiquitina, e inmediatamente la pasa a la subunidad 20S donde es cortada en pequeños péptidos; todas estas reacciones son dependientes de ATP (Haglund and Dikic, 2005).

La β -catenina además de participar en la adhesión celular también, participa en la vía de señalización de Wnt. Se han realizado estudios dirigidos a relacionar la pérdida de E-cadherina con la activación de la vía Wnt. Se ha demostrado que la función de adhesión de la β -catenina y su función en la activación de la transcripción son eventos mutuamente excluyentes. Cuando se desensambla el complejo de adhesión, muchas veces se pierde también β -catenina, pero al parecer existen diferentes “pools” de β -catenina para las diferentes funciones que realiza en las células (Cavallaro and Christofori, 2004; Christofori and Semb, 1999).

1.3.5 La vía Wnt.

En 1982, Nusse y Varmus identificaron en el ratón al gen *wnt1* que originalmente se llamaba *Int-1* (sitio de integración del virus del tumor mamario). Cuando el gen se secuenció, se encontró que sintetizaba una proteína de secreción rica en cisteínas. Posteriormente se observó que era homólogo al gen de *wingless (wg)* de *Drosophila*, el cual controla el desarrollo larval de la mosca. Más adelante se demostró en *Drosophila* que *wnt-1* activaba una cascada de señalización importante, en la que armadillo (β -catenina en mamíferos) participaba de manera importante. De manera independiente a estos estudios, se descubrió que APC era la responsable de la adenomatosis familiar (FAP) que es un cáncer heredado y que en esta

enfermedad APC interaccionaba con β -catenina, por lo que se asoció a la vía Wnt con el desarrollo del cáncer humano.

Los genes Wnt codifican para una gran familia de glicoproteínas que son secretadas por las células. Estas glicoproteínas están altamente conservadas, contienen residuos de cisteínas y participan en la adhesión, motilidad, polaridad y diferenciación celular durante el desarrollo embrionario (van Es et al., 2003).

En humanos se han identificado 19 genes para estas proteínas, en *Drosophila* 7 y en *C. elegans* 5. Las proteínas Wnt han sido recientemente caracterizadas ya que contienen palmitato (ácido graso de 16 carbonos) unido a los residuos de cisteína, haciendo a estas proteínas más hidrofóbicas (Nusse, 2005). Los receptores para estas proteínas llamados Frizzled (Fz) son moléculas que atraviesan siete veces la membrana, tienen un dominio extracelular amino terminal que se denomina CRD, el cual contiene cisteínas a las que se une la proteína Wnt, y por su región citoplásmica interacciona directamente con la molécula dishevelled (Dsh). Se requiere de un co-receptor llamado LRP que es una proteína transmembranal, miembro de la familia de receptores para lipoproteínas de baja densidad (Fig. 8).

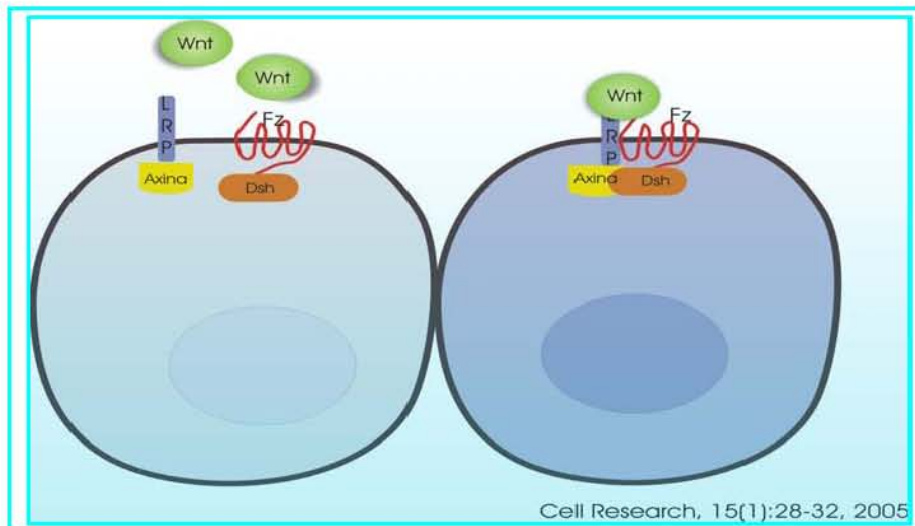


Figura 8. Activación de la vía Wnt.

El ligando wnt favorece la formación del complejo LRP-Fz así como de la interacción a nivel citoplásmico de axina-Dsh. Esta interacción es un evento temprano y decisivo para la transducción de señales intracelulares (Fig. 8) (Jones and Jomary, 2002). Lo anterior impide que la axina participe en la degradación de β -catenina.

Cuando se lleva a cabo la interacción de Wnt con Fz y LRP se pueden activar tres distintas vías: la vía Wnt/ Ca^{2+} , la vía de la polaridad planar celular (PCP) y la llamada vía canónica Wnt/ β -catenina.

1.3.6 La vía Wnt/ Ca^{2+}

La vía Wnt/ Ca^{2+} activa a la fosfolipasa C, con lo que se elevan los niveles de Ca^{2+} intracelular y se activa la protein cinasa C y la protein cinasa calmodulina Ca^{2+} dependiente tipo II. Los elevados niveles de Ca^{2+} activan a la calcineurina

fosfatasa que desfosforila al factor de transcripción NF/AT, el cual se acumula en el núcleo, activando genes para el desarrollo embrionario en *Xenopus*. Esta vía no se ha identificado en seres humanos (Saneyoshi et al., 2002).

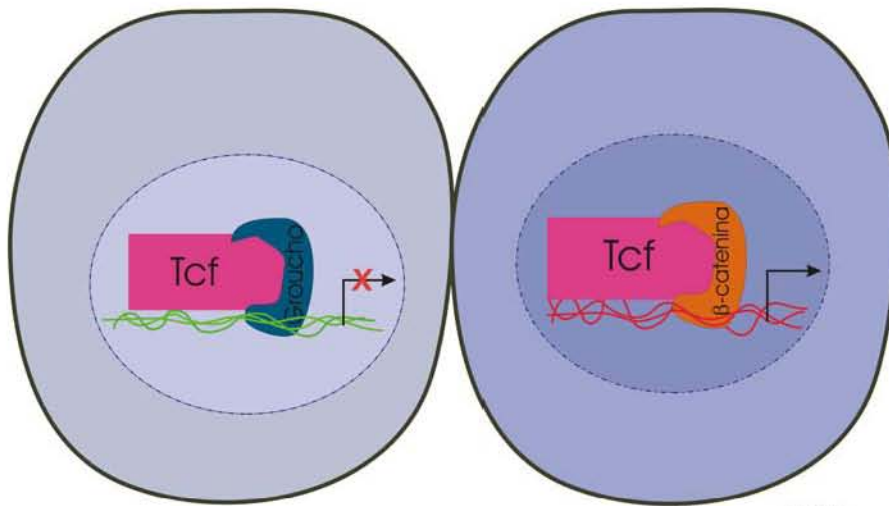
1.3.7 La vía PCP

La polaridad celular es un evento importante en la estructura de ciertas células como las epiteliales y las neuronales. En mamíferos, este suceso se ha estudiado en las células productoras de cabello. Al parecer, la vía PCP es muy parecida en mamíferos y en *Drosophila* donde fue inicialmente reportada. En esta vía participan Wnt y Fz, pero se activan GTPasas como son RhoA y Rac, las cuales activan a la cinasa Jun amino terminal-C (JNK). Los genes que se activan en esta vía no han sido aún caracterizados, pero se cree que podrían ser moléculas de adhesión como cadherinas no típicas (Fanto and McNeill, 2004) y moléculas que modifican la organización del citoesqueleto (Korswagen, 2002).

1.3.8 La Vía Clásica Wnt.

La vía de señalización Wnt más estudiada, tanto en invertebrados como en mamíferos es la vía de β -catenina o la vía clásica. Como ya se mencionó y se aprecia en la Fig. 8, cuando se activa la vía Wnt, axina queda secuestrada por los receptores LRP y Fz impidiendo que interaccione y reclute a las otras

proteínas del complejo de degradación como son APC, GSK-3 β , CKI. Al no formarse este complejo, la β -catenina no es fosforilada, por lo que no puede ser degradada por el proteasoma, acumulándose en el citoplasma y entrando a núcleo. Se han descrito varios mecanismos para la entrada de β -catenina al núcleo, uno de ellos es mediado por los sitios de localización nuclear ubicados en el dominio arm de la β -catenina. Otra propuesta es que la β -catenina entra al núcleo unida con Tcf; sin embargo, se ha localizado a la β -catenina en el núcleo en ausencia de Tcf. También se ha propuesto que la β -catenina por su estructura molecular esta relacionada con moléculas tipo importinas/karyoferinas e interacciona directamente con los poros nucleares (Staedeli et al., 2006). La β -catenina también puede ser transportada de regreso al citoplasma por las moléculas Axina o APC ya que poseen una señal de exportación nuclear en sus estructuras moleculares (Rosin-Arbesfeld et al., 2000). Se ha demostrado que la β -catenina nuclear se une a la familia de factores de transcripción de la célula T (Tcf) y factor “enhancer” linfoide (Lef). El sitio de unión de Tcf/Lef es AGATCAAAGG y se encuentra en el surco menor de la doble hélice de DNA, río arriba del promotor. En ausencia de la señal Wnt, Tcf actua como un represor transcripcional formando un complejo con la molécula Groucho.



Nusse, 2006

Figura 9. La β -catenina desplaza a Groucho cuando se activa la vía Wnt.

La interacción de β -catenina con la porción amino terminal de Tcf desplaza a Groucho, lo que convierte al complejo en un activador transcripcional (Fig. 9).

La unión de β -catenina a Tcf/Lef afecta la estructura de la cromatina debido a que el complejo Tcf/ β -catenina recluta proteínas que participan en la remodelación de la cromatina como son la proteínas CBP's (chromatin binding protein) que son coactivadores de acetilasas de histonas y a las desacetilasas de histonas (HDACs), facilitando el acceso a las regiones promotoras.

Se han descrito numerosos genes blanco de Tcf/ β -catenina; entre los de mayor interés en el proceso de carcinogenesis se encuentran MYC, Ciclina D1, FRA1 (factor de transcripción de la familia AP-1), C-JUN, PPAR δ , Matrilisina, CD44 y el receptor para activador de plasminógeno tipo urocinasa (Polakis P., 2000).

se han reportado mutaciones en el gen de axina en el carcinoma hepatocelular (Tien et al., 2005). Las mutaciones del gen de la β -catenina y la localización celular aberrante de β -catenina han sido reportadas en muchos otros tumores, como el de páncreas, mama, en leucemias y en melanomas entre otros (Kudo et al., 2007; Liu and Wu, 2006; Tatsuguchi et al., 2006; Shi et al., 2006; Lim et al., 2006; Furuse et al., 2006; Horvai et al., 2006; Xu et al., 2006; Voutilainen et al., 2006; Puhalla et al., 2005; Rao et al., 2006; Tien et al., 2005a).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CANCER

1.1.1 ORIGEN DEL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad de origen multifactorial que se caracteriza por una proliferación celular anormal excesiva. Una célula normal que ha sufrido una mutación puede originar el desarrollo de un tumor. Las mutaciones pueden ser producidas por distintos agentes: biológicos, químicos o físicos, proporcionándole a la célula pérdida o ganancia de funciones.

1.1.2 CARCINOGENÉISIS

La carcinogénesis (Fig. 1) es el proceso por el cual una célula, a través de cambios genéticos y epigenéticos, se convierte en una célula maligna con capacidad de invadir y generar metástasis. La carcinogénesis se divide en cuatro etapas: iniciación del tumor, promoción, conversión maligna y progresión del tumor (Balmain and Harris, 2007). La iniciación y promoción fueron reconocidas y distinguidas a través de estudios con virus y carcinógenos químicos realizados en roedores. El estudio en humanos es más complejo, ya que influyen otros factores como el estilo de vida y ocupación del individuo, así

como la edad, el género y los antecedentes familiares (Weston and Harris, 2003).

1.1.2.1 Iniciación del tumor

Un carcinógeno químico causa un error genético al modificar la estructura molecular del DNA (Fig. 1) por formación de aductos entre los grupos funcionales del carcinógeno y los del DNA, lo que deriva en una mutación tras la síntesis del DNA. La formación de aductos en el DNA es un requisito pero no es suficiente para la iniciación del tumor. Recientemente, estudios moleculares en tejidos preneoplásicos de pulmón y de colón de origen humano han reportado cambios epigenéticos (metilación del DNA en las regiones promotoras de genes supresores de tumor) como evento muy temprano y contundente en la iniciación del tumor (Weston and Harris, 2003).

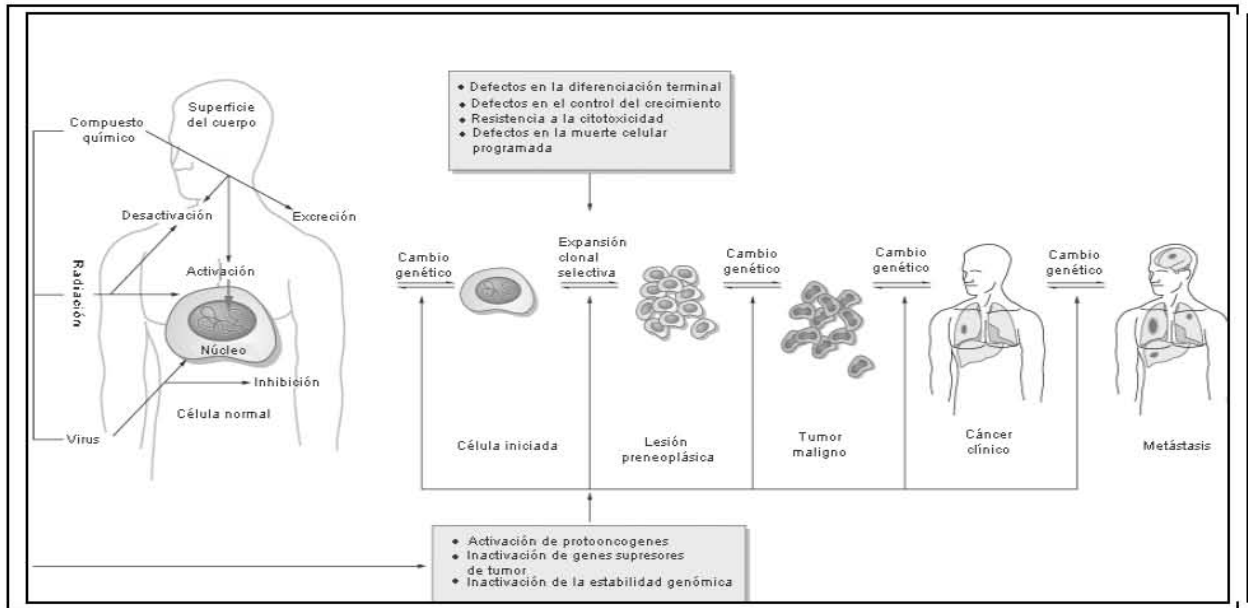


Figura 1. Etapas de la carcinogénesis.

1.1.2.2 Promoción del tumor

En la promoción del tumor se lleva a cabo la expansión clonal de la célula iniciada, produciendo una población de células capaces de transformarse a células malignas (Fig. 1). Las sustancias promotoras de la expansión clonal no son mutagénicas, ni carcinogénicas y median su efecto biológico sin actividad metabólica (Weston and Harris, 2003).

1.1.2.3 Conversión maligna

La transformación de las células iniciadas hacia la expresión de un fenotipo maligno (Fig. 1) se denomina conversión maligna. Este proceso requiere de incrementar los cambios genéticos mediante la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumor (Loeb and Cheng, 1990).

1.1.2.4 Oncogenes y genes supresores de tumor

Los proto-oncogenes son genes que codifican proteínas que participan en la división y diferenciación celular (Pierotti et al., 2003). Los oncogenes son genes mutados a partir de proto-oncogenes. Un oncogen le proporciona a la célula ganancia de función, permitiéndole proliferar de manera descontrolada. Los proto-oncogenes pueden ser genes que codifiquen para: a) Factores de crecimiento como son: el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento transformante beta, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, etc. b) Receptores para los factores de crecimiento indicados anteriormente. c) Transductores de señales como la proteína Ras, que se activa en respuesta a una señal mitótica y que puede activar a otras proteínas para promover la división celular y d) Proteínas que regulan la apoptosis, como la proteína Bcl-2 que muestra actividad anti-apoptótica (Lewin, 2004).

En cambio, los genes supresores de tumor codifican proteínas que inhiben la división celular y al mutarse generan pérdida de función (Park and Volgestein, 2003). Entre ellos se encuentran: a) Genes que controlan la división celular, como es el caso de RB (retinoblastoma), b) Genes involucrados en la

reparación de DNA, como son BRCA1 y BCRA2 y c) Genes que participan en la apoptosis, como P53. Se han propuesto varias hipótesis para explicar la disfuncionalidad de estos genes, como son: a) pérdida de heterocigocidad (del inglés LOH), en la cual la mutación del alelo de un gen es suficiente para iniciar la transformación maligna, b) la hipótesis del doble golpe propuesta por Knudson (Knudson, 1996) que explica la predisposición a padecer cáncer y que plantea la mutación de un alelo en etapa germinal y una mutación somática en el segundo alelo durante la vida del individuo, lo que daría como resultado la iniciación/progresión de un tumor y c) la haplo-insuficiencia, término empleado cuando el producto de un gen es la mitad del nivel normal, ésto puede deberse a varios factores, el más común es el que una de las dos copias de un gen sufra una deleción, lo que lleva a que los niveles del producto del gen supresor de tumor son insuficientes para inhibir la actividad de las proteínas involucradas en la estimulación de la división celular (Macleod, 2000).

1.1.2.5 Progresión del tumor

Como resultado de las alteraciones antes indicadas, algunas células llevan a cabo la expresión del fenotipo maligno y la tendencia a invadir los tejidos

adyacentes (Weston and Harris, 2003). Estas células transformadas alteran el patrón de expresión de las moléculas de adhesión, lo que favorece su separación de las células vecinas y su migración hacia la membrana basal. Además, cuando las células tumorales sintetizan enzimas proteolíticas, pueden degradar la membrana basal y “atravesar” las células endoteliales, llegando así al sistema vascular o linfático por donde viajan y pueden llegar a establecerse en otros órganos, desarrollando tumores secundarios; evento que se conoce como metástasis.

1.1.3 CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón es la forma más común de cáncer en el mundo, tan solo en el año 2000 se considera que surgieron 1.2 millones de nuevos casos (Minna et al., 2002). El tabaquismo es la principal causa del cáncer pulmonar, incrementando en los fumadores el riesgo de esta enfermedad en un 80-90%.

Se ha establecido que la principal causa del cáncer de pulmón es la inhalación de las sustancias químicas carcinogénicas que se encuentran en los productos de la combustión del humo y el alquitrán del cigarrillo (Proctor, 2001). El humo del cigarro contiene una mezcla química de miles de sustancias de las que más de 40 pueden dañar al DNA. De éstas, las más tóxicas son el benzo(a)pireno y las nitrosaminas. Pequeñas dosis de nitrosaminas administradas por vía subcutánea, oral o tópica, causan la aparición predominante de tumores pulmonares en animales de experimentación (Borczuk and Powell, 2007).

Los fumadores no son los únicos que incrementan el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón, también los fumadores pasivos incrementan en un 30% el riesgo de tener esta enfermedad, comparado con las personas que viven en áreas libres del humo de tabaco (Minna et al., 2002). El cáncer de pulmón también se ha asociado con agentes carcinogénicos ocupacionales y ambientales, como son la exposición a asbesto, arsénico, berilio, a los éteres clorometilados, los hidrocarburos aromáticos y al radón.

El cáncer de pulmón se divide histológicamente en dos tipos principales (Panani and Roussos, 2006): el carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) el cual tiene un origen neuroendocrino y el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés). Este último grupo se divide a su vez en: carcinoma epidermoide, el carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma que es la forma más común de cáncer pulmonar en el mundo.

El mejor pronóstico para un paciente con cáncer pulmonar depende del diagnóstico del tumor en un estadio temprano de su evolución, lo que permite su resección quirúrgica y el uso de distintos tipos de terapia, lo que a su vez incrementa en un 50% la sobrevida del paciente a cinco años. Desafortunadamente, los síntomas generados por el carcinoma pulmonar

localizado son generalmente inespecíficos, lo que no permite su diagnóstico temprano; en contraste, el cuadro clínico (tos, pérdida de peso, dolor torácico y disnea) se presenta frecuentemente en los estadios avanzados de la enfermedad, donde ya no es posible realizar resección quirúrgica y el uso de terapia sistémica es paliativa (Martín-Ruiz et al., 2004).

Por lo anterior, el cáncer de pulmón es un importante problema de salud pública a nivel mundial que cada vez se presenta en personas más jóvenes.

Además de que la mayoría de los pacientes son detectados en etapas avanzadas donde las distintas formas de tratamiento sólo proporcionan al paciente una expectativa menor a un año de sobrevida.

1.1.4 CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER

Hanahan y Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000) han propuesto que una célula tumoral presenta seis características principales, indicadas en la Fig. 2, que son: 1) Autosuficiencia para las señales de crecimiento (inciso 1), las células normales requieren señales mitogénicas para poder proliferar, estas señales provienen del microambiente que los rodea. En el caso de las células tumorales, ellas generan sus propias señales mitogénicas, mutando genes como *PTEN* (gen supresor de tumor) que regula el ciclo celular o como *P14* (inhibidor del ciclo celular) por lo que ya no pueden llevar a cabo su función; lo anterior permite a las células ganar independencia en su propia proliferación. 2)

Insensibilidad a las señales que regulan el crecimiento (inciso 2). En un tejido normal, las señales antiproliferativas generadas por el microambiente impiden a las células proliferar de manera autónoma. En un cáncer inicial, estas señales pueden ser evadidas por las células tumorales, mutaciones generalmente en *Rb* mantienen a esta proteína fosforilada permitiéndole a la célula transformada avanzar a la fase G1 del ciclo celular y proliferar; otras moléculas que permanecen activadas constantemente son la RARB2 que pertenece a la familia de receptores de ácido retinoico y P16 que participa en el ciclo celular.

3) Evasión de la apoptosis (inciso 3), la resistencia a la apoptosis puede ser adquirida por las células tumorales a través de varias estrategias, una de ellas es la mutación del regulador proapoptótico *P53*, el cual es un censor de daño al DNA y si se encuentra mutado no puede iniciar la apoptosis; también se ha encontrado nula actividad de Apaf-1 que es un componente del apoptosoma y al estar ausente inhibe la apoptosis.

4) Potencial replicativo ilimitado (inciso 4), independientemente de la autonomía que tenga una célula para proliferar tiene un límite para hacerlo, pero las células tumorales han podido llegar a la inmortalización, es decir a dividirse infinitamente. En muchos casos, esto se debe a la presencia de la enzima telomerasa, la cual esta presente en el 85 a 90% de todos los tumores, proporcionándole a la célula un potencial replicativo ilimitado. También la presencia constante de ciclina D2 permite que la célula tenga un potencial replicativo ilimitado.

5) Angiogénesis sostenida (inciso 5), el nuevo tumor necesita oxígeno y nutrientes para poder desarrollarse, por lo que

secreta factores solubles como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento para fibroblastos (FGF1 y FGF2). También secreta proteasas para degradar moléculas anti-angiogénicas como la plasmina que degrada a la angiostastina; lo anterior para desarrollar una nueva vascularización que permita el crecimiento del tumor.

CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER

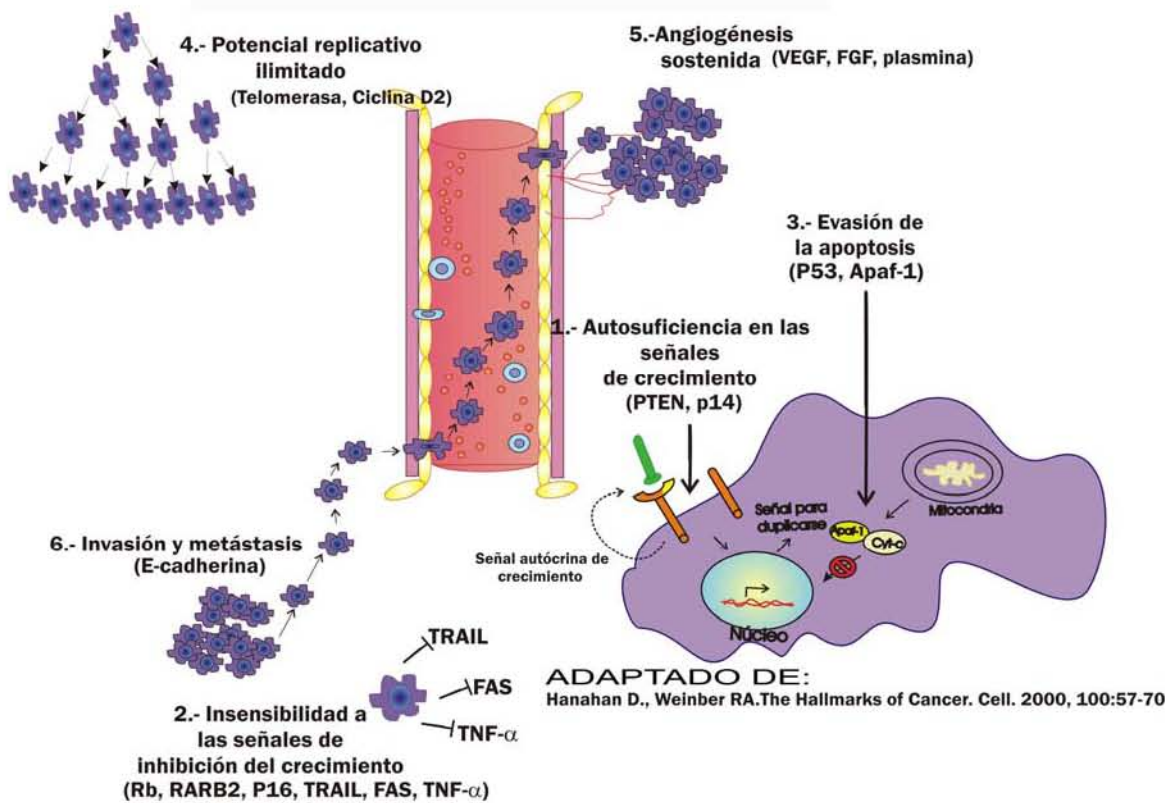


Figura 2. Características del cáncer

1.1.4.1 Invasión y metástasis (inciso 6)

Los procesos de invasión y de metástasis son muy complejos y permiten al tumor primario invadir el tejido aledaño (invasión) así como órganos a distancia (metástasis), lo que causa finalmente la muerte de los pacientes con cáncer

(Hanahan and Weinberg, 2000). Las *moléculas de adhesión* juegan un papel primordial en la invasión y la metástasis de los tumores.

1.2 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Las moléculas de adhesión son glicoproteínas transmembranales que llevan a cabo uniones en la superficie celular y determinan la especificidad de reconocimiento entre célula-célula (Fig. 3) (CAM's) y célula-matriz extracelular (SAM's) (Siu, 1996b). Estas interacciones regulan procesos relacionados con la forma y polaridad de la célula lo que determina la arquitectura del tejido, así mismo activan la motilidad celular y pueden inducir la expresión de factores de crecimiento y de proliferación celular.

Las moléculas de adhesión de superficie celular se agrupan de acuerdo a su similitud estructural en cuatro familias:

1.2.1 Integrinas

Las integrinas son una gran familia de glicoproteínas transmembranales que median uniones célula-célula (CAM's) y célula-matriz extracelular (SAM's) (Brodt and Dedhear, 1996). Las integrinas están formadas por una unidad α y una unidad β . Existen por lo menos 15 cadenas α y 8 cadenas β las cuales pueden interaccionar en una amplia gama de combinaciones. Generalmente se clasifican de acuerdo a su cadena β , pero se prefiere dar una clasificación de acuerdo a su función. Las subunidades β de todas las integrinas son muy

similares entre ellas ya que comparten una secuencia de aminoácidos homóloga con características estructurales específicas bien conservadas en una amplia variedad de especies. Las integrinas juegan un papel importante durante la adhesión-migración, la cual se ha observado principalmente en la extravasación de leucocitos.

1.2.2 Selectinas

Son glicoproteínas transmembranales compuestas por tres dominios extracelulares (Mayadas, 1996). La familia de las selectinas está constituida por tres moléculas relacionadas, la P-selectina que se localiza en las plaquetas, la L-selectina, que se localiza en los leucocitos y la E-selectina se localiza en las células endoteliales. Las selectinas median las interacciones heterotípicas entre células sanguíneas y células endoteliales, en el proceso de anclaje y adhesión del leucocito, lo que le permite al leucocito “rodar” a través del endotelio vascular en dirección del flujo sanguíneo.

1.2.3 Superfamilia de las inmunoglobulinas

Los miembros que integran esta familia de moléculas poseen en común una estructura homóloga a las inmunoglobulinas, que consiste de 70 a 110 aminoácidos organizados en dos cadenas paralelas β -plegadas y estabilizadas por puentes disulfuro (Siu, 1996a). Entre ellos se encuentran las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), el receptor de la célula T, el

receptor para el factor de crecimiento de plaquetas, etc; así como otras moléculas importantes de adhesión celular como: la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM), la molécula de adhesión celular vascular (VCAM), las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3), etc.

1.2.4 Cadherinas

Las cadherinas participan en dos distintos tipos de uniones célula-célula (Fig. 3), se encuentran formando parte las de uniones adherentes y de los desmosomas.

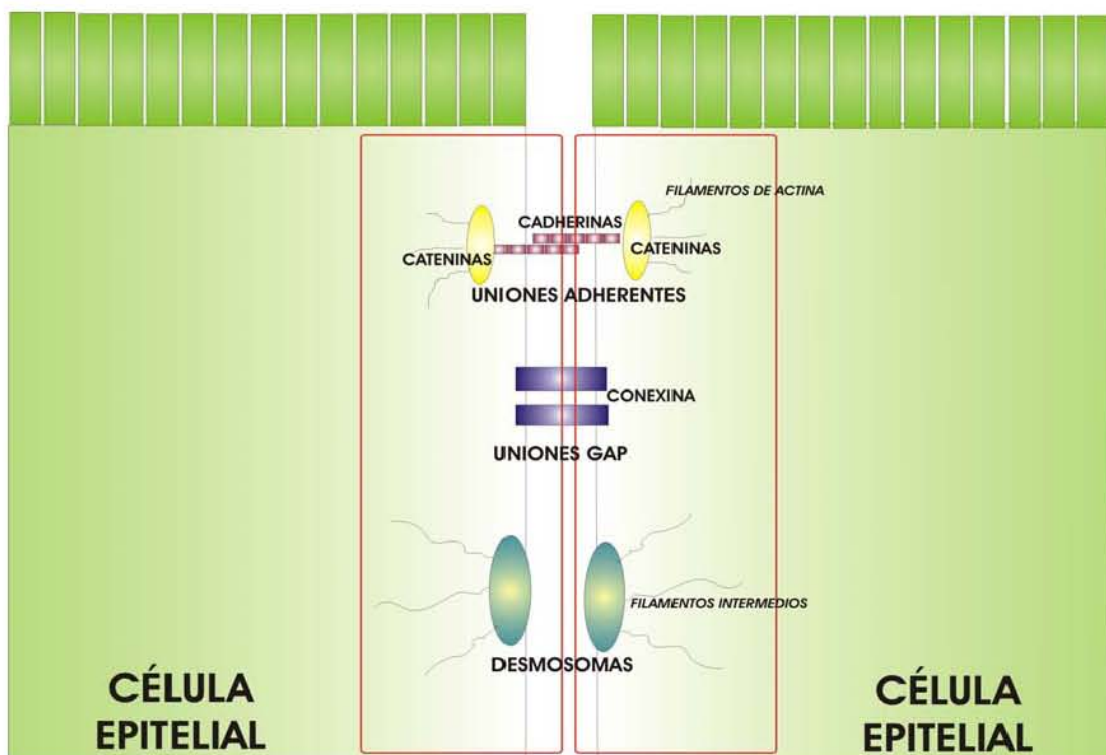


Figura 3. Uniones célula-célula.

Las cadherinas son proteínas glicosiladas y evolutivamente bien conservadas. Dentro de la familia de las cadherinas se encuentran las cadherinas clásicas

que son tejido específicas, así la E-cadherina se localiza en epitelio, la N-cadherina en sistema nervioso, la P-cadherina en placenta.

La E-cadherina se localiza en la región basolateral de las células epiteliales (uniones adherentes) y es de gran importancia en el desarrollo del tejido en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Rowlands et al., 2000) ya que mantiene el contacto célula-célula y la estructura tridimensional del tejido.

La E-cadherina (Fig. 4), miembro de las cadherinas clásicas, consta de cinco dominios extracelulares, un dominio transmembranal y dos dominios citoplásmicos altamente conservados que asocian proteínas intracelulares conocidas como cateninas. Las cadherinas promueven la adhesión célula-célula de forma homofílica; es decir, la E-cadherina se une selectivamente a otra E-cadherina formando una estructura de zipper entre las células. Los dominios extracelulares están altamente conservados y unen calcio. El calcio confiere a la proteína un cambio conformacional que la inmoviliza (Fig. 4) (Beavon, 2000; Steinberg and McNutt, 1999). La E-cadherina, a través de los dominios citoplásmicos se une con otras moléculas intracelulares conocidas como cateninas (cadena) que son indispensables para que se lleve a cabo la adhesión celular. La β -catenina se une directamente al dominio citoplásmico de la E-cadherina y a la vez se une a la α -catenina, la que se une a los filamentos de actina y en conjunto forman el complejo de adhesión (Beavon, 2000).

En el humano, muchos cánceres tienen origen en el tejido epitelial. Se ha observado que la E-cadherina pierde su expresión a medida que progresa la malignidad del tumor (Hirohashi and Kanai, 2003). Basados en datos descriptivos y funcionales, se ha propuesto que la pérdida de E-cadherina es un prerequisite para que las células tumorales invadan y lleven a cabo la metástasis. Se ha demostrado que el reestablecimiento del complejo de adhesión E-cadherina-cateninas resulta en una regresión del fenotipo maligno (mesenquimatoso invasivo) a un fenotipo epitelial benigno. Se ha llegado a la conclusión de que la pérdida de E-cadherina es uno de los pasos iniciales en la progresión del adenoma a carcinoma y subsecuente formación de metástasis. Por lo anterior, se ha considerado al gen de la E-cadherina como un gen supresor de tumor. Se ha demostrado que la reducida o nula expresión de E-cadherina en los tumores puede deberse a: hipermetilación, rearrreglos en la estructura de la cromatina o pérdida del factor de transcripción para el gen de E-cadherina. Estos eventos coinciden con la supresión en la actividad del promotor del gen de la E-cadherina en los tumores. En general, el promotor del gen para E-cadherina (*CDH1*) se encuentra hipermetilado en el 83% de los tumores (Christofori and Semb, 1999). Otra causa de la baja expresión de E-cadherina son mutaciones (deleciones o inserciones) que se presentan en el gen y que alteran el marco de lectura del gen, produciendo una proteína truncada (Kremer et al., 2003).



Figura 4. Estructura de E-cadherina. CITO: citoplasma, TM: transmembranal, β -cat: sitio de unión a β -catenina.

En otro aspecto, se ha reportado una degradación de E-cadherina por metaloproteasas de matriz extracelular, ya que algunas líneas tumorales liberan fragmentos solubles de E-cadherina.

Receptores con actividad de tirosin cinasas tales como el receptor de crecimiento epidermal (EGFR), el receptor de crecimiento de hepatocitos (HGFR) y el receptor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), que generalmente se encuentran activos en los tumores, provocan que el complejo de adhesión E-cadherina-cateninas se desensamble ya que inducen la fosforilación de tirosinas en la E-cadherina y en la β -catenina (Thomson et al., 2005).

1.2.4.1 Complejo de adhesión

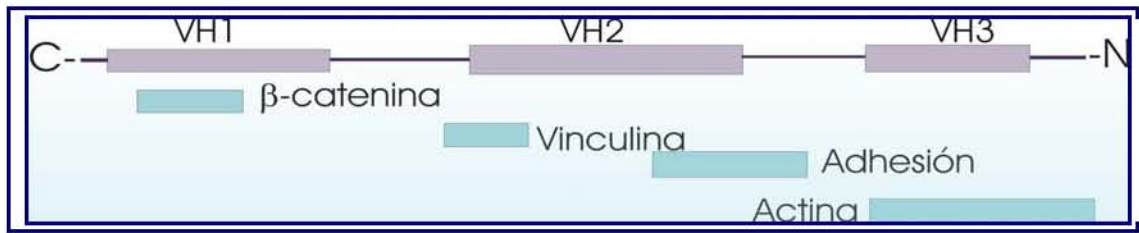
Como se indicó anteriormente, este complejo esta formado por E-cadherina, β -catenina y α -catenina, es calcio dependiente y se asocia con los filamentos de actina.

1.2.4.2 La α -catenina

La α -catenina (Fig. 5) es una proteína de 102 kDa que está unida por su extremo carboxilo terminal a la β -catenina y por su región amino terminal a los filamentos de actina. Se ha observado que las células que no expresan α -catenina no forman uniones adherentes estables (Provost and Rimm, 1999).

La α -catenina puede formar interacciones binarias con distintas proteínas, incluida la vinculina, la α -actinina, la spectrina, ZO-1, la afadina, etc. Estas interacciones se han demostrado mediante ensayos de co-inmunoprecipitación o empleando proteínas recombinantes.

Estudios realizados con α -catenina, E-cadherina o β -catenina quiméricas han demostrado que existe una unión excluyente de α -catenina con β -catenina y α -catenina con actina, por lo que recientemente se ha considerado que la unión del complejo de adhesión E-cadherina-cateninas con actina pudiera ser mediado por alguna de las proteínas antes mencionadas como son: la vinculina, la α -actinina, la spectrina, ZO-1, la afadina, etc. (Weis and Nelson, 2006).



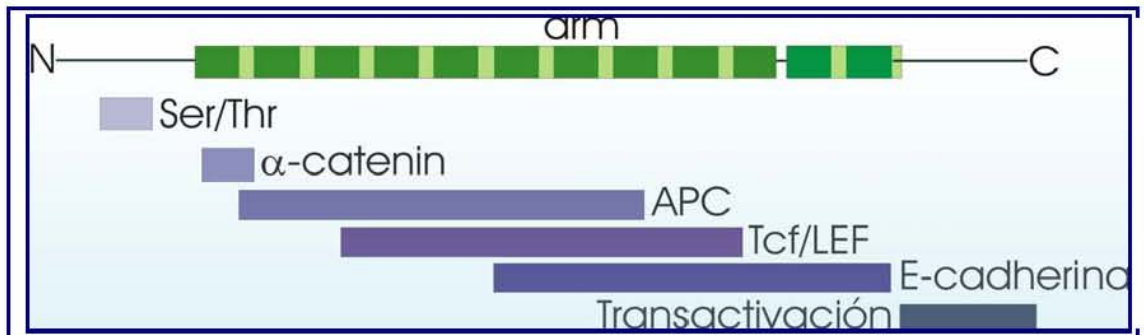
Curr Op Cell Biol 1999, 11:567-572

Figura 5: Estructura de α -catenina. β -catenina: sitio de unión a β -catenina, Adhesión: dominio regulador de adhesión, Vinculina y Actina: sitios por donde se une al citoesqueleto.

1.3 LA β -CATENINA

La proteína β -catenina juega un papel dual en las células, actúa como molécula de adhesión entre las células epiteliales y, en el núcleo actúa como un factor transcripcional. La β -catenina fue descubierta como parte del complejo de adhesión al co-precipitar con E-cadherina.

La β -catenina es una proteína de 97 kDa y su estructura primaria consta de 130 aminoácidos en la región amino terminal, con 12 repeticiones de 42 aminoácidos en la región central que se conocen como repeticiones arm (Armadillo), y que comparte con otras proteínas como la p120 y la adenomatous polyposis coli (APC); además tiene 100 aminoácidos en la región carboxilo terminal. La β -catenina tiene una estructura tridimensional parecida a una campana, donde el extremo amino y el carboxilo se encuentran muy cercanos. Diversas proteínas, con funciones mutuamente excluyentes, se unen a la región armadillo (Fig. 6).



Curr Op Cell Biol 1999, 11:567-572

Figura 6: Estructura de β -catenina. Ser/Thr: sitio de fosforilación para ubiquitinización, α -catenina: sitio de unión a α -catenina, APC: sitio de unión a APC, Tcf/LEF: sitio de unión a los factores de transcripción de la familia Tcf/LEF, E-cadherina: sitio por el cual se une a E-cadherina y transactivación: sitio de unión al DNA.

La función del complejo E-cadherina-cateninas es regulada por la fosforilación de la β -catenina. La β -catenina al fosforilarse en tirosinas por la cinasa Fer, se disocia de α -catenina; pero si es fosforilada por Src o por el EGFR, entonces se disocia de E-cadherina. Se ha demostrado que la β -catenina disociada del complejo de adhesión, es ubiquitinizada y degradada por el proteasoma (Fig. 7). Estos eventos ocurren de manera posterior a la participación de un complejo proteico formado por axina, el producto del gen APC y la serin-treonin cinasa GSK-3 β .

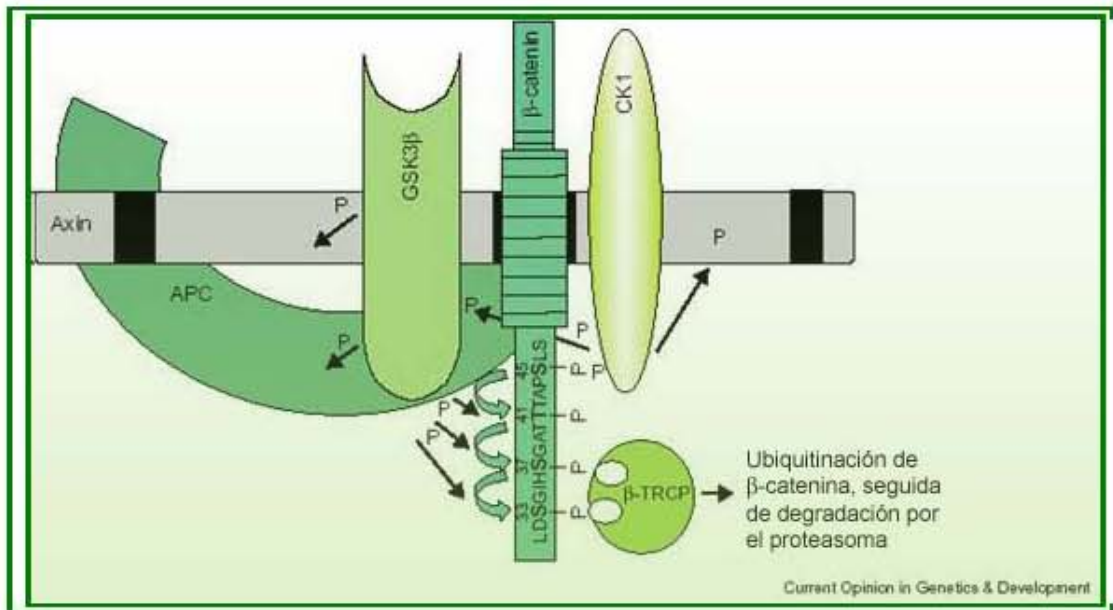


Figura 7. Formación del complejo proteico propuesto para la fosforilación y ubiquitinación de β-catenina.

1.3.1 El complejo Axina, APC y GSK-3β

En la formación de este complejo, axina actúa como proteína acarreadora; es decir, recluta tanto a APC como a GSK-3β promoviendo la fosforilación de β-catenina en serinas y treoninas, tras lo cual se ubiquitina y es degradada por el proteasoma (figura 7).

1.3.2 APC

La proteína adenomatous polyposis coli (APC) es una proteína de 350 kDa y contiene diversos dominios por los que interacciona con muchas otras proteínas. Las mutaciones germinales en el gen para APC son responsables de la poliposis adenomatosa, enfermedad que si no es tratada a tiempo deriva en cáncer de colón. Por lo que en cáncer de colón, la proteína APC se encuentra

mutada en el 80% de los casos. Las mutaciones en el gen para APC dan como resultado una proteína truncada que no puede llevar a cabo su función (Fearbhead et al., 2001). Se ha encontrado que APC participa en la organización de los cinetocoros durante la mitosis, además se le ha localizado formando parte del citoesqueleto nuclear y de los microtúbulos, aunque se desconoce su participación en estos sitios (Mimori-Kiyosue and Tsikita, 2001). La función más estudiada de APC es la regulación negativa de la β -catenina. La APC pierde su región central al mutarse el gen. Al no contar APC con esta región, la β -catenina no se une a ella, favoreciendo la permanencia de β -catenina en el citoplasma para su posterior translocación al núcleo de las células.

1.3.3 Axina

La axina es una proteína importante en la formación del "axis" en *Xenopus*, es un regulador negativo ya que al estar mutado el gen, el embrión de *Xenopus* muestra duplicación de este órgano. La axina al igual que APC, es una proteína reguladora de β -catenina; la axina recluta a las proteínas del complejo de degradación, además de servir como plataforma para la unión de estas proteínas, facilitando que la GSK-3 β fosforile a la β -catenina en serinas y treoninas (Luo and Lin S., 2004).

1.3.4 GSK-3 β

La cinasa glicógeno sintetasa 3 β (GSK-3 β) es una serina-treonina cinasa que participa en varias vías de señalización mediadas por la insulina, el EGF y Wnt (Dajani et al., 2003; Diel et al., 1998). Esta cinasa participa en la fosforilación de ciclina D para su ubiquitinación y degradación por el proteasoma. En el caso de β -catenina, la GSK-3 β hiperfosforila a la β -catenina para que sea ubiquitinizada. Una vez formado el complejo Axina-APC/GSK-3 β / β -catenina/CKI, la casein cinasa I (CKI), que también es una serina-treonina cinasa (Gao et al., 2002), inicia la fosforilación de β -catenina en Ser45 para que, posteriormente, la GSK-3 β actué directamente en β -catenina fosforilandola en Ser29, Ser33, Ser37 y Thr41. La fosforilación de β -catenina es esencial para que sea ubiquitinizada y degradada por el proteasoma a través de la β -TrCP ubiquitin ligasa (Aberle et al., 1997).

La ubiquitina es una proteína altamente conservada de 8 kDa que se une covalentemente a residuos de lisina (Haglund and Dikic, 2005). En general, la degradación de proteínas por la maquinaria del proteasoma involucra tres componentes principales: enzimas activadoras de ubiquitina (E1), enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) y ubiquitin ligasas (E3) (Shackelford and Pagano, 2004). La subunidad 19S del proteasoma reconoce a la β -catenina ubiquitinizada, la desubiquitina, e inmediatamente la pasa a la subunidad 20S donde es cortada en pequeños péptidos; todas estas reacciones son dependientes de ATP (Haglund and Dikic, 2005).

La β -catenina además de participar en la adhesión celular también, participa en la vía de señalización de Wnt. Se han realizado estudios dirigidos a relacionar la pérdida de E-cadherina con la activación de la vía Wnt. Se ha demostrado que la función de adhesión de la β -catenina y su función en la activación de la transcripción son eventos mutuamente excluyentes. Cuando se desensambla el complejo de adhesión, muchas veces se pierde también β -catenina, pero al parecer existen diferentes “pools” de β -catenina para las diferentes funciones que realiza en las células (Cavallaro and Christofori, 2004; Christofori and Semb, 1999).

1.3.5 La vía Wnt.

En 1982, Nusse y Varmus identificaron en el ratón al gen *wnt1* que originalmente se llamaba *Int-1* (sitio de integración del virus del tumor mamario). Cuando el gen se secuenció, se encontró que sintetizaba una proteína de secreción rica en cisteínas. Posteriormente se observó que era homólogo al gen de *wingless (wg)* de *Drosophila*, el cual controla el desarrollo larval de la mosca. Más adelante se demostró en *Drosophila* que *wnt-1* activaba una cascada de señalización importante, en la que armadillo (β -catenina en mamíferos) participaba de manera importante. De manera independiente a estos estudios, se descubrió que APC era la responsable de la adenomatosis familiar (FAP) que es un cáncer heredado y que en esta

enfermedad APC interaccionaba con β -catenina, por lo que se asoció a la vía Wnt con el desarrollo del cáncer humano.

Los genes Wnt codifican para una gran familia de glicoproteínas que son secretadas por las células. Estas glicoproteínas están altamente conservadas, contienen residuos de cisteínas y participan en la adhesión, motilidad, polaridad y diferenciación celular durante el desarrollo embrionario (van Es et al., 2003).

En humanos se han identificado 19 genes para estas proteínas, en *Drosophila* 7 y en *C. elegans* 5. Las proteínas Wnt han sido recientemente caracterizadas ya que contienen palmitato (ácido graso de 16 carbonos) unido a los residuos de cisteína, haciendo a estas proteínas más hidrofóbicas (Nusse, 2005). Los receptores para estas proteínas llamados Frizzled (Fz) son moléculas que atraviesan siete veces la membrana, tienen un dominio extracelular amino terminal que se denomina CRD, el cual contiene cisteínas a las que se une la proteína Wnt, y por su región citoplásmica interacciona directamente con la molécula dishevelled (Dsh). Se requiere de un co-receptor llamado LRP que es una proteína transmembranal, miembro de la familia de receptores para lipoproteínas de baja densidad (Fig. 8).

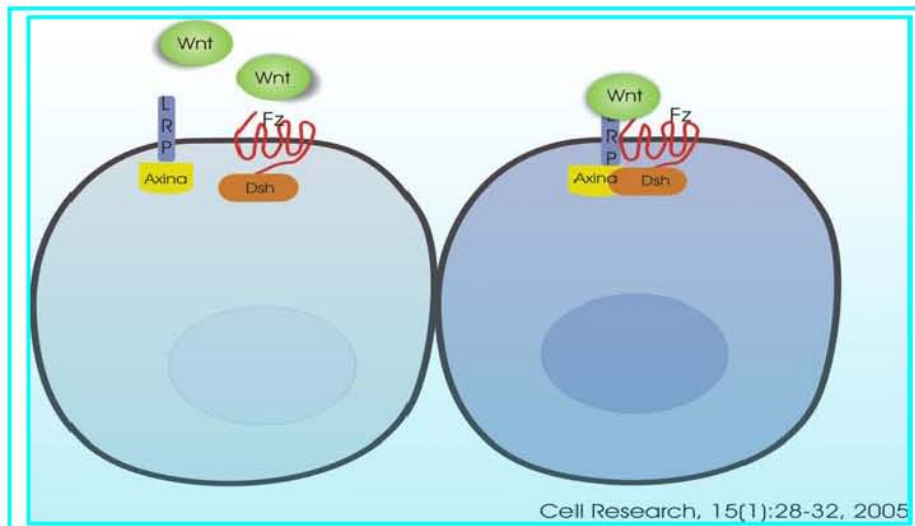


Figura 8. Activación de la vía Wnt.

El ligando wnt favorece la formación del complejo LRP-Fz así como de la interacción a nivel citoplásmico de axina-Dsh. Esta interacción es un evento temprano y decisivo para la transducción de señales intracelulares (Fig. 8) (Jones and Jomary, 2002). Lo anterior impide que la axina participe en la degradación de β -catenina.

Cuando se lleva a cabo la interacción de Wnt con Fz y LRP se pueden activar tres distintas vías: la vía Wnt/ Ca^{2+} , la vía de la polaridad planar celular (PCP) y la llamada vía canónica Wnt/ β -catenina.

1.3.6 La vía Wnt/ Ca^{2+}

La vía Wnt/ Ca^{2+} activa a la fosfolipasa C, con lo que se elevan los niveles de Ca^{2+} intracelular y se activa la protein cinasa C y la protein cinasa calmodulina Ca^{2+} dependiente tipo II. Los elevados niveles de Ca^{2+} activan a la calcineurina

fosfatasa que desfosforila al factor de transcripción NF/AT, el cual se acumula en el núcleo, activando genes para el desarrollo embrionario en *Xenopus*. Esta vía no se ha identificado en seres humanos (Saneyoshi et al., 2002).

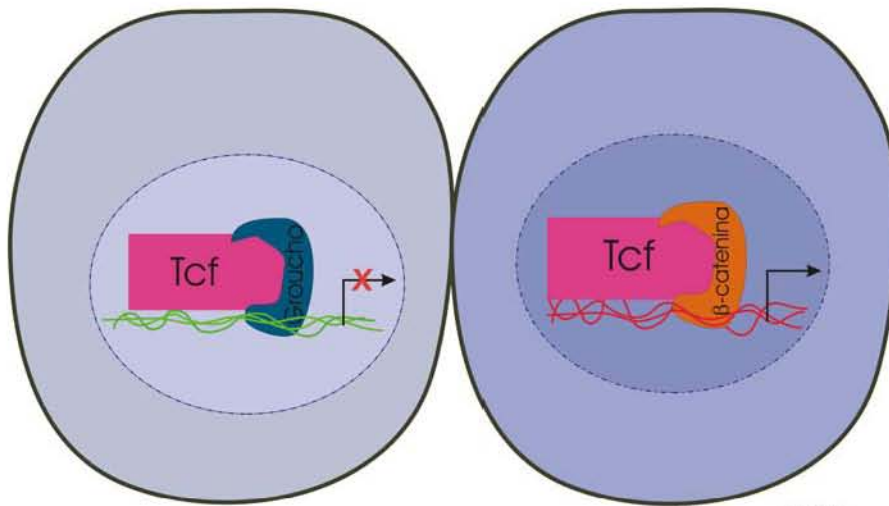
1.3.7 La vía PCP

La polaridad celular es un evento importante en la estructura de ciertas células como las epiteliales y las neuronales. En mamíferos, este suceso se ha estudiado en las células productoras de cabello. Al parecer, la vía PCP es muy parecida en mamíferos y en *Drosophila* donde fue inicialmente reportada. En esta vía participan Wnt y Fz, pero se activan GTPasas como son RhoA y Rac, las cuales activan a la cinasa Jun amino terminal-C (JNK). Los genes que se activan en esta vía no han sido aún caracterizados, pero se cree que podrían ser moléculas de adhesión como cadherinas no típicas (Fanto and McNeill, 2004) y moléculas que modifican la organización del citoesqueleto (Korswagen, 2002).

1.3.8 La Vía Clásica Wnt.

La vía de señalización Wnt más estudiada, tanto en invertebrados como en mamíferos es la vía de β -catenina o la vía clásica. Como ya se mencionó y se aprecia en la Fig. 8, cuando se activa la vía Wnt, axina queda secuestrada por los receptores LRP y Fz impidiendo que interaccione y reclute a las otras

proteínas del complejo de degradación como son APC, GSK-3 β , CKI. Al no formarse este complejo, la β -catenina no es fosforilada, por lo que no puede ser degradada por el proteasoma, acumulándose en el citoplasma y entrando a núcleo. Se han descrito varios mecanismos para la entrada de β -catenina al núcleo, uno de ellos es mediado por los sitios de localización nuclear ubicados en el dominio arm de la β -catenina. Otra propuesta es que la β -catenina entra al núcleo unida con Tcf; sin embargo, se ha localizado a la β -catenina en el núcleo en ausencia de Tcf. También se ha propuesto que la β -catenina por su estructura molecular esta relacionada con moléculas tipo importinas/karyoferinas e interacciona directamente con los poros nucleares (Staedeli et al., 2006). La β -catenina también puede ser transportada de regreso al citoplasma por las moléculas Axina o APC ya que poseen una señal de exportación nuclear en sus estructuras moleculares (Rosin-Arbesfeld et al., 2000). Se ha demostrado que la β -catenina nuclear se une a la familia de factores de transcripción de la célula T (Tcf) y factor “enhancer” linfoide (Lef). El sitio de unión de Tcf/Lef es AGATCAAAGG y se encuentra en el surco menor de la doble hélice de DNA, río arriba del promotor. En ausencia de la señal Wnt, Tcf actua como un represor transcripcional formando un complejo con la molécula Groucho.



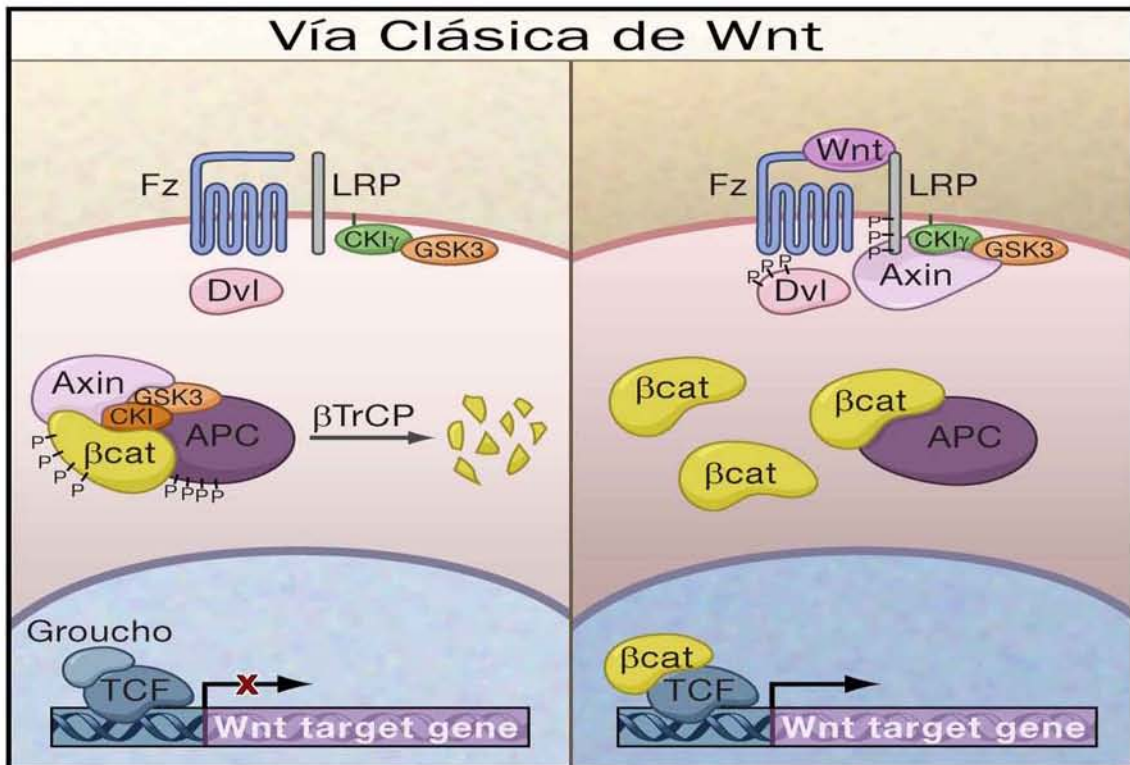
Nusse, 2006

Figura 9. La β -catenina desplaza a Groucho cuando se activa la vía Wnt.

La interacción de β -catenina con la porción amino terminal de Tcf desplaza a Groucho, lo que convierte al complejo en un activador transcripcional (Fig. 9).

La unión de β -catenina a Tcf/Lef afecta la estructura de la cromatina debido a que el complejo Tcf/ β -catenina recluta proteínas que participan en la remodelación de la cromatina como son la proteínas CBP's (chromatin binding protein) que son coactivadores de acetilasas de histonas y a las desacetilasas de histonas (HDACs), facilitando el acceso a las regiones promotoras.

Se han descrito numerosos genes blanco de Tcf/ β -catenina; entre los de mayor interés en el proceso de carcinogenesis se encuentran MYC, Ciclina D1, FRA1 (factor de transcripción de la familia AP-1), C-JUN, PPAR δ , Matrilisina, CD44 y el receptor para activador de plasminógeno tipo urocinasa (Polakis P., 2000).



Clevers, H. 2006. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469-480.

Figura 10. La vía clásica de Wnt.

1.3.9 La β -catenina en cáncer

La capacidad de β -catenina de translocarse al núcleo y activar la transcripción de genes que regulan el crecimiento celular, fue lo que permitió la asociación de β -catenina con el cáncer. La localización y estabilidad de β -catenina en el citoplasma y el núcleo de las células depende de las mutaciones de otros componentes de la vía Wnt y de las mutaciones en la misma β -catenina. El gen APC fue de los primeros genes supresores en ser estudiado y se encontró que las mutaciones germinales en APC causan cáncer (Kudo et al., 2007). En algunos casos de cáncer colorectal, cuando no se encuentra mutado el gen de APC, se ha encontrado mutado el gen de Axina (Liu and Wu, 2006). También

se han reportado mutaciones en el gen de axina en el carcinoma hepatocelular (Tien et al., 2005). Las mutaciones del gen de la β -catenina y la localización celular aberrante de β -catenina han sido reportadas en muchos otros tumores, como el de páncreas, mama, en leucemias y en melanomas entre otros (Kudo et al., 2007; Liu and Wu, 2006; Tatsuguchi et al., 2006; Shi et al., 2006; Lim et al., 2006; Furuse et al., 2006; Horvai et al., 2006; Xu et al., 2006; Voutilainen et al., 2006; Puhalla et al., 2005; Rao et al., 2006; Tien et al., 2005a).

2. ANTECEDENTES

La β -catenina al ser una proteína con dos funciones ampliamente reconocidas como son la de adhesión celular y la de transcripción puede encontrarse en diferentes compartimentos subcelulares. En tumores como el de colón, hígado, ovario, mama y en tumores de piel se ha reportado una localización citoplásmica y nuclear de la β -catenina. Estos tumores presentan además mutaciones en los genes que codifican para APC, axina o la propia β -catenina. En estos reportes se ha sugerido que la β -catenina juega un papel importante como activador transcripcional, asociando su actividad a la participación de la vía Wnt.

En el cáncer de pulmón se ha reportado una muy baja frecuencia de mutaciones en el gen de la β -catenina así como una baja tasa de mutación en el gen de APC (Ueda et al., 2001; Shigemitsu et al., 2001). En cáncer de pulmón, la sobreexpresión de la β -catenina se ha asociado con una alta proliferación celular y, de manera contradictoria, se ha asociado con un mejor pronóstico (Hommura et al., 2002). Otros estudios han reportado en adenocarcinoma pulmonar una reducida expresión de β -catenina asociada con un pobre pronóstico (Kase et al., 2000; Retera et al., 1998). Además, la localización nuclear de la β -catenina es poco frecuente en los subtipos histopatológicos adenocarcinoma y carcinoma epidermoide del cáncer pulmonar (Kase et al., 2000; Mazieres et al., 2005). Por lo anterior, la

importancia de la β -catenina en el desarrollo del cáncer pulmonar es controversial (Mazieres et al., 2005; Salon et al., 2005).

Las controversias que se presentan en torno a la expresión de la β -catenina en cáncer de pulmón se deben también a que la β -catenina desempeña un papel

importante en la adhesión celular, como se estudio inicialmente. Se ha

reportado una expresión reducida de E-cadherina y β -catenina en la displasia

intrabronquial y en la hiperplasia alveolar atípica comparado con el tejido

bronquial normal (Awaya et al., 2005). Las etapas de desarrollo desde displasia

escamosa hasta carcinoma *in situ* correlacionan con la pérdida de E-cadherina

y β -catenina (Kato et al., 2005). Con estas observaciones se ha propuesto que

la pérdida del complejo E-cadherina- β -catenina es crucial en las etapas

tempranas del cáncer de pulmón y en estadios posteriores del proceso invasivo

del cáncer de pulmón (Salon et al., 2005). Por ejemplo, el carcinoma

bronquioloalveolar bien diferenciado muestra una alta expresión de E-

cadherina y β -catenina en la membrana, mientras que el adenocarcinoma

invasivo muestra un patrón alterado de estos marcadores, lo que demuestra

que la expresión de E-cadherina y β -catenina correlaciona positivamente con el

grado de diferenciación de las células malignas (Awaya et al., 2005). En un estudio inicial por nuestro grupo se ha observado la misma asociación con respecto al patrón de expresión de β -catenina y el grado de diferenciación del carcinoma pulmonar tipo adenocarcinoma. La pérdida, la reducción de la expresión y la redistribución alterada de estos marcadores se asocian con la dediferenciación celular que ocurre en la carcinogénesis pulmonar (Salon et al., 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

Nuestro grupo ha observado una tinción de la β -catenina en la membrana de los carcinomas pulmonares bien diferenciados, mientras que en la mayoría de los cortes histológicos de carcinoma pulmonar pobremente diferenciados, la β -catenina se localizó en el citoplasma de las células. Pretendemos estudiar en las líneas de adenocarcinoma pulmonar la expresión de β -catenina y emplear estas líneas celulares para definir que eventos permiten a la β -catenina encontrarse en el citoplasma. El estudio de la β -catenina en cáncer pulmonar nos permitirá conocer su participación en la biología de este carcinoma.

4. HIPÓTESIS

La localización citoplasmática de la β -catenina en el carcinoma pulmonar pudiera deberse a su asociación con alguna o algunas de las moléculas involucradas en el

complejo de adhesión (E-cadherina o α -catenina) o bien con el complejo de degradación formado por las proteínas APC/axina/GSK3 β .

5. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue investigar los mecanismos que mantienen a la β -catenina localizada en el citoplasma de los carcinomas pulmonares moderados y pobremente diferenciados.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si la β -catenina comparte el mismo patrón de localización con E-cadherina, α -catenina y APC en líneas de carcinoma pulmonar.
2. Determinar la probable asociación de la β -catenina con E-cadherina, α -catenina o APC.
3. Determinar en las células tumorales si la β -catenina presente en el citoplasma se encuentra fosforilada en serina 33.
4. Investigar la probable presencia de la β -catenina en el núcleo celular.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MUESTRAS DE TEJIDO

Cuarenta cortes histológicos embebidos en parafina, obtenidos de autopsias de pacientes con carcinoma pulmonar de células no pequeñas y tejido de pulmón normal adyacente al tumor fueron proporcionados por el Departamento de Patología del INER. Estos tumores se clasificaron histopatológicamente de acuerdo con el criterio de la OMS (Brambilla et al., 2001) en:

Tabla 1. Clasificación histológica de los cortes de carcinoma pulmonar.

<i>Grado de diferenciación</i>	<i>Tipo histológico</i>	
	<i>Adenocarcinoma</i>	<i>Carcinoma epidermoide</i>
Bien diferenciados	10	3
Moderadamente diferenciados	12	3
Pobremente diferenciados	7	5
Total (n)	29	11

7.2 CULTIVOS CELULARES

Se empleó la línea celular MDCK para la localización membranal del complejo de adhesión E-cadherina/cateninas (Sato et al., 2006) y la línea celular SW480 para la localización nuclear de β -catenina. En el estudio se incluyeron las líneas de carcinoma pulmonar: A-427, Calu-1, SKLU-1 y 3.B.1.A. Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich) y 1% de antibióticos. Las líneas celulares se incubaron a 37°C con 5% de CO₂.

7.3 ANTICUERPOS

Para la inmunocitoquímica se emplearon los anticuerpos policlonales anti- β -catenina, anti-APC-C (que reconocen la región carboxilo) y anti-APC-N (que reconoce la región amino de la proteína APC) obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, CA, USA. El anticuerpo monoclonal anti-E-cadherina obtenido de Zymed Technologies, CA, USA. Los anticuerpos secundarios empleados en la inmunocitoquímica fueron anti-conejo, anti-ratón y anti-cabra marcados con biotina de Santa Cruz Biotechnology; así como el complejo estreptoavidina-peroxidasa (strepABCComplex/HRP) de Dako, Glostrup, Denmark. Como sistema revelador se utilizó el peróxido de hidrógeno y la 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) de Sigma Aldrich USA.

Para el western blot se emplearon los anticuerpos primarios antes mencionados además de los anticuerpos policlonales anti-lamina B, anti-actina y anti-residuos

ubiquitinizados, todos de Santa Cruz Biotechnology. También se emplearon los anticuerpos anti-fosfotirosina, anti-fosfoserina, y anti-fosfotreonina del kit Phosphoprotein Antibody sampler pack de la marca Zymed. Los anticuerpos secundarios fueron los mismos que se emplearon en la inmunocitoquímica y la detección fue por quimioluminiscencia mediante el kit ECL Advance de la marca Amersham Biosciences, NJ, USA. Para la inmunofluorescencia se emplearon los anticuerpos policlonales anti β -catenina y anti p- β -catenina que reconoce a la β -catenina fosforilada en serina 33 obtenidos de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos secundarios fueron anti-cabra conjugado con Alexa 594 y anti-conejo conjugado con Alexa 488 de Molecular Probes, CA, USA.

7.4 INMUNOHISTOQUÍMICA

Después de desparafinar y rehidratar los cortes histológicos, se realizó recuperación de antígeno usando amortiguador de citratos (0.01M, pH=6), mediante ebullición constante durante 15 min en un horno de microondas marca Sharp (Sharp carousel). Al finalizar la incubación se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena, los tejidos fueron incubados en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (v/v) en alcohol metílico durante 30 min. La incubación se efectuó a temperatura ambiente. Al final de la misma, las laminillas fueron lavadas con amortiguador salino de fosfatos (PBS). Se bloqueó la unión inespecífica del anticuerpo empleado

incubando los tejidos con un amortiguador de PBS que contenía suero de cerdo al 2% y Tritón X-100 al 0.5% (v/v) a temperatura ambiente por 30 min. Al final de la incubación, las laminillas fueron rotuladas y el área de tejido tratado fue delimitada con un lápiz hidrofóbico (Vector Laboratories, Ontario, Canada).

Los cortes de tejido fueron incubados con 100 μ l de un anticuerpo que reacciona con la región carboxilo terminal de la β -catenina humana. Se emplearon diluciones 1:200 del anticuerpo y el periodo de incubación fue de dos horas en cámara húmeda. Posteriormente, las laminillas fueron lavadas con un amortiguador de PBS conteniendo Tween 20. Los cortes histológicos fueron incubados con 100 μ l del anticuerpo secundario biotinilado, previamente diluido 1:800 en cámara húmeda durante una hora. Después de lavar, las muestras fueron incubadas con 100 μ l del complejo estreptoavidina-biotina-peroxidasa a una dilución 1:150 durante 30 min en cámara húmeda, lavadas y expuestas por 10 min al sustrato-cromógeno. Por último, las laminillas fueron contrateñidas con hematoxilina.

7.4.1 CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados fueron evaluados empleando un microscopio óptico marca Leica modelo CME (Leica Geosystems, Switzerland). De cada caso, se observaron por lo menos cinco campos a un aumento de 40X y 100X. Se evaluó el patrón de localización de la β -catenina en las células neoplásicas y en el epitelio ciliado adyacente.

Como control de la expresión de β -catenina nuclear se utilizaron cortes de hepatocarcinoma celular como lo sugiere el fabricante (Kotsinas et al., 2002).

7.5 INMUNOCITOQUÍMICA

Empleando las líneas celulares MDCK y A-427 se estandarizaron los diferentes anticuerpos primarios y secundarios. La inmunotinción en las laminillas se observó a 40X y 100X en el microscopio Leica y se adquirieron las imágenes con la cámara Leica DC 300.

Se probaron distintas diluciones de los anticuerpos y se establecieron como óptimas las diluciones que se indican en la siguiente tabla:

Tabla 2. Diluciones estandarizadas de los anticuerpos empleados en la inmunocitoquímica.

Anticuerpo primario (Dilución)	Anticuerpo secundario (Dilución)	Complejo ABC (Dilución)
-----------------------------------	-------------------------------------	----------------------------

Anti- β -catenina (1:200)	Cabra anti-conejo (1:300)	1:500
Anti-APC-C (1:200)	Cabra anti-conejo (1:300)	1:500
Anti-APC-N (1:200)	Cabra anti-conejo (1:300)	1:500
Anti-E-cadherina (1:100)	Conejo anti-ratón (1:100)	1:500

7.6 INMUNOPRECIPITACIÓN Y WESTERN BLOT

7.6.1 Obtención de extractos celulares

De las líneas celulares controles así como de la línea de adenocarcinoma A-427 se obtuvieron los siguientes extractos:

7.6.2 Fracción membranal y citoplasmática (proteínas solubles en Tritón X-100)

La monocapa celular a confluencia se lavó con PBS frío para eliminar el medio de cultivo. Se retiró el PBS por aspiración y se agregó PBS frío para separar las células con una espátula de plástico. Se centrifugó a 2500 rpm a 4°C por 10 min. Después se incubó el botón celular con la solución amortiguadora TX (Tian and Phillips, 2002) (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, NaN₃ 0.01%, EDTA 2 mM, NaVO₄ 1mM, leupeptina 10 μ g, aprotinina 25 μ g y Tritón X-1001%) por 30 min. Se

centrifugó a 12000 rpm por 30 min, se recuperó el sobrenadante y se congeló a -70°C hasta su uso. A partir del botón residual se obtuvo la fracción de citoesqueleto.

7.6.3 Fracción de citoesqueleto (proteínas no solubles en Tritón X-100)

El botón celular se incubó nuevamente por 30 min con la solución amortiguadora de TX adicionado con deoxicolato de sodio al 0.5% y SDS al 0.1%. Se centrifugó a 12000 rpm por 30 min y el sobrenadante se congeló a -70°C.

7.6.4 Fracción nuclear

Después de recuperar las células tumorales en PBS, se centrifugaron a 1500 rpm a 4°C por 10 min. El botón celular se lavó con PBS frío centrifugando a 1500 rpm a 4°C durante 10 min. Al botón celular se le añadió la solución amortiguadora A (NaCl 150 mM, MgCl₂ 5mM, KH₂PO₄ 1mM, EGTA 1 mM, DTT 0.2mM, PMSF 1mM, 1% de Tritón X-100). Se agitó, e inmediatamente se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min; el botón se resuspendió en una mezcla 1:1 de solución amortiguadora A y solución amortiguadora B (HEPES 10mM, NaCl 40 mM, MgCl₂ 150 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 1mM, PMSF 0.5 mM y glicerol 25%). Se incubó a 4°C durante 2 h, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. La pastilla nuclear se trató con una mezcla de solución amortiguadora A y de solución

amortiguadora B en proporción 1:1. El extracto se diluyó con un volumen igual de glicerol al 87%. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.7 INMUNOPRECIPITACIÓN

A cada extracto celular se le determinó la concentración de proteínas por el método de micro BCA (Pierce, Rockford, IL, USA). Por cada 500 µg de proteína se adicionó 20 µl de proteína G al 5% (Amersham Biosciences) para eliminar el pegado inespecífico. Se incubó a 4°C por 1 h y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. Al sobrenadante proveniente de este tratamiento se le adicionó 2 µg del anticuerpo anti-β-catenina o 5 µg de anti E-cadherina, se incubó en agitación a 4°C por 4 h. Después de la incubación se adicionó 50 µl de proteína G al 5% y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente se centrifugó a 9000 rpm a 4°C durante 30 min. Se recuperó el complejo Ag-Ac-Proteína G y se lavó tres veces con la solución de lavado (NaCl 150 mM, Tris HCl 20mM, EDTA 1mM, NaVO₄ 0.2 mM, PMSF 0.25 mM) para realizar el Western blot.

7.8 WESTERN BLOT

El complejo Ag-Ac-Proteína G se diluyó en solución de Laemmli (Laemmli, 1970) y se hirvió por 3 min. Se corrió el complejo Ag-Ac-Proteína G en condiciones desnaturizantes en gel de acrilamida/bisacrilamida al 8% a 80V por 2 h. Las proteínas separadas fueron transferidas al papel de nitrocelulosa y se realizó la inmunodetección, probando previamente distintas diluciones de los anticuerpos primarios en las tiras. Las diluciones empleadas de cada anticuerpo se indican a continuación:

Tabla 3. Diluciones estandarizadas de los anticuerpos empleados en western blot.

Anticuerpo primario (Dilución óptima)	Anticuerpo secundario biotinilado (Dilución óptima)	Complejo ABC (Dilución)
Anti β -catenina (1:500)	Cabra anti-conejo (1:500)	1:800
Anti E-cadherina (1:300)	Conejo anti-ratón (1:200)	1:800
Anti α -catenina (1:500)	Cabra anti-conejo (1:500)	1:800
Anti-APC-C (1:500)	Cabra anti-conejo (1:500)	1:800
Anti-APC-N (1:500)	Cabra anti-conejo (1:500)	1:800
Anti-fosfoserina (1:200)	Cabra anti-conejo (1:500)	1:800
Anti-fosfotirosina (1:200)	Conejo anti-ratón (1:200)	1:800
Anti-fosfotreonina (1:200)	Cabra anti-conejo (1:500)	1:800
Anti-actina (1:500)	Cabra anti-conejo (1:500)	1:800

El revelado fue realizado por quimioluminiscencia empleando el kit antes mencionado y la detección se realizó mediante el sistema de imagen ChemiDoc XRS de Bio-Rad Laboratories, CA, USA.

7.9 WESTERN BLOT DE LA FRACCIÓN NUCLEAR

Las fracciones nucleares de la línea SW480 (control) y de la línea de carcinoma pulmonar A-427 se corrieron en un gel en gradiente con un rango de concentración del 5 al 12% de acrilamida/bisacrilamida en condiciones desnaturalizantes a 100 V. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa. Se probaron distintas diluciones de los anticuerpos y las empleadas se muestran a continuación:

Tabla 4. Diluciones estandarizadas para de anticuerpos empleadas en el blot de la fracción nuclear.

Anticuerpo primario (Dilución óptima)	Anticuerpo secundario (Dilución óptima)	Complejo ABC (Dilución)
Anti β -catenina (1:500)	Cabra anti-conejo (1:500)	1:800
Anti Lamina B (1:300)	Conejo anti-cabra (1:500)	1:800
Anti-APC-C (1:500)	Cabra anti-conejo (1:500)	1:800
Anti-APC-N	Cabra anti-conejo	1:100

(1:500)

(1:500)

El revelado y la detección se realizaron por quimioluminiscencia como se indicó previamente.

7.10 INMUNOFLUORESCENCIA

En las líneas SW480 y A-427 se probaron diferentes diluciones de los anticuerpos y finalmente se emplearon:

Tabla 5. Diluciones estandarizadas de los anticuerpos empleados en la inmunofluorescencia.

Anticuerpo primario (Dilución óptima)	Anticuerpo secundario (Dilución óptima)
Anti β -catenina (1:100)	Anti cabra-Alexa 594 (1:100)
Anti p- β -catenina (1:50)	Anti conejo-Alexa 488 (1:50)

El núcleo celular se tiñó con 4',6-diamidino-2-dicloruro de fenilendol (DAPI) de Sigma Aldrich en una dilución 1:100. Las preparaciones se observaron a 100X en el microscopio Leica y se adquirieron las imágenes con la cámara Leica DC 300.

8. RESULTADOS

8.1 INMUNOHISTOQUÍMICA EN CORTES HISTOLÓGICOS DE PACIENTES CON CARCINOMA PULMONAR

El tejido epitelial cilíndrico ciliado pseudoestratificado de pulmón sano así como el tejido epitelial sin alteraciones presente en los carcinomas pulmonares mostraron una localización basolateral de la β -catenina (Fig.11). Los hepatocarcinomas presentaron una localización nuclear de β -catenina, como ha sido reportado previamente (Tien et al., 2005b) (Fig.12).

En los carcinomas pulmonares, tanto los adenocarcinomas como los carcinomas epidermoides bien diferenciados mostraron una localización de β -catenina en la membrana de las células. Los carcinomas moderadamente diferenciados mostraron un patrón de distribución de la β -catenina principalmente en el citoplasma de las células presentando algunos casos una tinción tanto en la membrana como en el citoplasma. En cambio, en los carcinomas pobremente diferenciados, la β -catenina se encontró en el citoplasma o no se observó. Es importante hacer notar que bajo nuestras condiciones de tinción ninguno de los carcinomas estudiados presentaron células malignas con tinción nuclear de β -catenina (Ver: tabla 6 y Fig. 13).

Tabla 6. Expresión de β -catenina en los cortes histológicos de carcinoma pulmonar.

Patrón de localización	Tipo histológico					
	Adenocarcinoma			Carcinoma Epidermoide		
	BD	MD	PD	BD	MD	PD
Membranoso	80%	20%	Negativo	67%	33%	Negativo
Citoplásmico	10%	80%	70%	33%	67%	60%
Nuclear	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
No expresión	10%	Negativo	30%	Negativo	Negativo	40%

BD: Bien diferenciado. MD: Moderadamente diferenciado. PD: Pobremente diferenciado

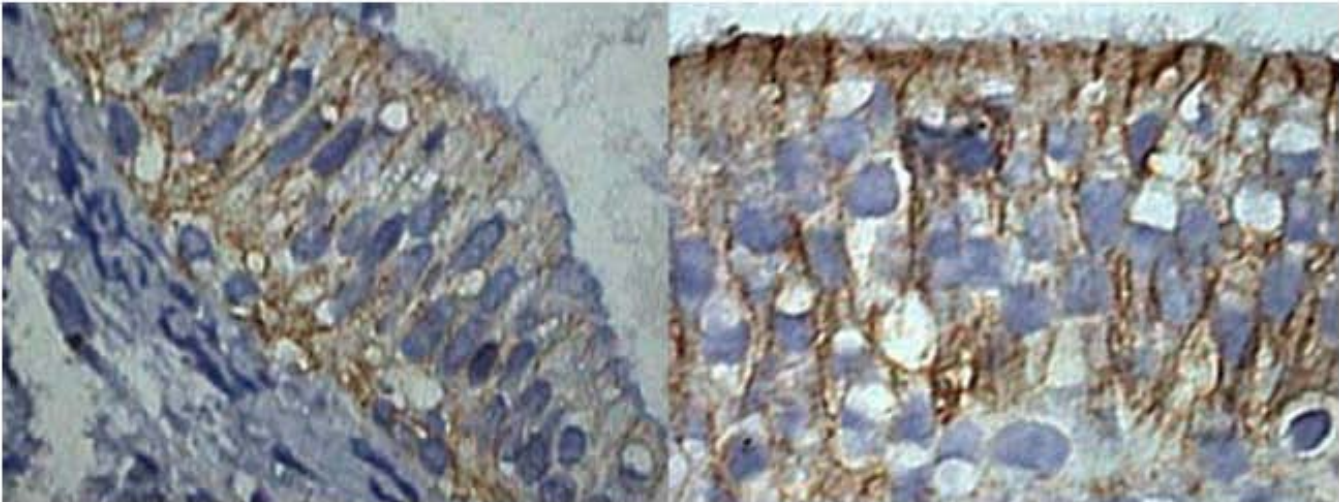


Figura 11. Localización basolateral de β -catenina en tejido epitelial pulmonar.

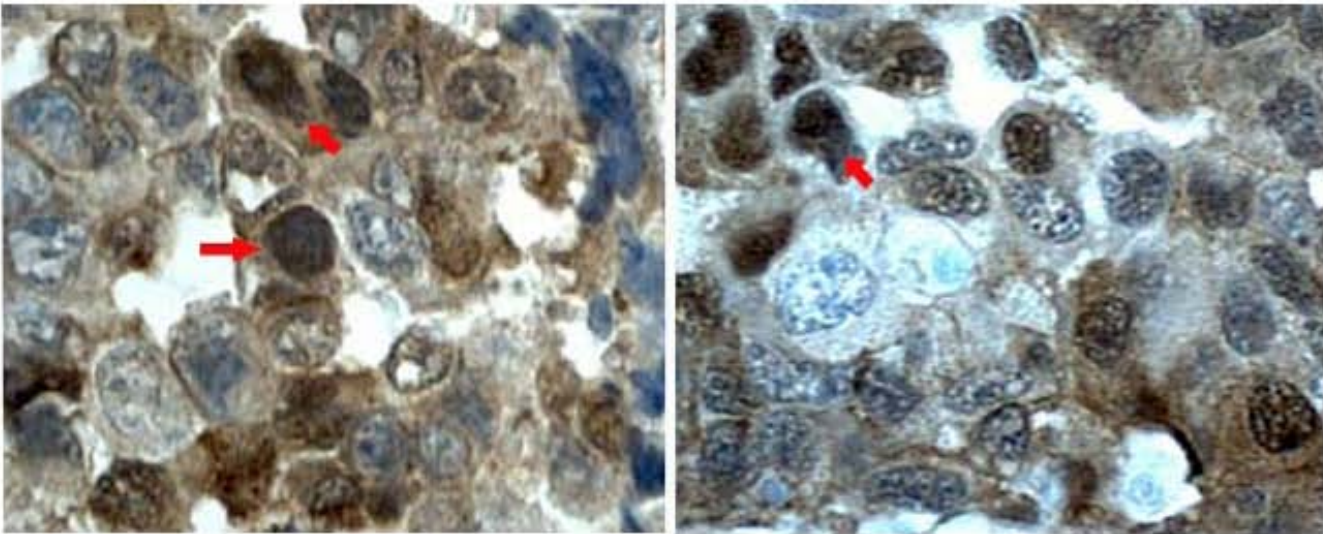


Figura 12. Localización nuclear de β -catenina en hepatocarcinoma.

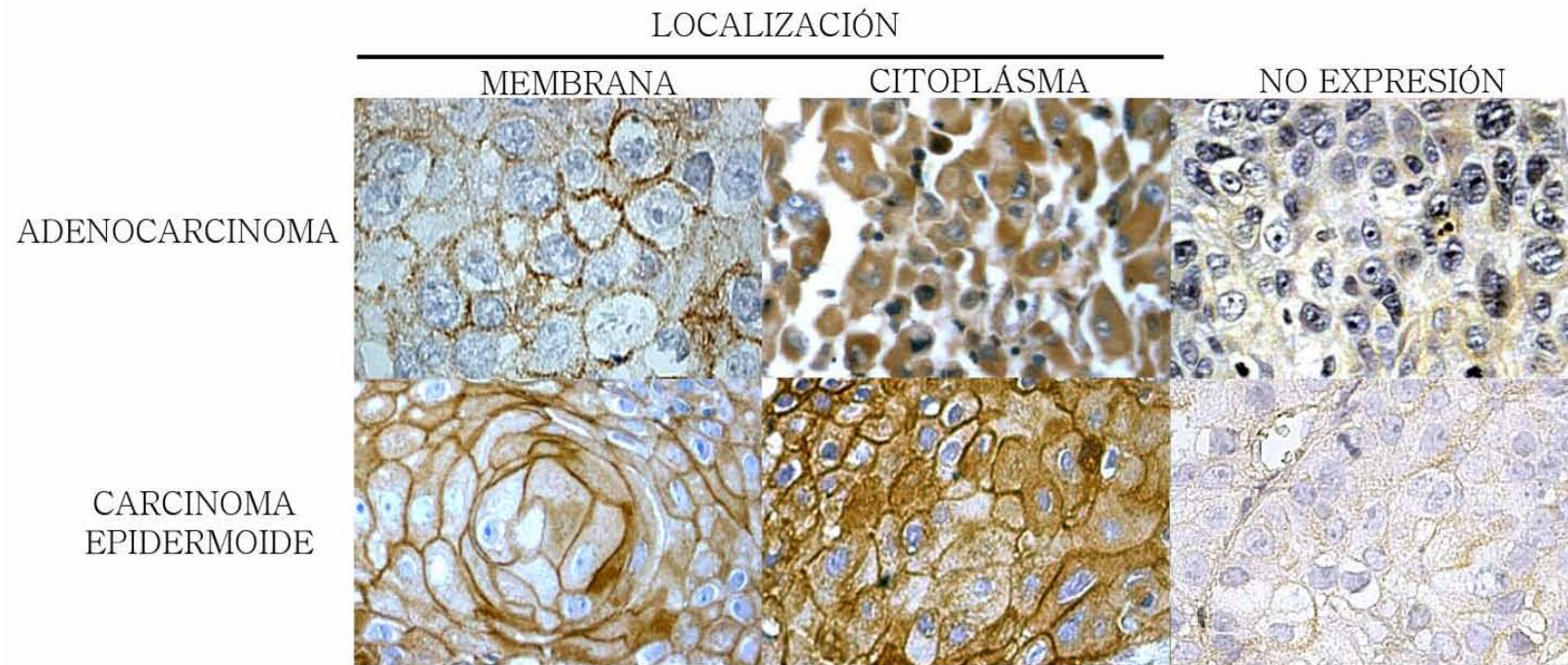


Figura 13. Expresión de β -catenina en carcinoma pulmonar

8.2 INMUNOCITOQUÍMICA EN LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA PULMONAR

La línea celular MDCK se empleó como control de la expresión membranar del complejo de adhesión E-cadherina-cateninas. Las moléculas E-cadherina, β -catenina y α -catenina se observaron exclusivamente en la membrana de las células. Estos resultados son similares a los reportados previamente en esta línea celular (Chen et al., 1999).

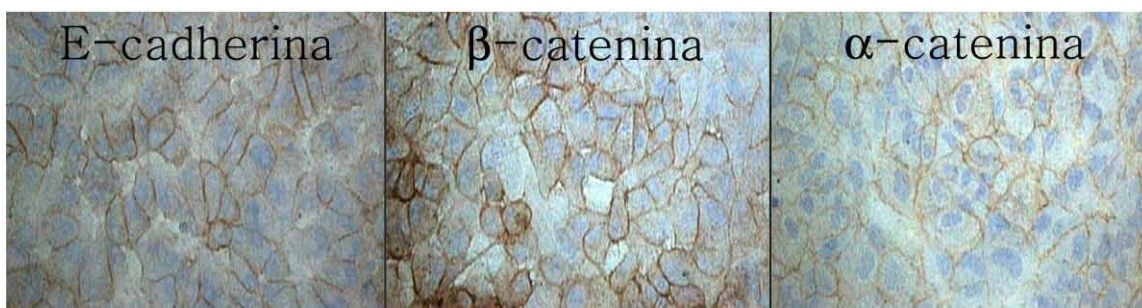


Figura 14. Expresión membranar de E-cadherina, β -catenina y α -catenina en la línea celular MDCK.

En el carcinoma pulmonar, las cuatro líneas mostraron los siguientes resultados:

Ninguna de las 4 líneas celulares expresaron E-cadherina. En las líneas Calu-1, 3.B.1.A. y SK-LU-1 la expresión tanto de la β -catenina como de la APC fue en las

células que se encontraban en mitosis. En cambio la línea celular A-427 mostró una localización citoplásmica de β -catenina y de APC (Fig. 15 y tabla 7).

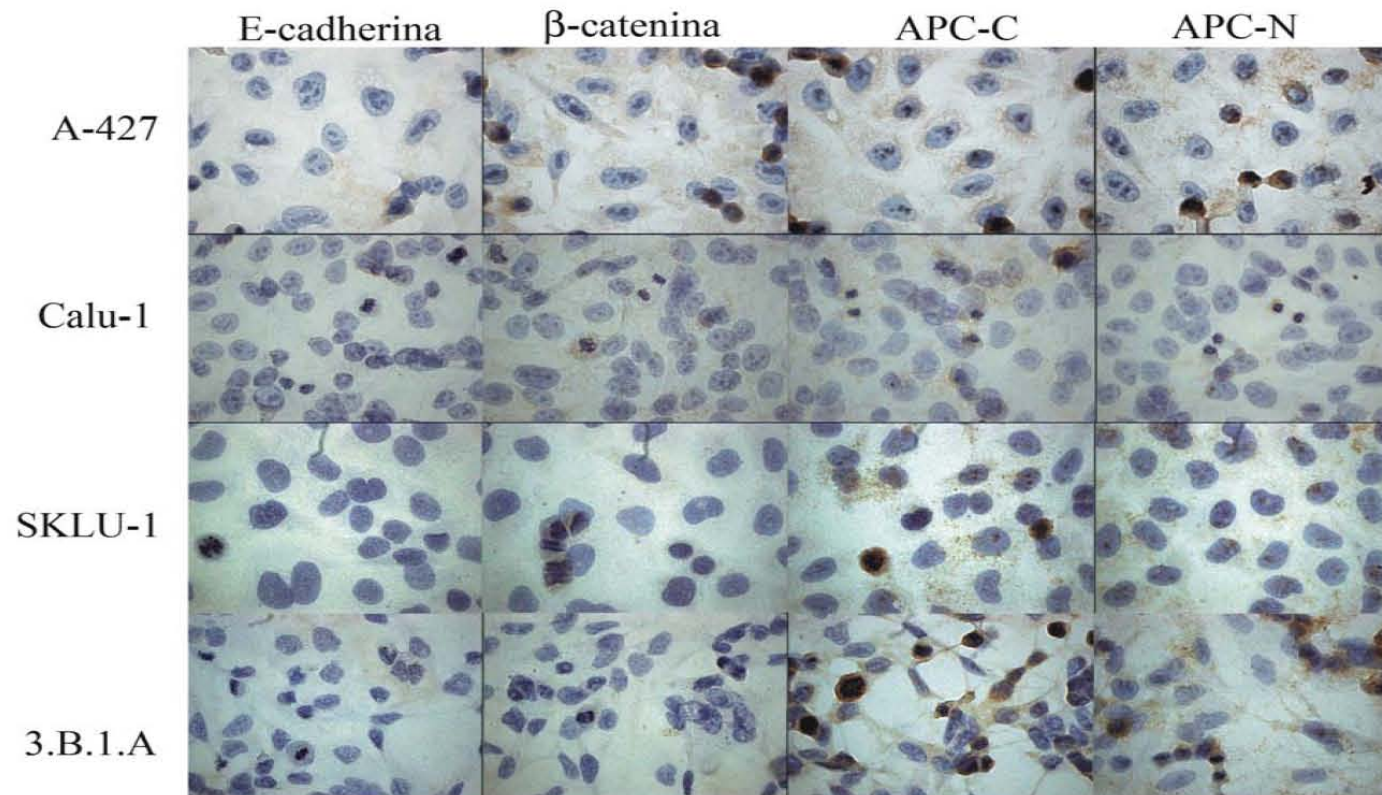


Figura 15 Localización de E-cadherina, β -catenina y APC en líneas tumorales pulmonares.

Tabla 7. Localización de β -catenina, APC y E-cadherina en las líneas celulares.

<i>Línea Celular</i>	<i>Tipo histológico</i>	<i>Anti E-cadherina</i>	<i>Anticuerpos:</i>		
			<i>Anti β-catenina</i>	<i>Anti-APC</i>	
				<i>carboxilo</i>	<i>amino</i>
A-427	Adenocarcinoma	Negativo	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma
Calu-1	Epidermoide	Negativo	Células en mitosis	Células en mitosis	Células en mitosis
3.B.1.A.	Adenocarcinoma	Negativo	Células en mitosis	Células en mitosis	Células en mitosis
SK-LU-1	Adenocarcinoma	Negativo	Células en mitosis	Células en mitosis	Células en mitosis

Ya que la línea celular A-427 fue la única que presentó una localización de la β -catenina en el citoplasma y este patrón de tinción se observó preferentemente en los cortes histológicos de adenocarcinoma pulmonar pobremente diferenciados, se empleó para analizar los diversos objetivos trazados en este estudio.

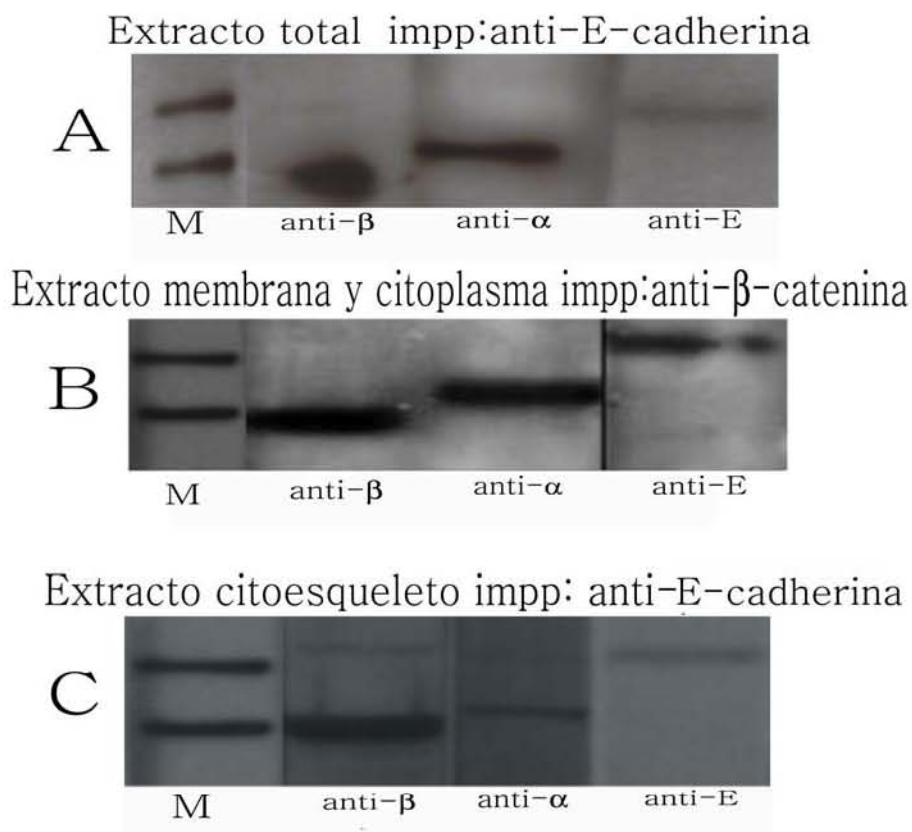
8.3 INMUNOPRECIPITACIÓN

Con la finalidad de demostrar si la β -catenina citosólica se encontraba asociada a otras moléculas del complejo de adhesión, se realizaron inmunoprecipitaciones de los extractos celulares de las fracciones de extracto total, de membrana-

citoplasma y de citoesqueleto de la línea celular A-427. Como controles se emplearon las distintas fracciones obtenidas de las líneas celulares MDCK y SW480.

En la línea celular MDCK, tanto el extracto total, de membrana-citoplasma y de citoesqueleto al incubarse con anticuerpos anti E-cadherina o anti beta-catenina, co-inmunoprecipitan las moléculas β -catenina (92 kDa) y la α -catenina (97 kDa) así como la E-cadherina y la α -catenina, respectivamente. Por lo que el complejo de adhesión E-cadherina/cateninas se encuentra íntegro en la membrana en la línea celular MDCK, como se observó por inmunocitoquímica y ha sido previamente reportado (Chen et al., 1999; Pollack et al., 1997; Capaldo and Macara, 2007). Ver Fig. 16.

MDCK



M=marcador de pesos moleculares. Anti β -catenina (anti- β) = 92 kDa. Anti α -catenina (anti- α) = 97 kDa. Anti E-cadherina (anti-E) = 120 kDa.

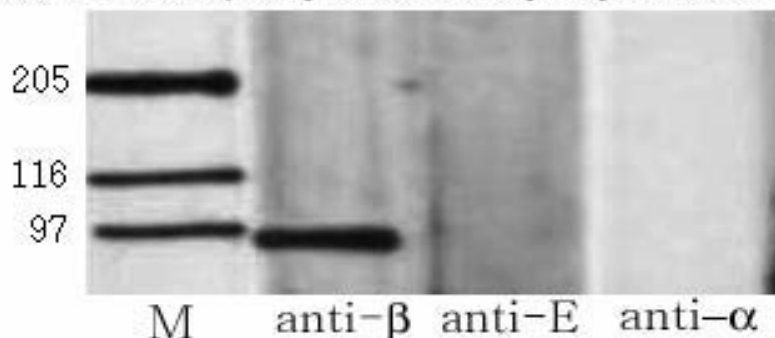
Figura 16. Extractos de la línea celular MDCK. Extracto total y de citoesqueleto fueron tratados con anti E-cadherina (A y C). Extracto de membrana-citoplasma fueron tratados con anti β -catenina (B).

En la línea celular A-427 de carcinoma pulmonar ninguna de las fracciones analizadas (extracto total, membrana-citoplasma y citoesqueleto) inmunoprecipitaron con E-cadherina al emplear el anticuerpo correspondiente.

Tampoco se observó la banda de 97 kDa de la β -catenina ni la banda de 102 kDa de la α -catenina. Estos resultados indican que la E-cadherina no se expresa en esta línea celular y concuerdan con los resultados obtenidos previamente en la inmunocitoquímica donde no se observó tinción de E-cadherina (Fig. 15).

La inmunoprecipitación empleando el anticuerpo anti β -catenina en los extractos de membrana-citoplasma y citoesqueleto de la línea celular A-427 reveló que esta molécula solo se encuentra en la fracción membrana-citoplasma de las células y no en la fracción de citoesqueleto. Además, la β -catenina no se encuentra asociada a la α -catenina ya que esta banda no fue co-inmunoprecipitada con la β -catenina. Esta línea solo expresó la molécula β -catenina con una localización citoplasmática (Fig. 17).

Fracción de membrana y citoplasma. Inmunoprecipitación con anti- β -catenina



Fracción de citoesqueleto. Inmunoprecipitación con anti- β -catenina

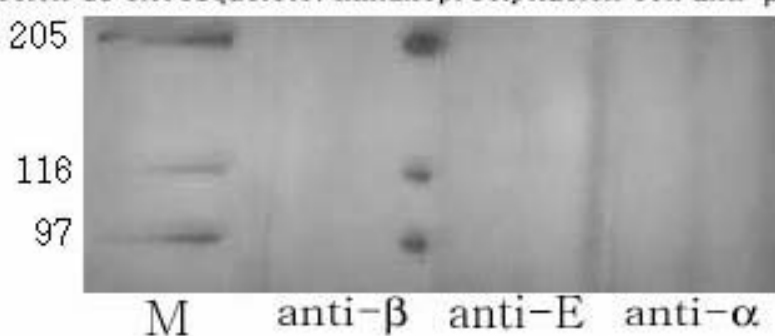


Figura 17. Inmunoprecipitación con anti β -catenina de la fracción membrana-citoplasma y de citoesqueleto obtenidas de la línea celular A-427. Inmunoblot con anti β -catenina (anti- β), anti E-cadherina (anti-E) y anti α -catenina (anti- α).

Para determinar si la β -catenina citosólica de la línea A-427 se encontraba fosforilada se emplearon los anticuerpos anti-tirosina fosforilada, anti-serina fosforilada, y anti-treonina fosforilada, encontrándose los siguientes resultados: La β -catenina citosólica no se encontró fosforilada en residuos de tirosinas (Fig. 18). Se ha reportado que la fosforilación en tirosinas favorece la disociación de β -catenina con la E-cadherina presente en la membrana de la célula (Hirohashi and Kanai, 2003; Nawrocki et al., 1998; Foty and Steinberg, 2004). Ya que la línea

celular A-427 carece de E-cadherina, la presencia de β -catenina en el citoplasma no es resultado de su disociación con E-cadherina.

En contraste, la β -catenina se encontró fosforilada en residuos de serinas y treoninas (Fig. 18). La fosforilación en estos sitios se debe a la acción del complejo APC-axina-GSK-3 β sobre la β -catenina, proceso previo e imprescindible para que se lleve a cabo la ubiquitinización y degradación de la β -catenina por el proteasoma (Conacci-Sorrell et al., 2002).

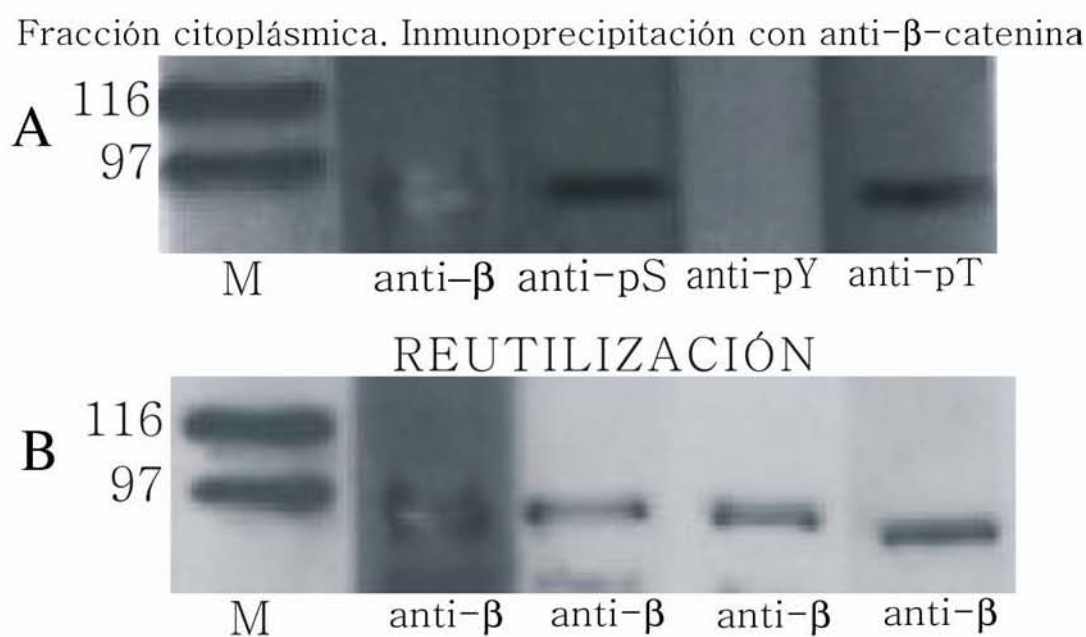


Figura 18. A) Extracto de fracción citoplásmica de la línea A-427 Inmunoprecipitación con anti β -catenina. Inmunoblot con anti β -catenina (anti- β), anti-serina fosforilada (anti-pS), anti-tirosina fosforilada (anti-pY) y anti-treonina fosforilada (anti-pT). Pesos Moleculares: β -catenina = 97 kDa. B) Reutilización de la membrana (A) e inmunoblot con anti β -catenina.

Se ha reportado que la cinasa GSK-3 β actúa en la β -catenina fosforilando los residuos serina 33, serina 37 y treonina 41 (Prunier et al., 2004; Behrens and Lustig, 2004; Clevers, 2006). Para demostrar que la GSK-3 β emplea como sustrato a la β -catenina, se usó un anticuerpo que reconoce a la β -catenina fosforilada en serina 33. El resultado indica que la β -catenina citoplasmática se encuentra fosforilada específicamente en este sitio. Ver Fig. 19.

Se ha reportado que la β -catenina citoplásmica una vez fosforilada, y de manera previa a su degradación por el proteasoma, requiere de su ubiquitinización (Aberle et al., 1997). La alteración en este proceso no parece ser la causa de la localización citoplásmica de la β -catenina en la línea A-427, ya que la β -catenina ubiquitinizada pudo ser detectada empleando anticuerpos que reconocen dichos residuos. Ver Fig. 19. Los resultados anteriores demuestran que en la línea celular A-427, la presencia de β -catenina citosólica no se debe a su disociación con E-cadherina. Más aun, en el citoplasma celular se encuentra fosforilada y ubiquitinizada y tal vez su presencia en este compartimento celular se deba a que no pueda ser degradada debido a afectaciones a nivel del proteasoma.

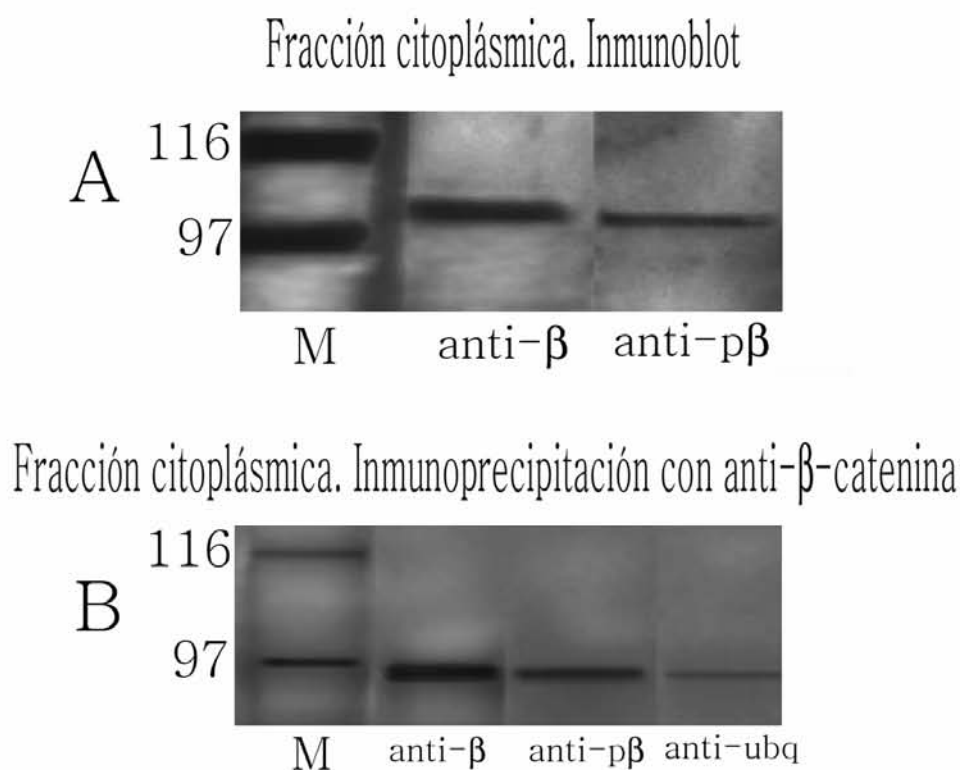


Figura 19. Extracto de fracción citoplásmica de la línea A-427:

A) Inmunoblot con anti-beta-catenina (anti- β), anti-beta-catenina fosforilada en serina 33 (anti-p β).

B) Inmunoprecipitación con anti β -catenina. Inmunoblot con anti-beta-catenina (anti- β), anti-beta-catenina fosforilada en serina 33 (anti-p β) y anticuerpo que reconoce residuos ubiquitinizados (anti-ubq).

8.4 WESTERN BLOT DE LA FRACCIÓN NUCLEAR

A pesar de que los resultados obtenidos indicaban la presencia de β -catenina citosólica, se estudió la posible existencia de la β -catenina en el núcleo de las

células A-427, lo cual se realizó empleando dos metodologías: a) western blot y b) inmunofluorescencia. Como control positivo se utilizó la fracción nuclear de la línea SW480 (Sheng et al., 1998). Se empleó a la lamina como un marcador de proteínas nucleares y a la β -actina como marcador de proteínas citoplásmicas (Fig. 20). Se ha reportado que en la línea SW480 el gen de APC se encuentra mutado, lo que favorece la localización nuclear de β -catenina. En los resultados obtenidos se observó una banda correspondiente a la β -catenina nuclear y también se presentó una banda que corresponde a la proteína mutada de APC, la cual se ha reportado que también se transloca al núcleo (Henderson and Fagotto, 2002).

En cambio, en la línea celular A-427 se encontró una ligera banda de β -catenina la cual tal vez pudo deberse a una ligera contaminación de la fracción nuclear con proteínas de citoplasma. Por lo anterior se seleccionó la inmunofluorescencia como metodología alterna para demostrar la presencia o ausencia de β -catenina nuclear.

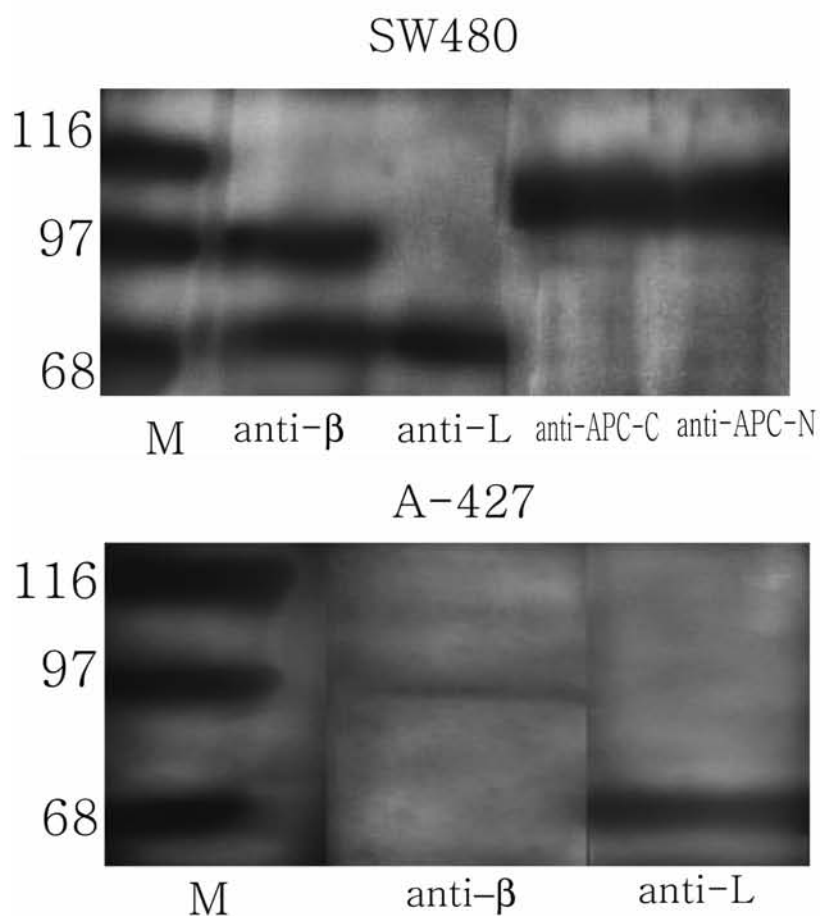


Figura 20. Fracción nuclear de las líneas celulares SW480 y A-427. Inmunoblot: anti- β -catenina (anti- β), región carboxilo de la molécula de APC (anti-APC-C), región amino de la molécula de APC (anti-APC-N) y anti-lamina B (anti-L).

8.5 INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia permitió observar la localización celular de la β -catenina así como de la β -catenina fosforilada en serina 33. En la línea SW480, el anticuerpo anti- β -catenina localizó a la β -catenina en los núcleos de algunas

células (Fig. 21). El anticuerpo anti- β -catenina ser 33 no mostró reacción en estas células.

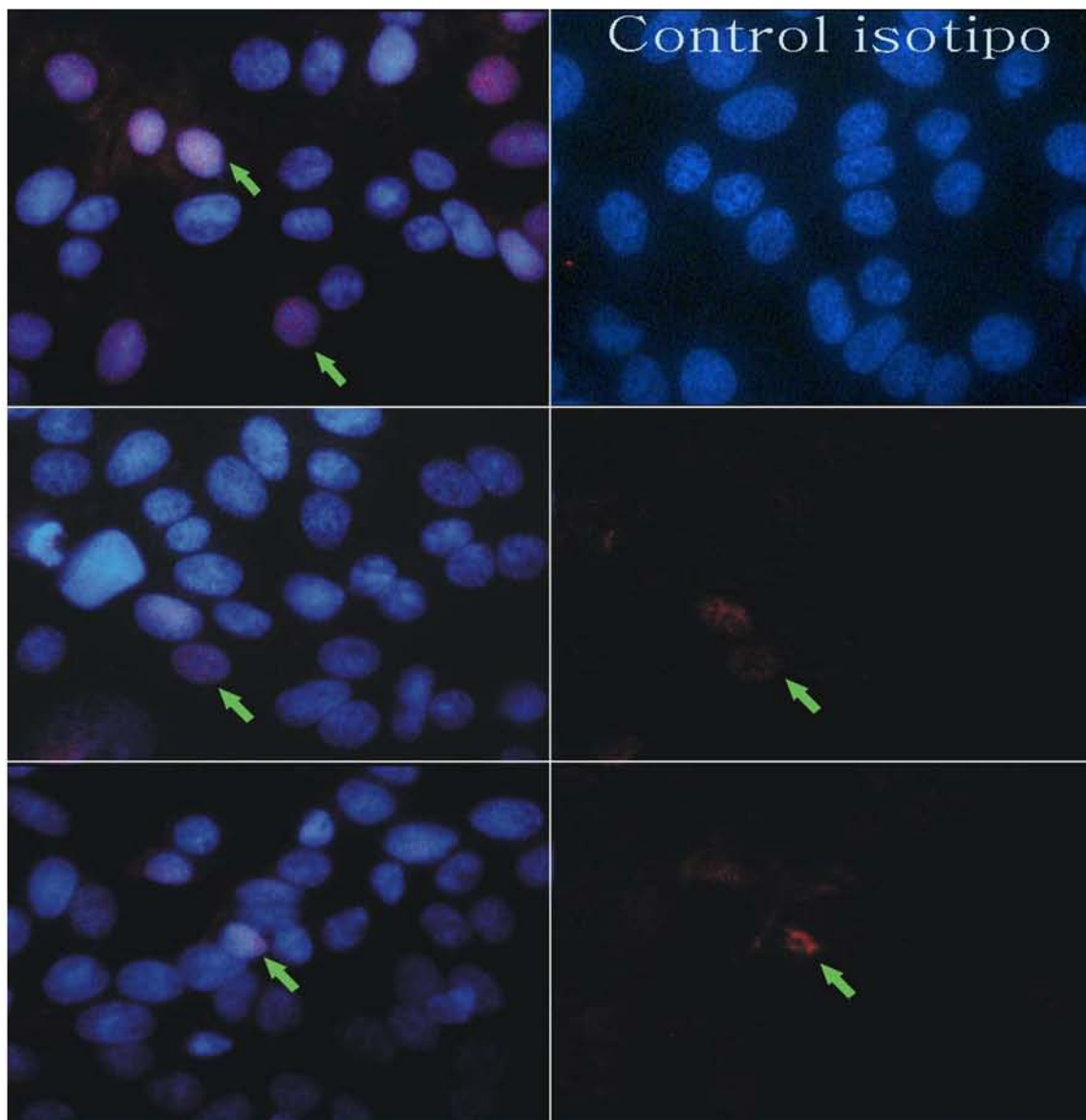


Figura 21. Línea celular SW480. Inmunofluorescencia empleando el anticuerpo anti- β -catenina conjugada con alexa 594 y contrateñida con DAPI. En el panel derecho se observa la localización de β -catenina en el núcleo de algunas células.

La línea de adenocarcinoma pulmonar A-427 presentó una tinción citoplásmica de β -catenina (Figuras 22 y 23) en todas las células al emplear el anticuerpo anti β -catenina (alexa 594), así como con el anticuerpo anti β -catenina ser 33 (alexa 488). Además, no se observó tinción nuclear con el anticuerpo anti β -catenina (alexa 594) (ver Fig. 22).

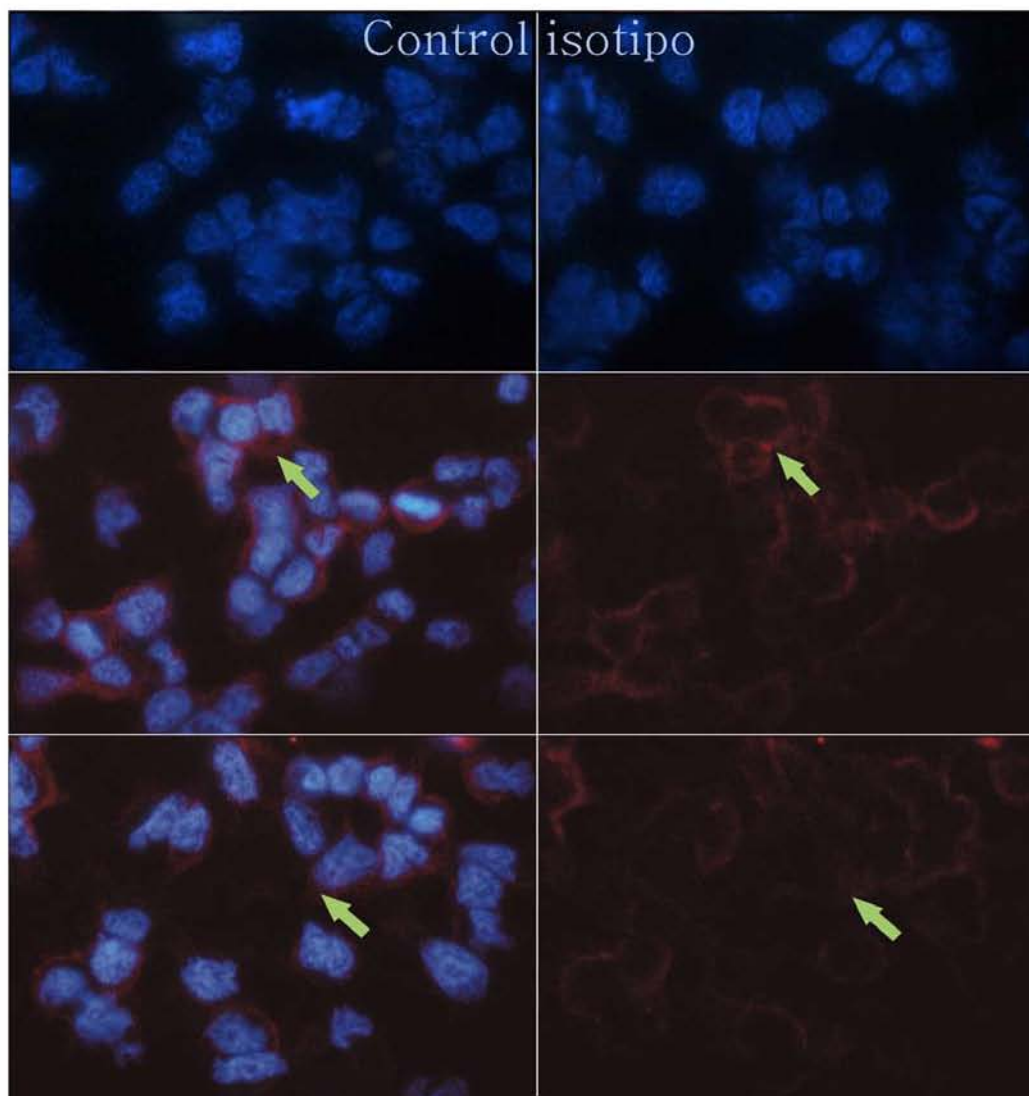


Figura 22. Línea celular A-427. Inmunofluorescencia empleando el anticuerpo anti β -catenina. En el panel derecho se observa la localización de β -catenina (alexa 594) en el citoplasma de las células. En la parte izquierda del panel se observa solo el citoplasma celular y la localización de la β -catenina (tinción roja) en el mismo.

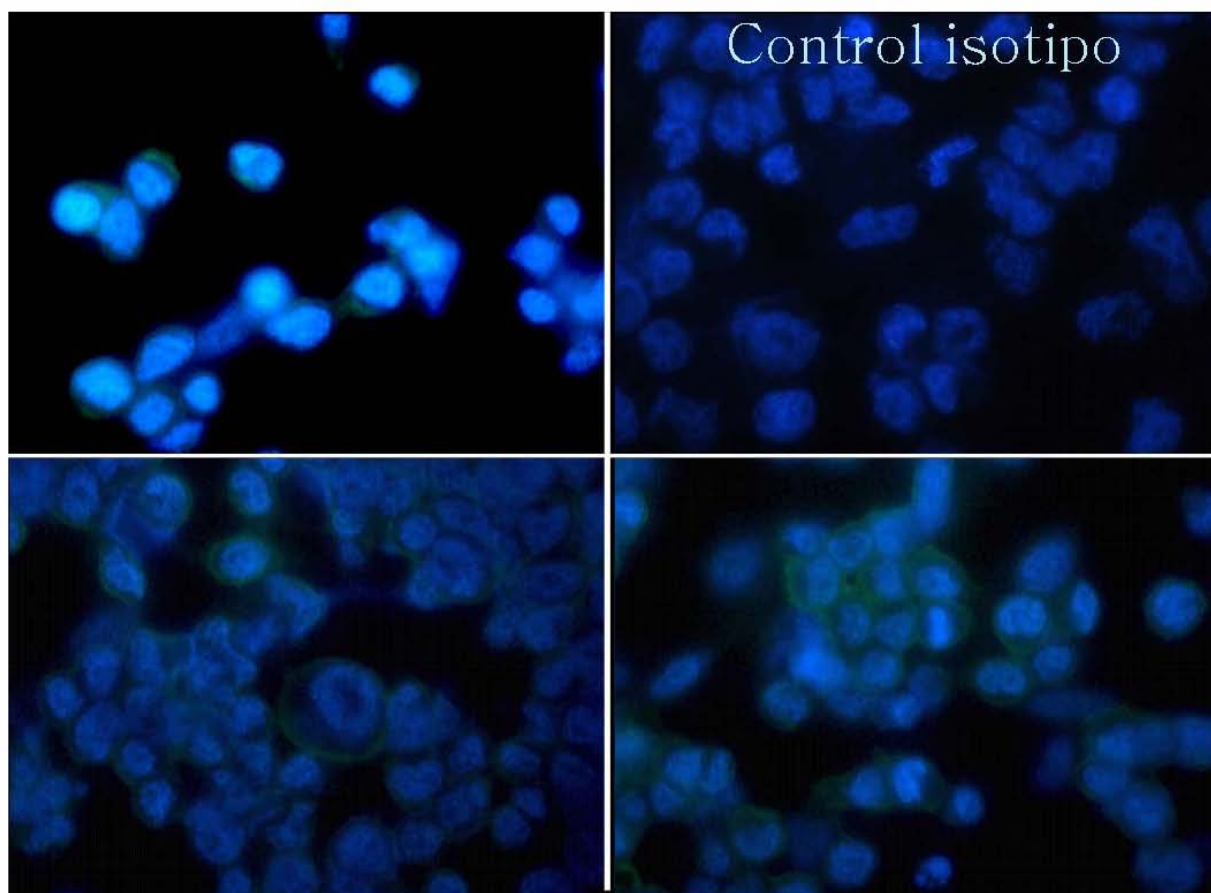


Figura 23. Localización celular de β -catenina fosforilada en serina 33 (alexa 488) en la línea A-427. La β -catenina fosforilada (tinción verde) se observa en el citoplasma de las células.

9. DISCUSIÓN

La pérdida de adhesión celular es un evento importante en el desarrollo, invasión y metástasis de muchas neoplasias. El complejo de adhesión E-cadherina-cateninas es crucial en el mantenimiento de la adhesión celular y en la homeostasis del tejido. En cáncer de pulmón varios grupos han reportado una expresión membranal y citoplásmica de E-cadherina y de β -catenina que correlaciona con el grado de diferenciación celular. En este sentido los carcinomas bronquioloalveolares bien diferenciados muestran una expresión altamente preservada de E-cadherina y β -catenina en la membrana, mientras que los adenocarcinomas pobremente diferenciados presentan patrones alterados de expresión (Hidaka et al., 1998). En el presente trabajo se localizó a la β -catenina en la membrana de los adenocarcinomas y carcinomas epidermoides bien diferenciados, mientras que en los casos pobremente diferenciados de estos mismos tipos histológicos, la β -catenina se encontró en el citoplasma de las células, o bien se pierde su expresión.

Las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar no expresaron la β -catenina, a excepción de la línea A-427 donde se observó a la β -catenina en el citoplasma de las células. Estas mismas líneas celulares no expresaron E-cadherina. Se ha sugerido que la pérdida de E-cadherina y β -catenina en cáncer de pulmón es un evento importante en la progresión de displasia a carcinoma *in situ*, observándose

una ausencia total de estas moléculas en carcinoma invasivo, lo que sugiere que la pérdida del complejo E-cadherina/ β -catenina es un paso importante para la transformación de cáncer *in situ* a cáncer invasivo (Salon et al., 2005).

Se han sugerido varios mecanismos por medio de los cuales se inactiva el complejo de adhesión E-cadherina/ β -catenina. El mecanismo más común es la metilación del gen para E-cadherina evento reportado en varios tipos de cáncer como: hígado, próstata, mama, oral, estómago, esófago, colón y útero. Este mecanismo también se ha reportado en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), así como en células epiteliales bronquiales y en células mononucleares provenientes de fumadores; lo que sugiere que la metilación del gen para E-cadherina ocurre en etapas tempranas de la carcinogénesis del pulmón (Salon et al., 2005; Shimamoto et al., 2004; Russo et al., 2005).

Otro mecanismo que puede producir la inactivación del complejo de adhesión E-cadherina/ β -catenina es la fosforilación en tirosinas de E-cadherina y β -catenina. En cáncer de pulmón se ha reportado que el EGFR incrementa el nivel de fosforilación en tirosinas del complejo y en consecuencia la pérdida de adhesión (Salon et al., 2005; Al Moustafa et al., 2002). En el presente trabajo se realizó la inmunoprecipitación de la β -catenina a partir de extracto citoplásmico de la línea A-427 encontrándose por inmunoblot que la β -catenina se encontraba fosforilada en serinas y treoninas, pero no en tirosinas, lo que sugiere que la fosforilación de

β -catenina en tirosinas no es un mecanismo de inactivación del complejo de adhesión en esta línea celular.

Ya que la β -catenina se encontró en el citoplasma fosforilada en residuos de serinas y treoninas, ésta debe ser degradada por el proteasoma a través de ubiquitinación, para tal evento su fosforilación previa en treonina 41, serina 37 y serina 33 es necesario. Estas fosforilaciones son realizadas por la CK1 α y por la GSK-3 β . Para que estas cinasas puedan actuar sobre la β -catenina, es preciso que axina reclute a APC y a las cinasas formando un complejo proteico para la eficiente fosforilación de la β -catenina. Este complejo se forma cuando la vía Wnt no esta activa (Kikuchi et al., 2006). Además, la fosforilación de β -catenina en serinas y treoninas, encontrada en este trabajo, nos sugiere de manera indirecta que la vía Wnt no esta participando en la línea celular A-427.

La β -catenina, una vez fosforilada en serinas y treoninas, es reconocida por el complejo enzimático E1 que ubiquitina a la β -catenina. En este trabajo, la β -catenina presente en el citoplasma de las células A-427 se encontró ubiquitinizada. Tal vez su posterior degradación por el proteasoma se encuentre alterada, ya que se ha reportado que en las células tumorales este proceso se encuentra afectado (Dalton, 2004).

La localización nuclear de la β -catenina en células tumorales se ha asociado con procesos de carcinogénesis principalmente en colón, como componente principal de la vía Wnt. Empleando inmunofluorescencia se comparó la localización celular

de la β -catenina en la línea A-427 con respecto a la línea de carcinoma de colón SW480 en la cual se ha reportado una localización nuclear (Brabletz et al., 2005; Kikuchi et al., 2006). Las células A-427 no expresaron a la β -catenina en el núcleo. La localización nuclear de la β -catenina en carcinoma de pulmón ha sido reportada solo por algunos autores (Brabletz et al., 2005; Mazieres et al., 2005). Además, diversos estudios en los tumores pulmonares reportan baja frecuencia de mutaciones en los genes de APC y de β -catenina.

Los resultados de este trabajo sugieren que en la línea de adenocarcinoma pulmonar A-427, la vía Wnt no se encuentra activa ya que la β -catenina no se observó en el núcleo de las células. Además, defectos en el proceso de degradación mediados por el proteasoma parecen ser responsables de la acumulación de β -catenina en el citoplasma, por lo que el importante papel biológico asignado a la β -catenina en la carcinogénesis, en la invasión y en la metástasis de los tumores, no parece ser determinante en el proceso maligno que conduce al desarrollo del cáncer de pulmón.

10. CONCLUSIONES

1.- En los carcinomas pulmonares bien diferenciados la β -catenina se encontró en la membrana celular.

2.- En los carcinomas pulmonares pobremente diferenciados, la β -catenina se localizó en el citoplasma celular o no se expresó.

3.- La línea A-427 de adenocarcinoma pulmonar presentó una localización citosólica de β -catenina, similar a lo observado en los cortes histológicos.

4.- En la línea celular A-427, la β -catenina citosólica se encontró fosforilada en serinas y treoninas pero no en tirosinas.

5.- En la línea celular A-427, la β -catenina citosólica se encontró fosforilada en serina 33 así como ubiquitinizada.

6.- En la línea celular A-427, la β -catenina no se observó en el núcleo de las células.

Los resultados anteriores nos permiten sugerir que la β -catenina se encuentra en el citoplasma de la línea celular A-427 por que no puede ser degradada por el proteasoma. Al no ser degradada, se acumula en este compartimiento celular. La ausencia de la β -catenina en el núcleo observada en los cortes histológicos y en la línea celular A-427, sugiere que en los carcinomas pulmonares la vía Wnt a través de la β -catenina, tiene una participación menos importante o tal vez irrelevante en el incremento de la proliferación celular, la invasión y la metástasis.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aberle, H. A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, and R. Kemler. 1997. β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16:3797-3804.
2. Al Moustafa, AE. L.Yen, N. Benlimame, and MA. Alaoui-Jamali. 2002. Regulation of E-cadherin/catenin complex patterns by epidermal growth factor receptor modulation in human lung cancer cells. *Lung Cancer* 37(1):49-56.
3. Awaya, H. Y. Takesima, and VJ. Amatya. 2005. Loss of expression of E-cadherin and β -catenin is associated with progression of pulmonary adenocarcinoma. *Pathol Int* 1:14-18.
4. Balmain, A. and C. Harris. 2007. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis* 21:371-377.
5. Beavon, I.R.G. 2000. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer* 36:1607-1620.
6. Behrens, J. and B. Lustig. 2004. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 48:477-487.
7. Borczuk, A.C. and C.A. Powell. 2007. Expression profiling and lung cancer development. *Proc Am Thorac Soc* 4:127-132.

8. Brabletz, T. F. Hlubek, S. Spaderna, O. Schmalhofer, E. Hiendlmeyer, A. Jung, and T. Kirchner. 2005. Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer: Epithelial-Mesenchymal Transition, Mesenchymal-Epithelial Transition, Stem cells and β -catenin. *Cell Tissues Organs* 179:56-59.
9. Brambilla, E., WD. Travis, TV. Colby, B. Corrin and Y. Shimosato. 2001. The new world health organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 18:1059-1068.
10. Brodt, P. and S. Dedhear. 1996. The integrins: mediators of cell-extracellular matrix and intercellular communication. *In* Cell adhesion and invasion in cancer metastasis. P.Brodt, editor. Chapman and Hall, 35-48.
11. Capaldo, C.T. and I.G. Macara. 2007. Depletion of E-cadherin disrupts establishment but not maintenance of cell junctions in madin darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 18:189-200.
12. Cavallaro, U. and G. Christofori. 2004. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 4:118-132.
13. Chen, Y.T., D.B.Stewart, and W.J.Nelson. 1999. Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 144:687-699.
14. Christofori, G. and H.Semb. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *TIBS* 24:73-76.

15. Clevers, H. 2006. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469-480.
16. Conacci-Sorrell, M., J. Zhurinsky, and A. Ben-Ze'ev. 2002. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 109:987-991.
17. Dajani, R., E. Fraser, S.M. Roe, M. Yeo, V.M. Good, V. Thompson, T.C. Dale, and L.H. Pearl. 2003. Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3 β to the axin-APC scaffold complex. *EMBO J* 22:494-501.
18. Dalton, W.S. 2004. The proteasome. *Semin Oncol* 31:3-9.
19. Diel, J.A., M. Cheng, M.F. Roussel, and C.J. Sherr. 1998. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12:3499-3511.
20. Fanto, M. and H. McNeill. 2004. Planar polarity from flies to vertebrates. *J Cell Sci* 117:527-533.
21. Fearhead, N.S., M. Britton, and W.F. Bodmer. 2001. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 10:721-733.
22. Foty, R. and M. Steinberg. 2004. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. *Int J Dev Biol* 48:397-409.
23. Furuse, C., P.R. Cury, A. Altemani, P.D. dos Santos, Jr., N.S. de Araujo, and V.C. de Araujo. 2006. Beta-catenin and E-cadherin expression in salivary gland tumors. *Int J Surg Pathol* 14:212-217.

24. Gao, Z., J.M. Seeling, V. Hill, A. Yochum, and D.M. Virshup. 2002. Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the β -catenin degradation complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1182-1187.
25. Haglund, K. and I. Dikic. 2005. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* 24:3353-3359.
26. Hanahan, D. and R. Weinberg. 2000. The Hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
27. Henderson, B.R. and F. Fagotto. 2002. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep* 3:834-839.
28. Hidaka, N., T. Nagao, A. Asoh, Y. Kondo, and K. Nagao. 1998. Expression of E-cadherin, α -catenin, β -catenin y γ -catenin in bronchioloalveolar carcinoma and conventional pulmonary adenocarcinoma: an immunohistochemical study. *Mod Pathol* 11:1039-1045.
29. Hirohashi, S. and Y. Kanai. 2003. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 94:575-581.
30. Hommura, F., K. Furuuchi, S. Yamazaki, I. Ogura, and M. Shimizu. 2002. Increased expression of beta-catenin predicts better prognosis in non-small cell lung carcinomas. *Cancer* 94:752-758.
31. Horvai, A.E., M.J. Kramer, and R. O'Donnell. 2006. Beta-catenin nuclear expression correlates with cyclin D1 expression in primary and metastatic synovial sarcoma: a tissue microarray study. *Arch. Pathol Lab Med* 130:792-798.

32. Jones, S.E. and C. Jomary. 2002. Secreted frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* 24:811-820.
33. Kase, S., K. Sugio, K. Yamazaki, T. Okamoto, and T. Yano. 2000. Expression of E-cadherin and beta-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. *Clin Cancer Res* 6:4789-4796.
34. Kato, H., T. Hirano, and Yoshida K. 2005. Frequent loss of E-cadherin and/or catenins in intrabronchial lesions during carcinogenesis of the bronchial epithelium. *Lung Cancer* 48(3):323-330.
35. Kikuchi, A., S. Kishida, and H. Yamamoto. 2006. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp Mol Med* 38:1-10.
36. Knudson, AG. 1996. Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol* 122:135-140.
37. Korswagen, H.C. 2002. Canonical and non-canonical Wnt signaling pathways in *Caenorhabditis elegans*: variations on a common signaling theme. *Bioessays* 24:801-810.
38. Kotsinas, A., K. Evangelou, P. Zacharatos, C. Kittas, and V. Gorgoulis. 2002. Proliferation, but not apoptosis is associated with distinct β -catenin expression patterns in non-small-cell lung carcinomas. *Am J Pathol* 161:1619-1634.
39. Kremer, M., L. Quintanilla-Martinez, M. Fuchs, A. Gamboa-Dominguez, S. Haye, H. Kalthoff, E. Rosivatz, C. Hermannstädter, R. Bush, H. Höfler, and

- B. Lubber. 2003. Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on tumorigenicity and metastasis. *Carcinogenesis* 24:1879-1886.
40. Kudo, J., T. Nishiwaki, N. Haruki, H. Ishiguro, Y. Shibata, Y. Terashita, H. Sugiura, N. Shinoda, M. Kimura, Y. Kuwabara, and Y. Fujii. 2007. Aberrant nuclear localization of beta-catenin without genetic alterations in beta-catenin or Axin genes in esophageal cancer. *World J Surg Oncol* 5:21.
41. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
42. Lewin, B. 2004. Oncogenes and cancer. *In* Genes VIII. G. Carlson, editor. Pearson Prentice Hall, 843-882.
43. Lim, J.H., J.W. Park, and Y.S. Chun. 2006. Human arrest defective 1 acetylates and activates beta-catenin, promoting lung cancer cell proliferation. *Cancer Res* 66:10677-10682.
44. Liu, J.F. and C.T. Wu. 2006. [Beta-catenin expression in intestinal mucosa of rats with severe abdominal infection]. *Nan. Fang Yi. Ke. Da. Xue. Xue. Bao.* 26:1733-1735.
45. Loeb, L.A. and K.C. Cheng. 1990. Errors in DNA synthesis: a source of spontaneous mutations. *Mutat Res* 283:297-304.
46. Luo, W. and Lin S. 2004. Axin: a master scaffold for multiple signaling pathways. *Neurosignals* 13:99-113.
47. Macleod, K. 2000. Tumor suppressor genes. *Curr Op Gen Dev* 10:81-93.

48. Martín-Ruiz, A., I.R.C. Rodríguez-Gomez, and A. Hardisson. 2004. Efectos tóxicos del tabaco. *Rev Toxicol* 21:64-71.
49. Mayadas, T.N. 1996. Selectins. *In* Cell adhesion and invasion in cancer metastasis. P.Brodth, editor. Chapman and Hall, 77-86.
50. Mazieres, J., B. He, L. You, Z. Xu, and D. Jablons. 2005. Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett* 222:1-10.
51. Mimori-Kiyosue, Y. and S. Tsikita. 2001. Where is APC going? *J Cell Biol* 154:1105-1109.
52. Minna, J.D., J.A. Roth, and A.F. Gazdar. 2002. Focus on lung cancer. *Cancer Cell* 1:49-52.
53. Nawrocki, B., M. Polette, J. Van Hengel, J. Tournier, F. Van Roy, and P. Birembaut. 1998. Cytoplasmic redistribution of E-cadherin-catenin adhesion complex is associated with down-regulated tyrosine phosphorylation of E-cadherin in human bronchopulmonary carcinomas. *Am J Pathol* 153:1521-1530.
54. Nusse, R. 2005. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Research* 15:28-32.
55. Panani, A.D. and C. Roussos. 2006. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Lett* 239:1-9.
56. Park, B.H. and B. Volgestein. 2003. Part II Scientific Foundation, Section 1: Cancer Biology. *In* Cancer Medicine 6. D. Kufe, R. Pollock, R.

- Weichselbaum, R. Bast, T.Gansler, J. Holland, and E. Frei, editors. BC Decker.
57. Pierotti, M.A., G. Sozzi, and C.M. Croce. 2003. Part II Scientific Foundation, Section 1: Cancer Biology. *In* Cancer Medicine 6. D. Kufe, A.L. Pollack, R. Weichselbaum, R. Bast, T. Gansler, J. Holland, and E. Frei, editors. BC Decker.
58. Polakis P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14:1837-1851.
59. Pollack, A.L., A.I. Barth, Y. Altschuler, W.J. Nelson, and K.E. Mostov. 1997. Dynamics of beta-catenin interactions with APC protein regulate epithelial tubulogenesis. *J Cell Biol* 137:1651-1662.
60. Proctor, N. 2001. Tobacco and the global lung cancer epidemic. *Nature* 1:82-88.
61. Provost, E. and D.L. Rimm. 1999. Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion complex. *Curr Opin Cell Biol* 11:567-572.
62. Prunier, C., B. Hocevar, and P. Howe. 2004. Wnt signaling: physiology and pathology. *Growth Factors* 22:141-150.
63. Puhalla, H., B. Herberger, A. Soleiman, M. Filipits, F. Laengle, T. Gruenberger, and F. Wrba. 2005. E-cadherin and beta-catenin expression in normal, inflamed and cancerous gallbladder tissue. *Anticancer Res.* 25:4249-4254.

64. Rao, A.S., N. Kremenevskaja, R. von Wasielewski, V. Jakubcakova, S. Kant, J. Resch, and G. Brabant. 2006. Wnt/beta-catenin signaling mediates antineoplastic effects of imatinib mesylate (gleevec) in anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 91:159-168.
65. Retera, J.M., M.P. Leers, P.H. Sulzer, and Theunissen P.H. 1998. The expression of beta-catenin in non-small-cell lung cancer: a clinicopathological study. *J Clin Pathol* 51:891-894.
66. Rosin-Arbesfeld, R., F. Townsley, and M. Bienz. 2000. The APC tumor suppressor has a nuclear export function. *Nature* 406:1009-1012.
67. Rowlands, T., M. Symonds, R. Farooki, and T. Brabletz. 2000. Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. *Rev Reproduction* 5:53-61.
68. Russo, AL., A. Thiagalingam, and H. Pan. 2005. Differential DNA hypermethylation of critical genes mediates the stage-specific tobacco smoke-induced neoplastic progression of lung cancer. *Clin Cancer Res* 7:2466-2470.
69. Salon, C., S.Lantuejoul, B. Eymin, S. Gazzeri, C. Brambilla, and E. Brambilla. 2005. The E-cadherin-beta-catenin complex and its implication in lung cancer progression and prognosis. *Future Oncol* 1:649-660.
70. Saneyoshi, T., S. Kume, Y. Amasaki, and K. Mikoshiba. 2002. The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature* 417:295-299.

71. Sato, T., N. Fujita, A. Yamada, T. Ooshio, R. Okamoto, K. Irie, and Y. Takai. 2006. Regulation of the assembly and adhesion activity of E-cadherin by nectin and afadin for the formation of adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 281:5288-5299.
72. Shackelford, J. and J.S. Pagano. 2004. Tumor viruses and cell signaling pathways: deubiquitination versus ubiquitination. *Mol Cell Biol* 24:5089-5093.
73. Sheng, H., J. Shao, C.S. Williams, M.A. Pereira, M.M. Taketo, M. Oshima, A.B. Reynolds, M.K. Washington, R.N. DuBois, and R.D. Beauchamp. 1998. Nuclear translocation of beta-catenin in hereditary and carcinogen-induced intestinal adenomas. *Carcinogenesis* 19:543-549.
74. Shi, J., L. Wang, and L.H.Hu. 2006. [Aberrant localization of beta-catenin in leukemia cell lines]. *Zhongguo Shi Yan. Xue. Ye. Xue. Za Zhi.* 14:1096-1100.
75. Shigemitsu, K., Y. Sekido, and N. Usami. 2001. Genetic alteration of the β -catenin gene (CTNNB1) in human lung cancer and malignant mesothelioma and identification of a new 3p21.3 homozygous deletion. *Oncogene* 31:4249-4257.
76. Shimamoto, T., JH. Ohyashiki, T. Hirano, H. Kato, and K. Ohyashiki. 2004. Hypermethylation of E-cadherin gene is frequent and independent of p16INK4A methylation in non-small cell lung cancer: potential prognostic implication. *Oncol Rep* 2:389-395.

77. Siu, CH. 1996a. Cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *In* Cell adhesion and invasion in cancer metastasis. P. Brodt, editor. Chapman and Hall, 61-70.
78. Siu, CH. 1996b. Cell adhesion receptors: a general introduction. *In* Cell adhesion and invasion in cancer metastasis. P. Brodt, editor. Chapman and Hall, 9-10.
79. Staedeli, R., R. Hoffmans, and K. Basler. 2006. Transcription under control of nuclear Arm/ β -catenin. *Curr Biol* 16:R378-R385.
80. Steinberg, M. and P.M. McNutt. 1999. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol* 11:554-560.
81. Tatsuguchi, A., T. Kishida, S. Fujimori, S. Tanaka, K. Gudis, S. Shinji, K. Furukawa, T. Tajiri, Y. Sugisaki, Y. Fukuda, and C. Sakamoto. 2006. Differential expression of cyclo-oxygenase-2 and nuclear beta-catenin in colorectal cancer tissue. *Aliment Pharmacol Ther* 24 Suppl 4:153-159.
82. Thomson, S., E. Buck, Petti F., G. Griffin, E. Brown, N. Ramnarine, K. Iwata, and J. Haley. 2005. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition. *Cancer Res* 65:9455-9462.
83. Tian, Ch.Y. and O.A. Phillips. 2002. Interaction between the transforming growth factor- β type II receptor/smad pathway and β -catenin during transforming growth factor- β 1-mediated adherens junction disassembly. *Am J Pathol* 160:1619-1628.

84. Tien, L.T., M. Ito, D. Niino, M. Serik, M. NAKamhima, C.Y. Wen, H. Yatsushui, and H. Ishibashi. 2005b. Expression of β -catenin in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 11:2398-2401.
85. Ueda, M., RM. Gemmill, and J. West. 2001. Mutations of the β - and γ -catenin genes are uncommon in human lung, breast, kidney, cervical and ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 1:64-68.
86. van Es, J.H., N.Barker, and H.Clevers. 2003. You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Curr Opin Genet Dev* 13:28-33.
87. Voutilainen, K.A., M.A. Anttila, S.M. Sillanpaa, K.M. Ropponen, S.V. Saarikoski, M.T. Juhola, and V.M. Kosma. 2006. Prognostic significance of E-cadherin-catenin complex in epithelial ovarian cancer. *J Clin Pathol* 59:460-467.
88. Weis, I.W. and W.J.Nelson. 2006. Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J Biol Chem* 281:35593-35597.
89. Weston, A. and C.Harris. 2003. Section 3: Cancer Etiology. Chemical Carcinogenesis. *In* Cancer Medicine 6. D. Kufe, R. Pollock, R. Weichselbaum, R. Bast, T. Gansler, J. Holland, and E. Frei, editors. BC Decker.
90. Xu, H.T., L. Wang, D. Lin, Y. Liu, N. Liu, X.M. Yuan, and E.H. Wang. 2006. Abnormal beta-catenin and reduced axin expression are associated with poor differentiation and progression in non-small cell lung cancer. *Am J Clin Pathol* 125:534-541.