



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**“Desregulación de miR-30c en un modelo de líneas celulares  
radioresistentes derivadas de cáncer cérvico uterino”**

**TESIS**

**Que para obtener el título de:**

**Biólogo**

**Presenta:**

**Oliver Millan Catalan**

**Director de Tesis: Dr. Roberto Eduardo López Urrutia**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México.**

**Noviembre 2015**





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.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Teodora y Santos, por todo el apoyo y la confianza.

A mis hermanos, Cynthia (Gore), Yuri (Yuyita) y David (Black), que siempre estaremos juntos.

A mis abuelitos Dolores y Felipe, mis segundos padres.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Carlos Pérez Plasencia, por permitirme ser parte de este gran equipo.

Al Dr. Eduardo López Urrutia, por ser mi tutor y guiarme en mi proceso de titulación. Al Dr. Abraham Pedroza Torres, Dr. Jorge Fernández Retana, Dra. Nadia Jacobo Herrera, Dra. Gabriela Figueroa y a la M. en B. E. Verónica García Castillo, por haberme apoyado en diferentes momentos de mi preparación académica.

# ÍNDICE

I. RESUMEN .....	5
Lista de figuras .....	6
II. INTRODUCCIÓN .....	7
Cáncer .....	7
1.1 Cáncer cérvico uterino .....	8
1.2 VPH.....	9
1.3 Desregulación de la expresión genética en CaCu .....	12
1.4 Tratamiento del cáncer cervical.....	14
1.4.1 Tratamiento quirúrgico .....	15
1.4.2 Quimioterapia.....	15
1.4.3 Radioterapia .....	15
1.5 Radioresistencia en cáncer cervical.....	17
1.6 PAKs .....	20
1.6.1. PAK1 en cáncer .....	24
1.6.2 PAK1 en radioresistencia.....	26
3. Ubc9 .....	27
3.1 Ubc9 y SUMOilación .....	27
3.2 UBC9 en cáncer .....	29
2. MicroRNAs.....	30
2.1 Biogénesis de los miRNAs.....	31
2.2 Función de los miRNAs .....	34
2.3 miRNAs y cáncer .....	35
3. Regulación por miRNAs sobre PAK1 y Ubc9 .....	36
II. JUSTIFICACIÓN.....	39
IV. HIPÓTESIS .....	40
V. OBJETIVOS.....	41
VI. MATERIAL Y MÉTODOS .....	42
Cultivo celular.....	42
Ensayo clonogénico.....	43
Extracción de RNA.....	43
qPCR .....	44
Extracción de proteínas .....	44
Western Blot.....	44
Ensayo de proliferación celular.....	45
VI. RESULTADOS .....	46
Comprobación de la radioresistencia en las líneas celulares .....	46
miR-30c se encuentra subexpresado en líneas celulares RR de CaCu .....	47
Niveles de expresión de PAK1.....	48
UBC9 se sobreexpresa en líneas celulares radioresistentes .....	48
Las líneas celulares RR tienen una mayor tasa de proliferación.....	49
VIII. DISCUSIÓN .....	50
IX. CONCLUSIONES .....	53
X. BIBLIOGRAFÍA.....	54

## I. RESUMEN

En la actualidad el cáncer cérvico uterino (CaCu) ocupa el segundo lugar como causa de muerte en mujeres por cáncer en México y el cuarto a nivel mundial. El uso de la quimio-radioterapia concomitante basada en cisplatino se considera el tratamiento estándar para las pacientes con enfermedad localmente avanzada, sin embargo, aproximadamente el 50% de los pacientes tendrán persistencia o recurrencia de la enfermedad, lo cual puede ser explicado por la presencia de células radioresistentes en el tumor. Se ha demostrado que PAK1 (*del inglés p-21 activated kinase*), -una cinasa de serina treonina activada por RAC1 y CDC42- y Ubc9 -una enzima E3 de SUMOilación-, son importantes reguladores de la radioresistencia y quimioresistencia en diferentes tipos de cáncer; además, de manera interesante, algunos miRNAs, como miR-30c, pueden regular negativamente a estas enzimas. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la regulación de PAK1 y UBC9 por miR-30c en líneas celulares derivadas de CaCu radioresistentes. Para ello, se generó un modelo de radioresistencia a partir de las líneas celulares HeLa, SiHa Y CaSki, en el que se evaluó la expresión de miR-30C, UBC9 y PAK1 mediante ensayos de qPCR y western blot, respectivamente; así como la proliferación celular mediante el ensayo de Sulforodamina B. En las líneas celulares HeLa y SiHa, miR-30c se encontró subexpresado en relación directa con la radiorresistencia. Sólo en la línea celular SiHa se encontró una correlación inversa entre miR-30c y Ubc9, lo cual sugiere una regulación postranscripcional dependiente del contexto celular.

## **Lista de figuras**

Figura 1. Características distintivas del cáncer

Figura 2. Genoma del VPH

Figura 3. Estructura de las PAKs

Figura 4. Mecanismo de activación de PAKs

Figura 5. Cascadas de señalización activadas por PAKs

Figura 6. Ciclo del proceso de SUMOilación

Figura 7. Biogénesis y función de los miRNAs

Figura 8. Determinación de la radioresistencia en las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki

Figura 9. Expresión relativa de miR-30c en líneas celulares RS y RR derivadas de CaCu

Figura 10. PAK1 se expresa en mayor medida en las líneas celulares CaSki y SiHa de CaCu

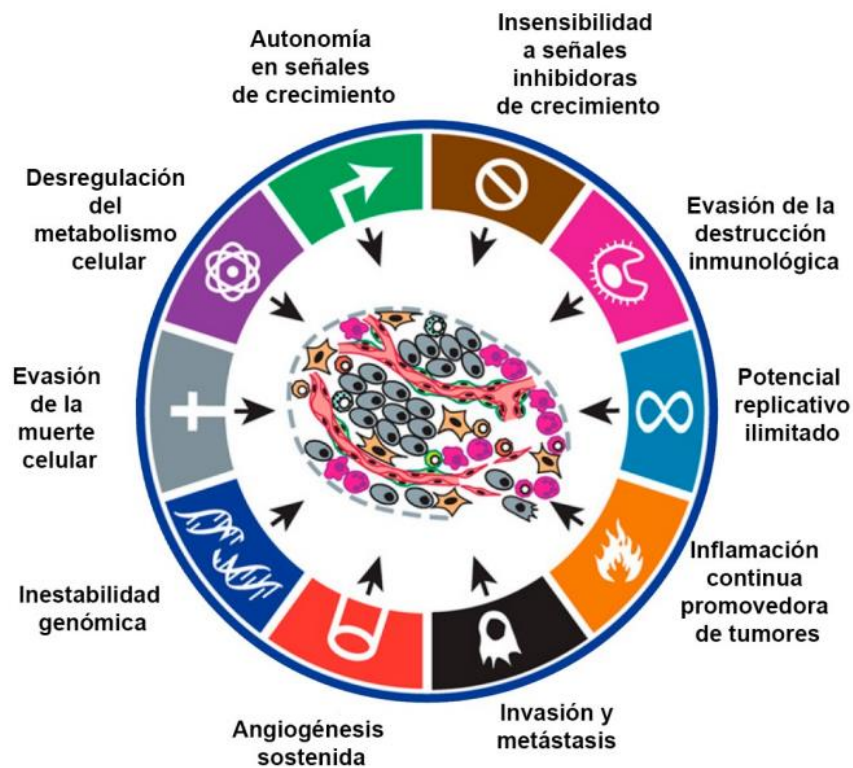
Figura 11. Ubc9 se encuentra sobreexpresada en la línea celular SiHa RR

Figura 12. Ensayo de proliferación en las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen multifactorial que presentan como característica en común la capacidad de proliferar descontroladamente como consecuencia de alteraciones genéticas y epigenéticas que provocan la transformación de células normales a células malignas. Hanahan y Weinberg propusieron los “*hallmarks of cancer*”, que son las características que subyacen a la serie de cambios complejos en los tejidos que dan lugar a tumores malignos. Los *hallmarks* incluyen: señalización proliferativa sostenida, evasión de los supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis y activación de la invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000). Recientemente se han incorporado dos *hallmarks* emergentes, reprogramación del metabolismo energético y evasión del sistema inmune (Figura 1) (Hanahan y Weinberg, 2011).





**Figura 1. Características distintivas del cáncer.** Características que las células tumorales adquieren durante el proceso de carcinogénesis (Hanahan y Weinberg, 2011).

Desde el punto de vista clínico, el cáncer representa un importante problema de salud siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En el 2012 se registraron 14.1 millones de casos nuevos de cáncer, de los cuales 8 millones fallecieron. Dentro de los tipos de cáncer más frecuentes se encuentran los de pulmón, colon, recto, estomago, mama y cérvico uterino (Ferlay, *et al.*, 2013).

### **1.1 Cáncer cérvico uterino**

A nivel mundial, de los tipos tumorales el cáncer cérvico uterino (CaCu) es la cuarta causa de muerte en mujeres, con un estimado de 528 000 casos nuevos por año de los cuales 265 653 (50.3%) terminan en muerte (Ferlay, *et al.*, 2013). En algunos países subdesarrollados el CaCu es la principal causa de muerte en pacientes en edad reproductiva y económicamente activas, estos casos están ligados frecuentemente al acceso limitado a un diagnóstico oportuno o a un tratamiento médico efectivo (Parkin, 2001). En México, el CaCu fue la primera causa de muerte por tumores malignos en la mujer hasta el año 2005; a partir de entonces, este tipo de cáncer ocupa el segundo lugar tanto en incidencia como en mortalidad (con 13 960 y 4769 casos respectivamente), lo cual no lo hace menos importante, ya que sigue presentando una alta tasa de mortalidad (Ferlay *et al.*, 2013)

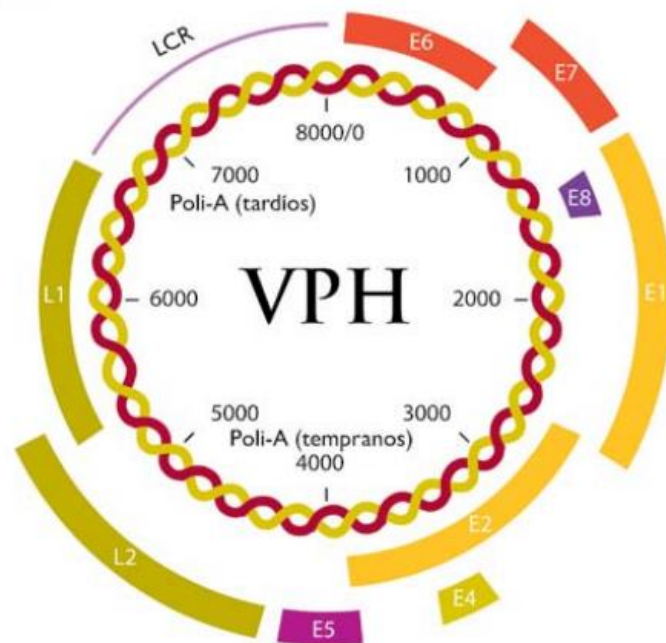
## 1.2 VPH

Desde hace más de cuarenta años, se señaló que el CaCu presentaba un comportamiento de enfermedad de transmisión sexual, y se evaluó el posible papel del virus del papiloma humano en el desarrollo de esta neoplasia (zur Hausen, 1974). Por medio de experimentos de hibridación, el doctor zur Hausen fue, el primero en demostrar, que las verrugas genitales y los tejidos de CaCu, contienen genomas del virus del papiloma humano (zur Hausen, 1977). Pero fue hasta 1991 cuando se estableció la asociación entre la infección por VPH y CaCu, después de haber considerado la evidencia epidemiológica y molecular que el DNA de VPH se encuentra presente en más del 99% de los casos de esta neoplasia (Bosch, 1992; Walboomers, 1999).

Más de cien tipos de VPH han sido identificados a la fecha, los cuales son clasificados con potencial oncogénico de alto riesgo o bajo riesgo. Los genotipos de alto riesgo más comunes en el mundo son 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 (de Villiers, 2004).

El cáncer de cérvix ocurre en dos tipos histológicos predominantes: carcinoma escamoso y adenocarcinomas. El más encontrado en las mujeres es el carcinoma escamoso (80% de los casos) y está más frecuentemente asociado al VPH 16. El adenocarcinoma es el segundo tipo más común y, aunque el VPH tipo 16 también es el más frecuentemente detectado, la proporción de los genotipos 18 y 45 aumenta significativamente (Reimers, 2009).

Los virus del papiloma son pequeños virus de DNA de doble cadena, sin envoltura, con una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro aproximado de 55 nm. Su genoma está constituido por aproximadamente 7200-8000 pares de bases, el cual se divide en tres regiones: una temprana E (early), la cual codifica para las proteínas virales (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7), necesarias para la replicación del DNA viral. La regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular; una región Tardía L (late), que codifica para proteínas estructurales (L1 y L2) y una región reguladora conocida como región larga de control LCR (Long control región), que contiene la secuencia de DNA que permite el control de la replicación y de la expresión del genoma viral (Figura 2, McMurray, 2001).



**Figura 2. Genoma del VPH.** El genoma del VPH es una molécula de DNA circular de doble cadena. Se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región temprana, que contiene a los genes E1 a E8; y la región tardía que contiene a los genes L1 y L2, los cuales constituyen la cápside.

El mecanismo de acción de los VPH de alto riesgo en el desarrollo de la neoplasia cervical, se explica principalmente por la acción de dos de sus oncoproteínas virales E6 y E7. Estas tienen la capacidad de immortalizar y transformar queratinocitos, confiriéndoles un alto grado de inestabilidad cromosómica. La expresión continua de estos genes, es requisito indispensable para mantener el crecimiento neoplásico de las células del cérvix. Estudios del mecanismo molecular del proceso de transformación, han revelado un complejo patrón de interacciones entre estas proteínas virales con reguladores celulares, envueltos en procesos biológicos como: la apoptosis, la proliferación y diferenciación celular (von Knebel, 2002).

Las oncoproteínas E6 y E7, promueven la progresión a través del ciclo celular, uniéndose a reguladores de este, induciendo proliferación de células basales infectadas. E6 es de las proteínas que se expresan muy tempranamente durante una infección por VPH. Esto le confiere varias funciones que alteran el ambiente celular, como por ejemplo el bloqueo de la apoptosis mediante la degradación de p53, la alteración de la transcripción de genes celulares a través de la interacción con p300 y CPB, e incremento de la vida celular por la sobreactivación de la telomerasa (Mantovi, 2001). E6 se une al producto del gen supresor de tumores p53 y lo conduce a su degradación a través de la vía de la ubiquitina. En este proceso, es necesaria la participación de la proteína celular asociada a E6 (E6-AP), que actúa como ubiquitin ligasa (Hengstermann, 2001).

E7 tiene la mayor capacidad transformante y actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB, que a su vez interactúan con

factores de transcripción de la familia E2F. La familia pRB controla la replicación celular (Boyer, 1996). La unión de E7 a la forma activa de pRB conduce a la liberación de los factores de transcripción E2F independientemente de la presencia de los factores de crecimiento externos, lo que promueve el crecimiento de la fase S del ciclo celular y por tanto la replicación celular. E7 también se asocia con otras proteínas tales como desacetilasas de histonas, AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como p21 y p27 (Munger, 2001).

No todos los pacientes infectados con VPHs oncogénicos desarrollaran CaCu, debido a la eliminación espontánea de secuencias virales. En diferentes estudios epidemiológicos se ha determinado que aproximadamente el 70% de las infecciones no progresara a carcinoma invasor (Ho, *et al.*, 1998; Molano, *et al.*, 2003). Lo cual nos indica que el VPH es una causa necesaria pero no suficiente para desarrollar CaCu, de tal manera que son requeridos otros factores como tabaquismo, actividad sexual temprana, multiparidad, uso constante de anticonceptivos orales, entre otros (Burk *et al.*, 1996).

### **1.3 Desregulación de la expresión genética en CaCu**

La expresión de los oncogenes de HPV ocasiona una desregulación generalizada del patrón de expresión de las células epiteliales. Estudios moleculares del proceso de transformación, han revelado un complejo patrón de interacciones de las proteínas virales con reguladores celulares, envueltos en procesos biológicos como: la apoptosis, la proliferación y diferenciación celular. Se considera que el proceso de integración del genoma del VPH al genoma de la célula hospedadora

es el evento fundamental en la progresión a cáncer (von Knebel, 2009). Debido a la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 por la pérdida de E2, proteína implicada en su regulación.

Por otra parte, existe la hipótesis de que los VPH pueden afectar los niveles de expresión de miRNAs celulares que pueden estar involucrados, no solo en el establecimiento del fenotipo tumoral, sino también en mecanismos relacionados a la resistencia a la radio- y quimioterapia en pacientes con CaCu. Esto debido a que se ha demostrado que entre las diversas interacciones complejas que tienen E6 y E7, involucran la activación de factores de transcripción, tales como E2F y c-Myc.

En este sentido, miR-34a ha sido identificado como un blanco transcripcional directo de p53. La transactivación de miR-34a se da por la unión de p53 a un sitio presente en la región promotora de dicho miRNA. De tal manera que si consideramos que la oncoproteína E6 de VPH desestabiliza a p53, es factible asumir que la desregulación de la expresión de miR-34a en los tejidos de CaCu que están infectados con VPH oncogénicos se debe a la acción de E6. miR-34a tiene múltiples blancos que son componentes del ciclo celular, entre ellos, CDK4, ciclina E2, E2F-1 y Bcl2, por lo cual es considerado indispensable en los procesos de proliferación y supervivencia celular (Tazawa, *et al.*, 2007; Welch, *et al.*, 2007). Además Kang y colaboradores, demostraron en un modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas, que miR-34a inhibe la vía de Notch-1 cuando se somete a un estímulo de radiación (Kang, *et al.*, 2013).

En otro estudio similar, se demostró que miR-23b se encuentra desregulado por acción de E6, ya que la región promotora de miR-23b presenta un sitio de unión a p53. Esta sobreexpresión de miR23b, potencia la expresión de uPA, lo que favorece la migración celular en CaCu (Au Yeng, *et al.*, 2011). Interesantemente, en células RR derivadas de cáncer de páncreas encontraron niveles reducidos de miR-23b comparadas con su control RS (Wang, *et al.*, 2012).

Un proceso clave durante la progresión del CaCu es la capacidad proliferativa de las células epiteliales. Recientemente, Melar-New and Laimins demostraron que la oncoproteína E7 es capaz de desregular la expresión de miR-203; y en diferentes estudios se ha visto que miR-203 es un potente inhibidor del fenotipo celular “stem cells”, de tal manera que su desregulación por E7 puede estar favoreciendo el fenotipo de las células tumorales (Melar-New y Laimins, 2010).

#### **1.4 Tratamiento del cáncer cervical**

El tratamiento del CaCu es normado de acuerdo al estadio en el cual sea diagnosticado (DiSaia, 2002), y las estrategias para el tratamiento estándar son cirugía radical, radioterapia y quimioterapia. Para mujeres que desean conservar la fertilidad se sugieren técnicas tales como la traquelectomía radical. La radioterapia puede ser usada para todos los estadios del cáncer cervical con ciertas modificaciones en dosimetría y técnica. Cada paciente debe ser evaluado individualmente y el esquema de tratamiento debe ajustarse a dicha evaluación (Xu, 2011).

### **1.4.1 Tratamiento quirúrgico**

La cirugía tiene como finalidad extirpar el tumor en su totalidad a nivel local. La cirugía es la primera opción en pacientes jóvenes sin contraindicaciones quirúrgicas. Para los estadios tempranos la cirugía conserva los ovarios evitando la menopausia temprana y preservando la función sexual, en comparación con la radioterapia radical (Scottish Intercollegiate Guidelines Network, 2008).

### **1.4.2 Quimioterapia**

Es el tratamiento con medicamentos que matan a las células cancerosas. Los diferentes fármacos utilizados en este tratamiento se administran por vía intravenosa o vía oral, y viajan a través del torrente sanguíneo hasta alcanzar su blanco. Los agentes quimioterapéuticos empleados actualmente son citotóxicos y actúan tanto en tejido maligno como en tejido normal. Para el CaCu se utilizan derivados del platino como el cisplatino, un agente alquilante que actúa bloqueando la proliferación celular (Citron *et al.*, 2003).

### **1.4.3 Radioterapia**

La radioterapia es muy utilizada para el tratamiento de CaCu. Esta involucra la aplicación de rayos X, gamma o partículas atómicas de alta energía. Afecta a las células que se están multiplicando rápidamente, en mayor proporción de lo que afecta al resto de las células normales. Forma iones en las células de los tejidos por los que pasa, lo cual daña al DNA e impide la proliferación celular (Suntharalingam, 2005).



La mayoría de las enfermas con CaCu son diagnosticadas en estadios avanzados, por lo tanto la radioterapia es la modalidad terapéutica más utilizada. Actualmente, el uso de quimio-radioterapia concomitante basada en cisplatino se considera el tratamiento estándar respaldado consistentemente en los resultados de varios estudios aleatorizados y dos meta-análisis (Scottish Intercollegiate Guidelines Network, 2008). De manera general, las modalidades de radioterapia según el estadio de la enfermedad son las siguientes:

**Teleterapia:** se aplica a distancias de 30 a 100 cm de la paciente, dividida en 20-30 tratamientos separados al día durante 4-6 semanas. Maneja energía de megavoltaje, preferiblemente con fotones de 6 MeV que se dirigen al volumen tumoral. Considera 2 a 4 campos (antero-posterior y/o laterales). El fraccionamiento de 180 – 200 cGy, 5 veces a la semana hasta una dosis que oscila entre 4500 – 5040 cGy. Dosis de refuerzo a parámetros con protección de línea media hasta completar una dosis entre 6000 – 7000 cGy en puntos B (Symonds y Foweraker, 2006).

**Braquiterapia:** Son radiaciones a corta distancia dirigidas directamente sobre el tumor a través de aplicadores radiactivos (radioisótopos: <sup>222</sup> Radio, <sup>137</sup> Cesio y <sup>192</sup> Iridio.) que se introducen en la vagina y cavidad uterina tales como: sonda intrauterina, ovoides o cilindro intravaginal. Las dosis de braquiterapia pueden ser de baja tasa (dosis entre 40 y 200 cGys/hora) o de alta tasa (dosis mayores de 1200 cGys/hora). Los cGY (equivalente a 1 rad) miden la cantidad de energía absorbida por unidad de masa (tejidos). La braquiterapia de baja dosis se da después de terminar la teleterapia. La paciente recibe la radiación en cGy

calculada para los puntos A (situados a 2 cm del centro del canal del útero). Si se contempla un segundo implante (punto B), éste debe realizarse dentro de las tres semanas siguientes de haber completado la radioterapia. La braquiterapia de alta dosis se suministra en puntos A, repartidas en 5 fracciones cada una de 600 cGy, concomitante con la teleterapia, iniciándola la cuarta semana de tratamiento, realizando un implante semanal (Miglierini, *et al.*, 2015).

### **1.5 Radioresistencia en cáncer cervical**

Aunque la radioterapia es utilizada ampliamente en el tratamiento del CaCu localmente avanzado, existe un alto porcentaje de recurrencia, aproximadamente el 50% de los pacientes tendrán persistencia o recurrencia de la enfermedad, lo cual puede ser explicado por la presencia de células radioresistentes en la masa tumoral (Quinn, 2006). Un meta-análisis muestra que los pacientes con CaCu que reciben radioterapia ya sea sola o en combinación con diferentes fármacos, el 40-70% tienen una tasa promedio de 5 años de supervivencia (Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration, 2008).

Muchos factores están involucrados en la resistencia a la radioterapia. Hasta el momento se han descrito varios, tanto nucleares como membranales en CaCu. Estos factores están relacionados con diferentes mecanismos como reparación del DNA, apoptosis, arresto del ciclo celular, crecimiento celular, supervivencia y proliferación. Algunos de los mecanismos frecuentemente alterados y que favorecen el fenómeno de radioresistencia son:

**P53:** Las mutaciones en este gen localizado en el cromosoma 17p son mutaciones presentes en varios tipos de cáncer. P53 está implicado en múltiples procesos como son el control del crecimiento y apoptosis; de tal manera que mutaciones en este gen se han asociado a quimio y radioresistencia. El mecanismo por el cual se genera radioresistencia cuando p53 esta mutado no se comprende del todo, pero se cree que es la pérdida del control del ciclo celular, reparación de DNA y apoptosis, lo que contribuye a dicho mecanismo (Marchetti *et al.*, 2003).

**BCL2:** Éste proto-oncogen que se encuentra expresado en células normales y promueve la supervivencia celular al bloquear la apoptosis. Se ha visto que la sobreexpresión en tejidos tumorales se asocia con la resistencia a la radiación (Provenzano, 2003).

**Proteína Ku70/80:** La recombinación no homologa (NHEJ, del inglés *non-homologous end joining*) necesita de proteínas de unión terminal que funcionan como factores de reparación. En este proceso participa la proteína Ku, formada por Ku70 y Ku80, que junto con DNA-PKcs forman el complejo DNA-PK. La proteína heterodimérica Ku se encarga de unirse a los cortes del DNA sin discriminar la naturaleza del corte, y activa a DNA PKcs para que realice la reparación. Varios autores han analizado los efectos de la irradiación gamma en los niveles celulares de la proteína Ku, y encontraron que la irradiación producía una estimulación en los niveles celulares de Ku70 pero no de Ku80, y que los niveles altos de Ku70 se acumulaban en el núcleo celular. Además, el aumento de Ku70 postirradiación utilizaba mecanismos dependientes de p53 y ATM. Las

células deficientes en XRCC5 (gen que codifica para la proteína Ku80) eran hipersensibles a la radiación ionizante. De este modo, la sobreexpresión de este gen se observaba en células de cáncer radio-resistentes, siendo XRCC5 uno de los genes más importantes en la determinación del destino de las células cuando se encuentran bajo estrés causado por la radiación (Beskow, *et al.*, 2009).

**HIF-1 $\alpha$ :** Se sabe desde 1999 que la RI es efectiva en células normóxicas, pero tiene menor efectividad en células hipóxicas (Brown, 1999). La expresión de Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) se induce transitoriamente en tumores posterior a la radioterapia en respuesta al estrés de reoxigenación, y esta inducción alcanza su nivel máximo alrededor de 48 horas después de la irradiación (Moeller *et al.*, 2004). HIF-1 transactiva varios genes de respuesta a hipoxia, lo cual le confiere propiedades malignas a los tumores, tales como resistencia a la apoptosis, potencia el crecimiento celular, invasión y metástasis. Además HIF-1 activa citosinas proangiogénicas tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas, lo cual le confiere a las células endoteliales resistencia a la radiación así como un incremento en la proliferación de los vasos sanguíneos del tumor. Incluso en un modelo de xenógrafo (con células HeLa) se demostró que HIF-1 activo juega un rol crucial en la angiogénesis y radioresistencia (Harada, 2007).

**Methaderinas:** En cáncer se ha encontrado que las metaderinas promueven la metástasis, invasión, angiogénesis y quimioresistencia, sugiriendo que puede tener una función importante como oncogen. Recientemente se descubrió que el knockdown de MTDH incrementa la radiosensibilidad de células de CaCu a rayos X (Zhao, 2012).

**miRNAs:** Nuestro grupo de trabajo ha encontrado, a través de análisis de microarreglos en muestras de pacientes con CaCu, varios miRNAs sub- y sobreexpresados en tumores radioresistentes, de entre los cuales resaltan miR-100a y miR-30c (Pedroza-Torres, *et al.*, 2015).

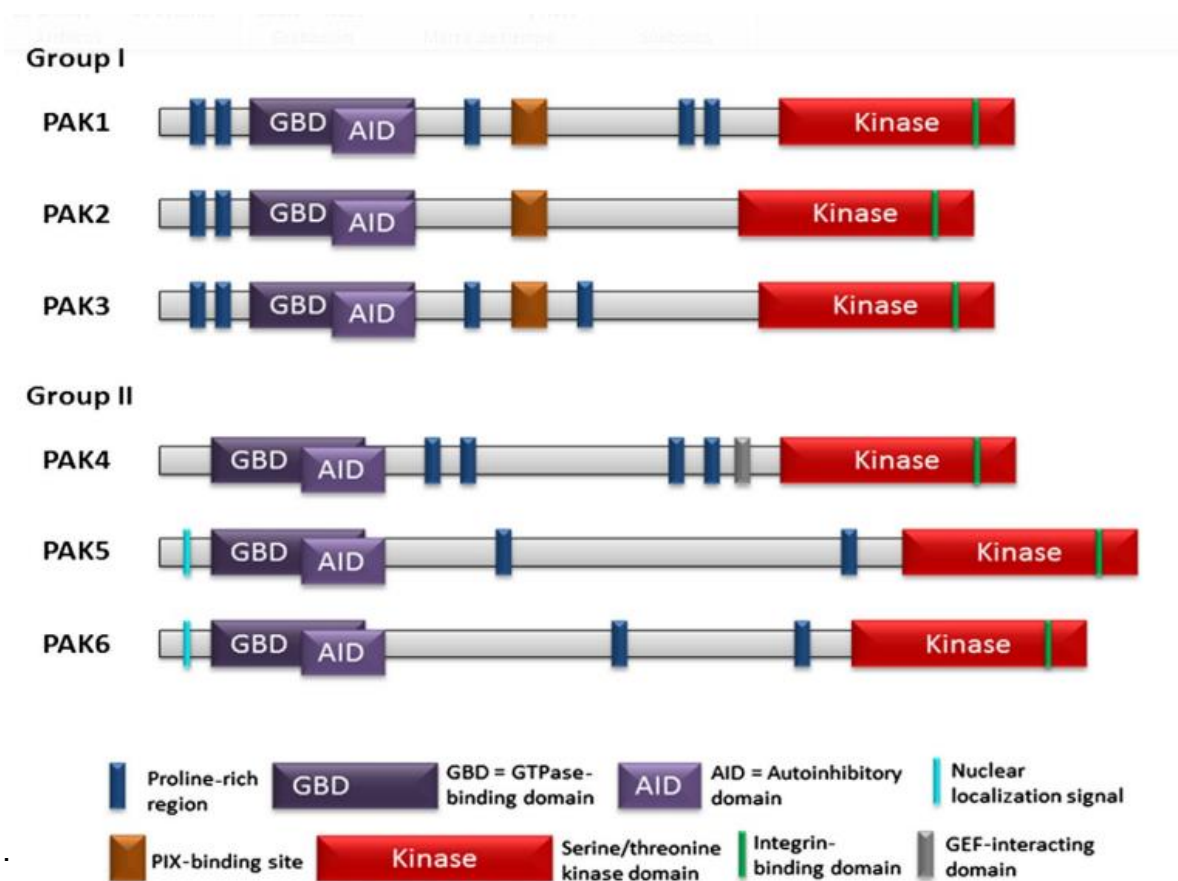
**PAKs:** Varios estudios sugieren que las cinasas activadas por p21 (PAKs) tienen un rol clave en varios de los hallmarks del cáncer, que incluyen proliferación celular, resistencia a muerte celular, activación de la invasión, metástasis y angiogénesis (Radu, 2014).

## 1.6 PAKs

Las cinasas activadas por p-21 o PAKs (del inglés: *p-21-activated kinases*) constituyen una familia altamente conservada de proteínas cinasas de serina/treonina que comprende seis miembros (PAK1-6). Inicialmente fueron identificadas como efectoras de RAC1 Y CDC42 (Tahara y Traugh, 1998; Manser 1994), las cuales son miembros de la familia de GTPasas de Rho. La actividad cinasa de PAKs ha sido implicada en un amplio rango de procesos celulares que incluyen, morfología celular, motilidad, supervivencia, actividad transcripcional, apoptosis y señalización hormonal (Kumar, 2006; Arias-Romero, *et al.*, 2010).

Estas enzimas están ampliamente expresadas en numerosos tejidos y una vez que son activadas por señales extracelulares a través de mecanismos dependientes e independientes de GTPasas, y entonces a través de la gran lista de proteínas con las que interactúa rio abajo ejerce un control regulatorio sobre los procesos biológicos esenciales.

Todas las isoformas de PAKs consisten de un dominio de cinasa en la región C-terminal, un dominio regulatorio en el N-terminal, y un dominio inhibitorio, representado en la figura 3. Con base en su estructura y funciones biológicas similares, las isoformas de PAKs son clasificadas en dos grupos: PAK1, PAK2 y PAK3 pertenecen al Grupo I, mientras que PAK4, PAK5 y PAK6 están en el Grupo II. Estas están sobreexpresadas y/o hiperactivadas en varios tipos de cáncer tales como cáncer de mama, neurofibromatosis, cáncer de colon, cáncer de pulmón, entre otros (Kumar, 2006).



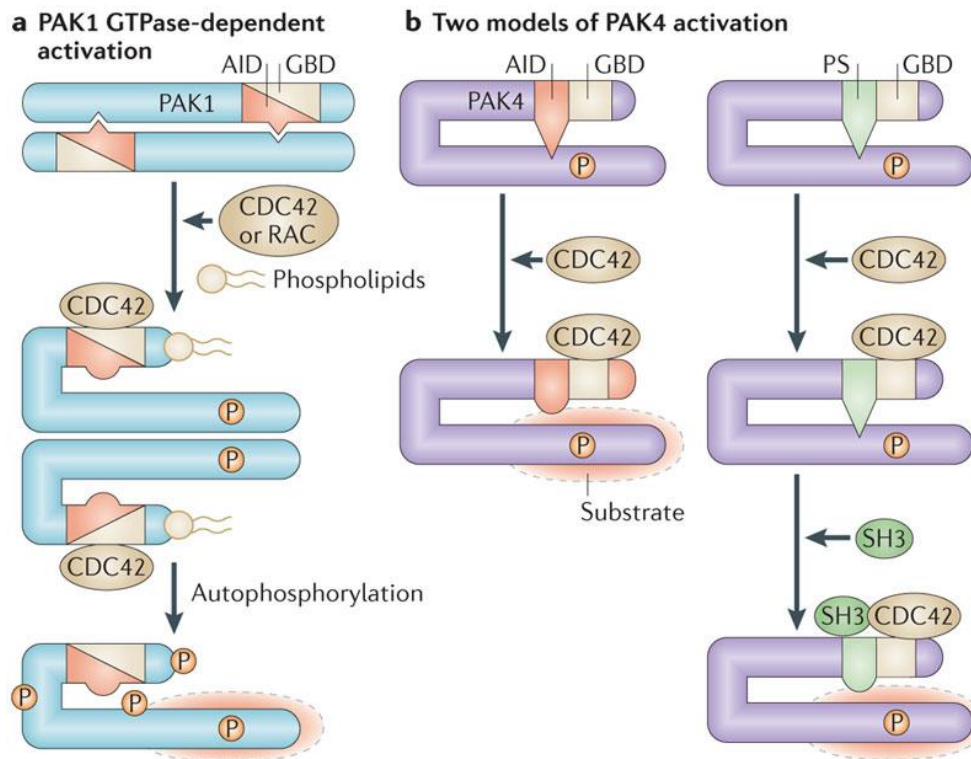
**Figura 3. Estructura de las PAKs.** La familia de las cinasas de PAKs consiste de seis isoformas, divididas en dos grupos de acuerdo a la homología de su secuencia. El dominio AID para PAK4 y PAK6 son tentativos (King, *et al.*, 2014).

**Grupo I.** Las tres isoformas de este grupo son proteínas de peso molecular semejante de 68kDa (PAK1), 62 kDa (PAK2) y 65 kDa (PAK3). Todos los miembros del grupo I contienen un dominio de unión a GTPasa (GBD) en el extremo N-terminal con un dominio autoinhibitorio (AID) sobrepuesto, y un dominio de cinasa de serina/treonina. Estas isoformas generalmente están inactivadas por la formación de dímeros trans, donde la AID de una proteína inhibe el dominio de cinasa de otra (Figura 4) (King, 2014).

La alta homología del dominio de cinasa entre los diferentes miembros de este grupo, sugieren similares blancos de fosforilación (Figura 5). Esto es particularmente evidente entre PAK1 y PAK2 los cuales *in vitro* muestran prácticamente los mismos blancos de fosforilación (Arias-Romero y Chernoff, 2008).

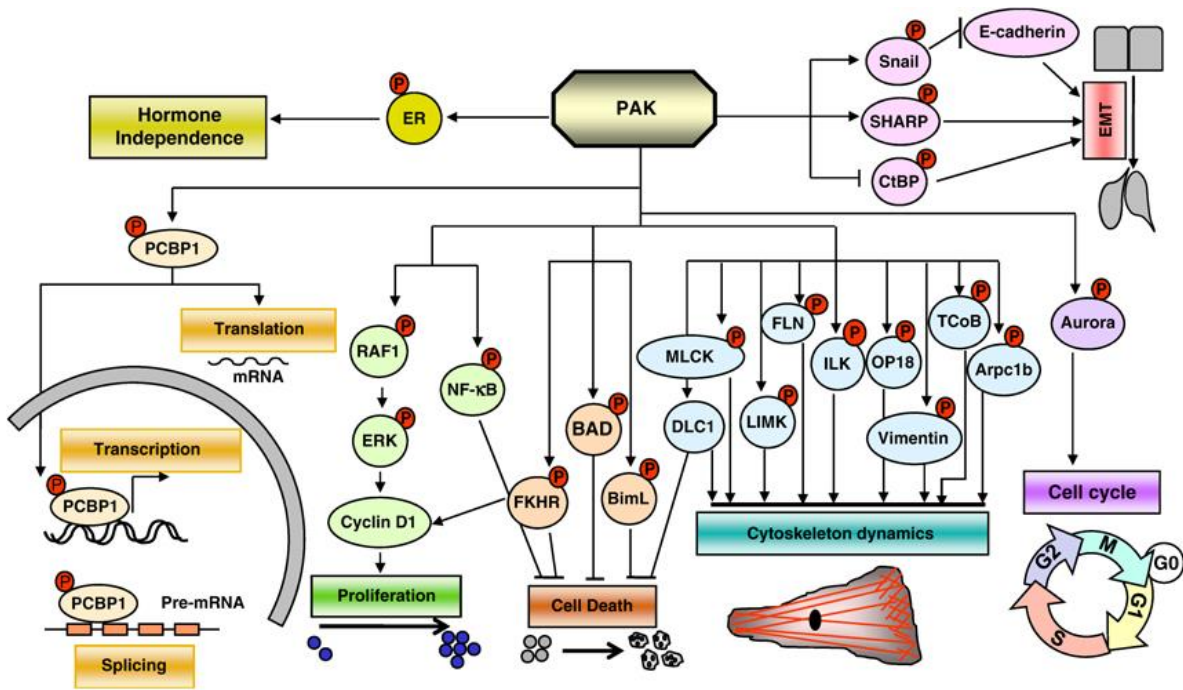
**Grupo II.** PAK4, PAK5 Y PAK6, son estructuralmente distintas a las PAKs del grupo I. PAK4, fue el primero en ser descubierto y el más ampliamente estudiado, con varias menciones relacionadas con el cáncer (Dart y Wells, 2013).

Aunque, tanto el dominio GBD y el dominio de cinasa, son similares en todas las isoformas de PAKs, los motifs que presentan son quienes diferencian al grupo 1 y 3 de PAKs, lo cual permite que tengan un mecanismo de regulación distinto. Esto implica que éstas enzimas tengan funciones celulares distintas (Arias-Romero y Chernoff, 2008).



**Figura 4. Mecanismo de activación de PAKs.** Las PAKs que pertenecen al grupo I PAKs son reguladas a través de un mecanismo de autoinhibición. El dominio GBD en la región N-terminal se sobrelapa con el dominio AID, lo cual mantiene al homodímero inactivo. La unión de GTPasas Rho activas tales como (CDC42 y RAC1) a GDB, conduce a la disociación del homodímero y su subsecuente autofosforilación en múltiples sitios que permiten la estabilización del estado catalíticamente activo. El mecanismo de activación del grupo II está menos claro, se cree que las enzimas están fosforiladas constantemente pero autoinhibidas por su dominio AID, y que al unirse CDC42 al dominio GBD se rompe dicha inhibición y entonces la cinasa se activa (Radu, *et al.*, 2014).





**Figura 5. Cascadas de señalización activadas por PAKs.** Al ser activadas PAKs por señales extracelulares, participa en varias redes de señalización (Molli, *et al.*, 2009).

### 1.6.1. PAK1 en cáncer

En un gran número de tumores humanos se ha encontrado la isoforma PAK1 sobreexpresada o hiperactivada. El gen que codifica PAK1 se encuentra localizado dentro de la región 11q13, una región frecuentemente amplificada en cáncer de hígado, ovario y mama (Zi, 2012).

En cáncer de mama, la desregulación de PAK1 está bien documentada y correlaciona con incremento de la supervivencia e invasividad de estas células cancerosas (Balashenthil, 2004). El mecanismo molecular por el cual PAK1 promueve la transformación celular epitelial de mama, ha sido extensivamente estudiada en cultivo celular tridimensional (Wang, 2006). Friedland *et al.*, mostraron una relación entre la resistencia de las celulares tumorales a la

apoptosis y la activación de NFKappaB por PAK1 (Friedland, 2008). Otro de los mecanismos por los cuales PAK1 promueve la supervivencia celular es a través de la fosforilación de proteínas proapoptóticas como BAD y FKHR (Vadlamudi, 2004).

En modelos de cáncer de mama, la sobreexpresión de PAK1 correlaciona con la activación de la vía de ER-a (del inglés, *estrogen receptor-a*) independientemente del ligando, lo cual hace a las células insensibles a terapias antiestrógenos, tales como el tamoxifeno (Holm, 2006). Interesantemente, la resistencia a tamoxifeno fue encontrada en tumores que contenían niveles nucleares de PAK1 más altos, lo cual indica que la actividad nuclear de PAK1 podría ser importante en el desarrollo de esta resistencia.

La expresión y actividad de PAK1 también están sobrerreguladas en otros tipos de cáncer, los cuales incluyen algunos de origen neuronal. Se ha establecido que PAK1 juega un rol central en Neurofibromatosis tipo 1, la cual es causada por la pérdida de una proteína GAP de Ras (Tang *et al.*, 1998); en otro estudio, tanto PAK1 y PAK2 se han asociado a neurofibromatosis tipo 2 (Surace, 2004).

La sobreexpresión de PAK1 es observada en un 70% de muestras analizadas en cáncer de colon y esta correlacionada con algunas vías de señalización que incluyen la vía Wnt, Erk Y Akt. La reducción de la expresión de PAK1 decrementa la proliferación celular, migración/invasión y supervivencia. La cascada Rac1/Pak1 controla fosforilación de B-catenina en la S675 y su activación en células de cáncer de colon, de tal manera que la desregulación de PAK1 en estas células,

reduce los niveles de B-catenina y la proliferación celular. También está demostrado que PAK1 fosforila directamente a B-catenina en la S675, lo cual la hace más estable y transcripcionalmente activa (Zhu, *et al.*, 2012). Por otra parte. Erk y Akt, son blancos de PAK1 y están involucrados en la progresión del cáncer de colon. De tal manera que la inhibición de PAK1 es equivalente a la inhibición dual de Erk y Akt, mientras que la inactivación de una sola de estas proteínas, solo inhibe parcialmente la migración celular, invasión, supervivencia y no tiene efecto sobre la proliferación (Huynh, 2010).

En el caso de cáncer de ovario, por análisis del amplicon del cromosoma 11 en el locus 11q13.5-q14, se determinó que el gen de PAK1 frecuentemente se encuentra amplificado (59%) (Bekri, *et al.*, 1997), lo cual sugiere un cáncer que es dependiente de la vía Ras-PI3K-PAK1.). También se ha mostrado en líneas celulares derivadas de este mismo tipo de cáncer, PAK1 se encuentra anormalmente activado por autofosforilación en la Thr 423, son más sensibles a la inhibición del crecimiento usando el péptido TAT-PAK18 el cual bloquea la interacción esencial entre PAK1-PIX (Hashimoto, 2010).

En carcinomas hepatocelulares, la sobreexpresión de PAK1 se asocia con un tumor más agresivo en términos de un fenotipo más metastásico (Ching, 2007).

### **1.6.2 PAK1 en radioresistencia**

PAK1 tiene un rol esencial en la tumorigénesis y en la supervivencia celular en varios tipos de cáncer. Además se ha demostrado que PAK1 puede proteger contra la quimioterapia y muerte celular inducida por anoikis (Ong, 2011).

En un perfil de transcriptoma de células radioresistentes de pulmón A549, encontraron que PAK1 se encuentra sobreexpresado después de ser expuestas a radiación ionizante (Yang, 2013).

En células de cáncer de pulmón, se demostró que JAK2 fosforila a PAK1 en residuos de Tyr y favorece su estabilización, el cual se transloca al núcleo y al asociarse con Snail, promueven la transición mesénquima epitelial y la radioresistencia (Kim, 2014).

Como la sobreexpresión de PAK1 ha sido notada incluso en ausencia de la amplificación del gen, es necesario descubrir y comprender los factores que controlan la expresión del gen, degradación de la proteína o regulación postranscripcional. Y uno de los mecanismos moleculares postranscripcionales que regulan la expresión de los genes que conllevan a diversas alteraciones asociadas al desarrollo del cáncer en general y del cáncer cervical en particular, son los microRNAs.

### **3. Ubc9**

#### **3.1 Ubc9 y SUMOilación**

La SUMOilación es una modificación postraducciona caracterizada por la unión covalente y reversible de un polipéptido pequeño relacionado con ubiquitina (SUMO) a una proteína blanco en residuos de lisina. Se han identificado cuatro isoformas de SUMO (SUMO-1, -2, -3, y -4), estas proteínas tienen un peso molecular de aproximadamente 12 kDa y tienen una estructura tridimensional similar a la ubiquitina (Bettermann, *et al.*, 2002).

La SUMOilación es un proceso de varios pasos: una proteína precursora de SUMO sufre un proceso de maduración efectuado por proteasas de cisteína, llamadas isopeptidasas, las cuales cortan el extremo C-terminal del precursor. La proteína SUMO madura es entonces activada por una enzima E1 de SUMO, un heterodímero de las proteínas AOS1 y UBA2, finalmente es conjugada a la proteína blanco por la enzima E2 de SUMO, llamada Ubc9. En algunos casos se requiere de una enzima E3 para llevar a cabo el proceso de conjugación. El resultado es una proteína sumoilada usualmente con un corto tiempo de vida, la cual puede ser rápidamente desumoilada (Figura 6) (Hay, *et al.*, 2005).

A diferencia de la ubiquitinación, la SUMOilación de proteínas no solo conduce a la degradación por la vía del proteasoma, esta modificación es esencial para mantener la estabilidad de la proteína, transporte núcleo-citoplasma, interacción de proteínas, regulación transcripcional, etc. De tal manera que la SUMOilación está involucrada en procesos celulares como la mitosis, diferenciación celular, senescencia y apoptosis (Deyrieux, *et al.*, 2007; Gill, 2005; Ihara, *et al.*, 2007).

En el proceso de SUMOilación Ubc9 es la única enzima de conjugación E2, de tal manera que es un regulador clave en este proceso (Bettermann, *et al.*, 2011).

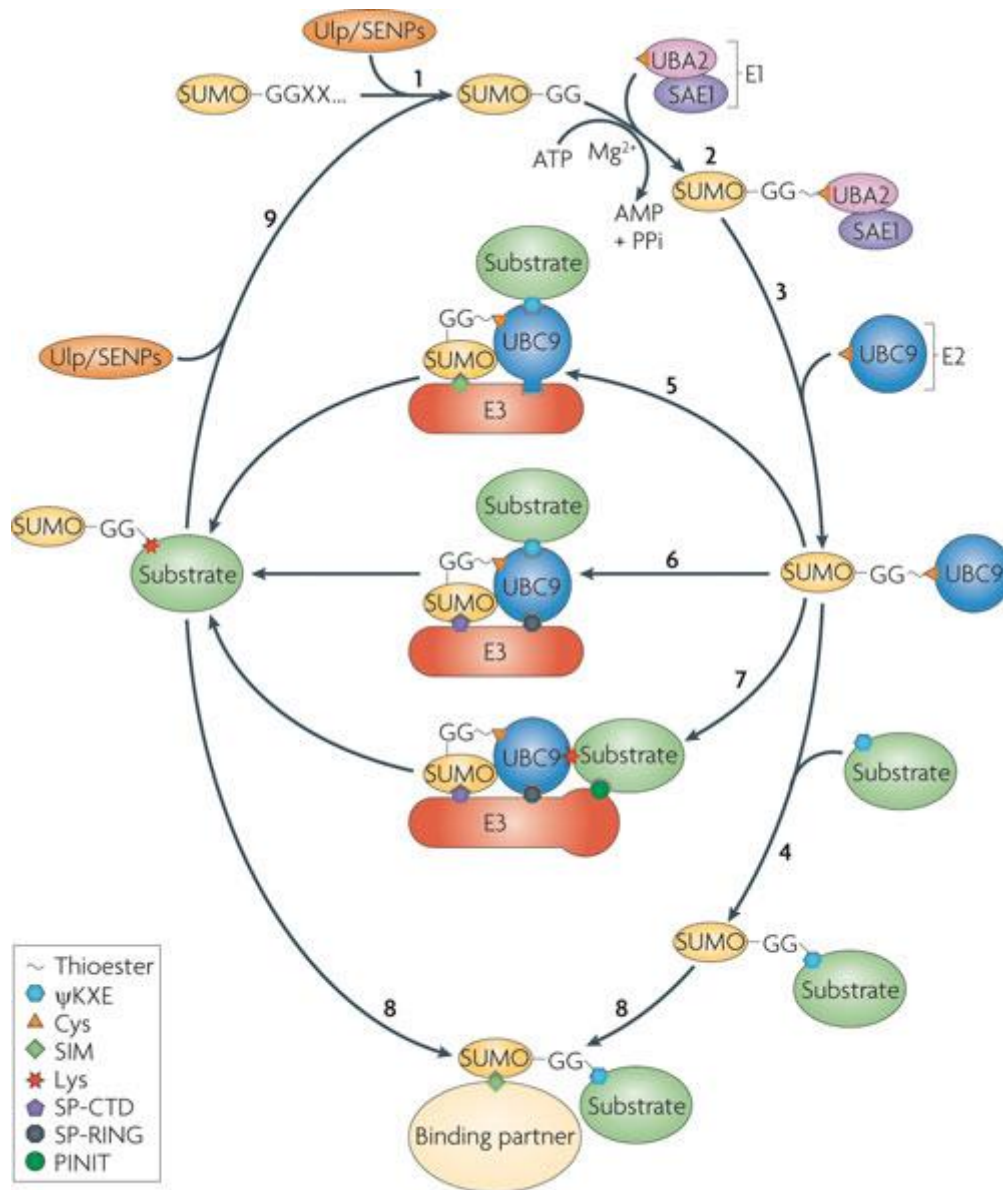


Figura 6. Ciclo del proceso de SUMOilación. (Hihara, *et al.*, 2007) Nature Reviews | Molecular Cell Biology

### 3.2 UBC9 en cáncer

Se sabe que las modificaciones postraduccionales están críticamente involucradas en la carcinogénesis por regular la actividad de diversas proteínas, se ha encontrado que diferentes receptores y moléculas de señalización intracelular pueden ser modificadas por SUMOilación, lo cual contribuye significativamente a la carcinogénesis, por ejemplo: IGF-1R (Zhang, 2015), receptor TGF-B tipo I

(cáncer de pulmón), Reptin y Pontin (carcinoma hepatocelular y cáncer colorrectal).

En cáncer de mama, polimorfismos del gen que codifican para la enzima de conjugación UBC9 han mostrado recientemente que se asocian con el grado del tumor en carcinoma de mama (Dunnebier, *et al.*, 2009). Además se ha descrito que el proceso de SUMOilación está involucrado en mecanismos de respuesta a estrés, de tal manera que puede ser asociado con la tumorigénesis (Morris, *et al.*, 2009).

Particularmente en CaCu, existen reportes muy interesantes en los cuales se asocia la actividad de la oncoproteína E7 de VPH16 con el grado de SUMOilación de factores de transcripción como FoxM1b (Jaiswal, *et al.*, 2015).

## **2. MicroRNAs**

Los microRNAs (miRNAs) son una clase abundante de RNAs pequeños no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, que han sido identificados tanto en plantas como en animales y juegan un papel importante como reguladores de la expresión génica en una gran variedad de procesos biológicos (Kim, 2005). Estos fueron descubiertos por Victor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum en 1993, quienes encontraron que lin-4, un gen que actúa en el desarrollo de *Caenorhabditis elegans*, no codificaba para una proteína, pero generaba 2 transcritos pequeños de aproximadamente 22 y 61 nucleótidos (nt), éste último podía adoptar una conformación de horquilla (*stem-loop*) y era el precursor del primero. Se descubrió que estos RNAs contenían secuencias

complementarias al extremo 3' no traducible (3'UTR) del RNAm de lin-14, sugiriendo que lin-4 regulaba la traducción de lin-14. Posteriormente Ruvkun y colaboradores mostraron una disminución de la proteína sin disminución de los niveles de RNAm. Lin-4 es, en consecuencia conocido como el fundador de la clase abundante de RNAs pequeños reguladores denominados miRNAs, los cuales presentan patrones de expresión dependientes del tipo celular y tejido. El segundo miRNA conocido fue let- 7, otro RNA regulador de aproximadamente 22 nt presente en *C. elegans* (Lee, *et al.*, 1994).

## **2.1 Biogénesis de los miRNAs**

Los miRNAs se originan a partir de un transcrito primario conocido como pri-miRNA, producido por la RNA polimerasa II, sin embargo existen algunos casos en los que los pri-miRNAs son transcritos por la RNA Pol III. (Figura 7). Éste tiene una longitud aproximada de 1 kb, a partir de una región no codificante o de un gen miR. Este pri-miR generalmente puede contener la secuencia de uno o varios miRNAs y se caracteriza por presentar una forma de horquilla-aza. Esta horquilla es reconocida por una RNAasa III nuclear denominada DROSHA, que junto con una proteína denominada DGRCR8 procesan el pri-miRNA para generar un RNA de doble cadena de aproximadamente 70 nucleótidos con una estructura de horquilla, denominado pre-miRNA. Esta estructura es reconocida por la exportina 5 y una Ran-GTPasa para ser transportada del núcleo al citoplasma (Bartel, 2009). Ya en el citoplasma, una proteína denominada Dicer, reconoce el pre-miRNA y lo corta para generar un miRNA de doble cadena de aproximadamente 22 pares de



bases (Denli *et al.*, 2004). El paso final de la biogénesis de los miRNAs es la subsecuente incorporación del miRNA dúplex al complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC), compuesto por Dicer, proteínas de la familia Argonauta (AGO), TRBP y PACT. En este complejo se separan las dos cadenas y una de ellas, la más termodinámicamente estable da lugar al miRNA maduro de unos 20-25 nt, el cual se unirá por complementariedad total o parcial a la región 3'UTR del RNAm blanco. Particularmente, los nucleótidos 2-7 del miRNA son claves para reconocer a su blanco, por lo que se les denomina región "semilla" (Hammond, 2015).



## 2.2 Función de los miRNAs

Los miRNAs se unen al RNAm blanco para reprimir traducción e incluso degradar el RNAm blanco, función que realiza la AGO2 parte del complejo RISC (Diederichs y Haber, 2007).

La mayoría de los miRNAs presentan un perfil de expresión tiempo y tejido específico. Dado a su expresión, se sospecha que estos miRNAs están relacionados con funciones básicas como el metabolismo.

Es necesario identificar cuáles son sus posibles RNAs blancos y los procesos biológicos en lo que participan. La predicción efectiva de los blancos de los miRNAs permanece desconocida debido a la complejidad de la interacción y el conocimiento limitado de las reglas que gobiernan este proceso.

Sin embargo, ante el gran número de eventos de regulación por miRNAs, se han hecho esfuerzos por consolidar esta información en repositorios que permitan predecir la función de los miRNAs mediante análisis. Estas estrategias, han mostrado que alrededor de una tercera parte de todos los RNAm pueden ser blancos de miRNAs; es decir que cada uno tiene un promedio de 200 genes blanco, es decir, un solo miRNA, puede tener múltiples genes blanco y un solo gen puede ser regulado por múltiples miRNAs. Por tanto, los miRNAs constituyen una de las clases más abundantes de genes reguladores en mamíferos (Hammond, 2015).

Algunos de los parámetros que frecuentemente se toman en cuenta en los algoritmos computacionales para dicha predicción son: la región semilla, el

número de sitios de unión en el blanco, termodinámica de la interacción, conservación contexto del gen hospedero del miRNA. Dichos algoritmos, pueden ser clasificados en dos categorías con base al uso o no del criterio de conservación. Entre los algoritmos basados en el criterio de conservación están por ejemplo: miRanda, PiTar, TargetScan, Diana-microT; mientras que Pita Y rna22 son los algoritmos que usan otros parámetros tales como energía libre de unión o estructuras secundarias del 3'UTR que pueden promover o prevenir la unión del miRNA. (Di Leva *et al.*, 2014).

### **2.3 miRNAs y cáncer**

Hay una amplia literatura sobre el pronóstico de los perfiles de expresión de miRNAs en diversos tipos de cáncer, de tal manera que los miRNAs podría funcionar como oncogenes o como genes supresores de tumores. La sobreexpresión o pérdida de expresión de los genes que codifican los miRNAs, puede alterar drásticamente la actividad de vías de señalización específicas (Revisado por Banno, 2014).

Por ejemplo, la familia let-7 fue el primer grupo identificado como supresores de tumores. Estos regulan negativamente la expresión de oncogenes, específicamente los genes RAS. La sobreexpresión de los oncogenes RAS ha sido observada en CaCu y la expresión de let-7 se encuentra significativamente aumentada en líneas celulares de CaCu. Las proteínas Ras son proteínas de membrana que regulan el crecimiento y diferenciación celular a través de las vías de señalización NFkB, PKB/AKT, y MAPK. Experimentos in vitro mostraron que

let-7 es capaz de inhibir la proliferación celular a través de la desregulación de RAS, por lo cual se infiere que este miRNA puede funcionar como un supresor de tumor en este contexto (Johnson *et al.*, 2005).

Algunos miRNAs se encuentran sobreexpresados lo cual permite suponer que juegan un rol oncogénico. El primer ejemplo son los miembros de la familia miR-10 que han sido reportados por encontrarse sobreexpresados en varios tipos de cáncer (Zhang, *et al.*, 2006). miR10a fue encontrado sobreexpresado en cáncer de colon (Volinia, *et al.*, 2006) y CaCu (Pereira, *et al.*, 2010).

Existe una variedad de estudios que relacionan la desregulación de miRNAs y el desarrollo de un fenotipo tumoral. Por ejemplo, un estudio en el cual se analizaron por PCR en tiempo real 102 biopsias de tumor de CaCu, se encontraron 96 miRNAs relacionados con este tipo de cáncer, de los cuales miR-200a y miR-9 fueron significativamente asociados con el tiempo de supervivencia total. Posteriormente, ensayos in vitro mostraron que miR-200a puede regular el potencial metastásico de las células cancerosas para migrar a sitios distantes; mientras que los genes regulados por miR-9, fueron involucrados en procesos metabólicos, que explican el mantenimiento de la alta tasa metabólica presente en las células tumorales (Hu, 2010).

### **3. Regulación por miRNAs sobre PAK1 y Ubc9**

Algunos estudios que nos indican que PAK1 puede ser blanco de la regulación por miRNAs en varios modelos. En uno de ellos, en ratas Wistar a las cuales se les indujo Cardiomiopatía, se encontró una correlación inversa entre la

sobreexpresión de los genes PAK1 y Cdc42, y el decremento de miR-30c (Raut *et al.*, 2015). En otro estudio, se encontró que pacientes con enfermedad arterial coronaria muestran una sobrerregulación estadísticamente significativa de la expresión de miR-221, las herramientas bioinformáticas sugirieron a PAK1 como un posible blanco de dicho miRNA, lo cual fue corroborado por ensayo de luciferasa (Zhang, *et al.*, 2013).

Particularmente en cáncer, Reddy y colaboradores (2008) fueron el primer grupo de investigadores en demostrar que PAK1 es susceptible a regulación por miRNAs en un modelo de cáncer de mama. Mostraron que miR-7, se une a la región 3UTR de PAK1 y reduce sus niveles de proteína, inhibiendo sus funciones como motilidad, invasividad, crecimiento independiente del anclaje, y potencial tumorigénico de células de cáncer de mama altamente invasivas. En tejido de pacientes con cáncer de hígado, se encontró una correlación negativa entre la expresión de miR-145 y en nivel de proteína de PAK1. Por lo que en líneas celulares de cáncer de hígado se demostró que miR-145 regula negativamente a PAK1 y disminuye la capacidad de invasión de dichas líneas celulares (Kou, *et al.*, 2014).

En el caso de Ubc9, en glioma se reporta una sobreexpresión de la proteína, lo cual correlaciona negativamente con la expresión del microRNA-214, el cual regula a Ubc9 (Zhao, *et al.*, 2012).

De manera interesante, en cáncer de mama, también se demostró que Ubc9 está sujeto a la regulación postranscripcional por microRNAs de la familia miR-30, tales como miR-30c y miR-30e, los cuales se encuentran subexpresados en tumores.

De tal manera, que si consideramos que miR-30c se encuentra subexpresado significativamente en tejidos de pacientes con CaCu que no respondieron al tratamiento convencional (Pedroza-Torres, 2015), y que los algoritmos para blancos de miRNAs (TargetScan, miRanda) sugieren a PAK1 y Ubc9 como buenos candidatos para la regulación por miRNAs, es posible que exista una regulación directa de miR-30c sobre PAK1 y Ubc9 en células RR de CaCu.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

El CaCu sigue representando un grave problema de salud pública, principalmente por la falta de un diagnóstico temprano y el alto porcentaje de recurrencia en los pacientes con enfermedad localmente avanzada principalmente a causa de la resistencia de las células tumorales a la terapia. De tal manera que es muy importante, conocer los mecanismos que le permiten a las células adquirir este complejo mecanismo de radioresistencia. Los miRNAs constituyen una de las principales vías de regulación de la expresión génica, y en la última década se ha incrementado el número de reportes en diferentes tipos de cáncer en los cuales muestran miRNAs desregulados tanto en líneas celulares radioresistentes, como en tejidos de pacientes con cáncer que no respondieron a la radioterapia. Es por esto que surge la necesidad de identificar los posibles blancos de miR-30c en un modelo de radioresistencia en CaCu.



#### **IV. HIPÓTESIS**

Si el miR-30c se encuentra subexpresado en células radioresistentes derivadas de CaCu, puede estar favoreciendo la sobreexpresión de sus blancos como PAK1 y Ubc9, lo cual conllevaría a la sobreactivación de vías de señalización necesarias para evadir el daño provocado por la radiación ionizante

## **V. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de la regulación de PAK1 y UBC9 por miR-30c en líneas celulares derivadas de CaCu radioresistentes.

### **Objetivos particulares**

Medir el nivel de expresión de miR30c en las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki radioresistentes.

Determinar la expresión de PAK1 y UBC9.

Evaluar la capacidad de proliferación en las líneas celulares radiosensibles y radioresistentes.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Cultivo celular**

Las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki de CaCu fueron obtenidas del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). Se cultivaron en medio DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (gibco®, life technologies), suplementado con 10% de suero bovino fetal (Biowest), antibiótico-antimicótico al 1% en cajas T75, se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa.

Los cultivos radioresistentes fueron establecidos por nuestro grupo de investigación a través de la exposición a radiación ionizante fraccionada hasta alcanzar los 50 Gy; brevemente, cada tercer día (cuando las células tenían un 60% de confluencia), se retiró el medio y agregó 50 mL de PBS. Las células se irradiaron con una dosis de 2Gy e inmediatamente después se les removió el PBS y se agregó medio de cultivo. Las células se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones. El proceso se repitió hasta alcanzar los 50 Gy de radiación acumulada. La radioresistencia se verificó mediante ensayos clonogénicos exponiendo las células a diferentes dosis de radiación para establecer la DL50 tanto de los cultivos con y sin radiación. A estos cultivos se les denominó radioresistentes (RR) y a las líneas sin exposición a radiación, radiosensibles (RS). Posteriormente, se mantuvieron en las condiciones basales de cultivo, y finalmente fueron irradiadas con 2 Gy 12 horas antes de la extracción de RNA total y proteínas.

## **Ensayo clonogénico**

Este ensayo se realizó para caracterizar las células RR. Tanto las células RS como RR, fueron expuestas a la DL50 de radiación y después de 24 hrs se tripsinizaron, se contaron con la técnica de azul de tripano y se sembraron en placas de 6 pozos, con una densidad de 1000 células por pozo.

Después de 12-14 días, el tiempo necesario para la formación de colonias, se les retiró el medio, las colonias fueron fijadas con Metanol/Ácido acético 7:1 y fueron teñidas con cristal violeta al 1%. Las colonias con 50 o más células se consideraron como sobrevivientes clonogénicos.

## **Extracción de RNA**

Se extrajo el RNA total de cultivos celulares con 80% de confluencia mediante el método de Trizol (Invitrogen). Brevemente, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS, se adiciono 1mL de Trizol. Las células lisadas se transfirieron a tubos de 1.5 mL y se adicionaron 0.2 mL de cloroformo. Se realizó una centrifugación para obtener las fases de separación, recuperar el RNA y dejarlo precipitar toda la noche con isopropanol a -70 °C.

Después se retiró el isopropanol por centrifugación y finalmente se hicieron dos lavados con etanol al 75% y el RNA se resuspendió en 30µL de agua libre de RNAsas.

Se determinó su concentración por espectrofotometría y se verifico su integridad por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

## **qPCR**

Las reacciones de PCR-tiempo real (qPCR) se realizaron por duplicado en el equipo LightCycler 480 de Roche siguiendo los protocolos del fabricante. Se utilizaron sondas Taqman para la detección de miR-30c (cat. #A25576, Id, 47008\_miR) y RNU44 como control (cat. #4427975, Id. 001094).

## **Extracción de proteínas**

La extracción de proteínas también se hizo a partir de cultivos celulares con 80% de confluencia. Se agregaron 80uL de RIPA con un coctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche), con ayuda de un gendarme se despegaron las células y se transfirieron a tubos de 1.5mL. Por métodos mecánicos se lisaron totalmente las células y se centrifugaron a 12000 rpm/20min/4°C. Se recuperó el sobrenadante que corresponde a las proteínas y se cuantifico por el método de Bradford (Bio-Rad)

## **Western Blot**

Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida al 12% y transferidas a una membrana de PVDF con ayuda de un Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) a 25V/1A durante 30min. La membrana se bloqueó durante dos horas con leche al 5% (Leche Svelty) en TBS-Tween (Tris Base, NaCl y Tween 20 1%) Los anticuerpos primarios utilizados fueron PAK1 (#2602S) UBC9 (4918S) de Cell Signaling y actina (sc-47778) como control de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo primario se incubó durante 16 hrs a 4C en agitación constante. En seguida se hicieron dos lavados de 5 min con TBS-Tween, seguidos de dos horas de

incubación a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a peroxidasa de rábano, bovine anti-rabbit IgG-HRP (sc-2370). Para la visualización de los complejos proteína-anticuerpo, se utilizó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal Westfemto (Pierce) y el digitalizador C-Digit (Li-Cor).

### **Ensayo de proliferación celular**

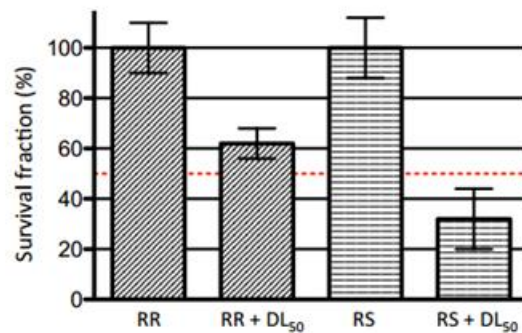
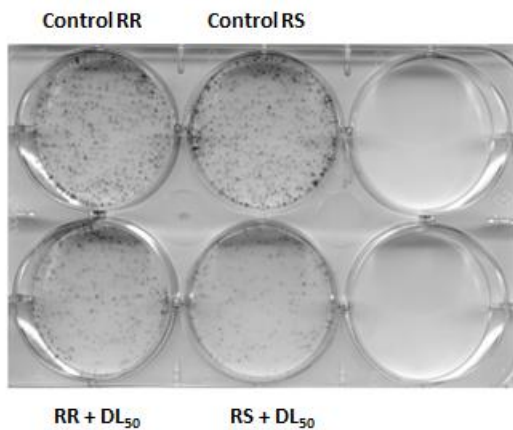
La proliferación celular se midió usando el experimento de sulforodamina B. Brevemente, las células se sembraron en placas de 96 pozos con una densidad de 5000 células por pozo. Se incubaron por 48 hrs, posteriormente se les agregó ácido tricloracético al 10 % para fijar las células durante 1 hr a 4 C. En seguida se tiñeron las células durante 30 min con sulforodamina B al 0.057 % (p/v) disuelta en ácido acético al 1%. La cantidad de proteínas teñidas por la sulforodamina se midió en un lector de microplacas (EPOCH, Biotek) a 520nm.

## VII. RESULTADOS

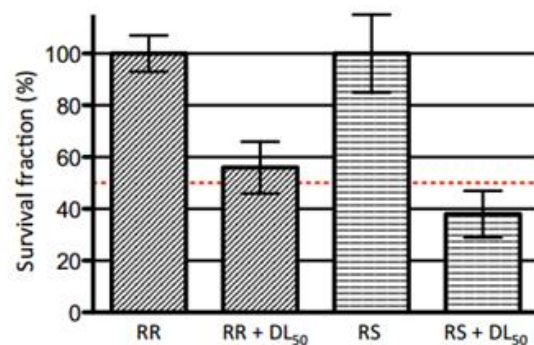
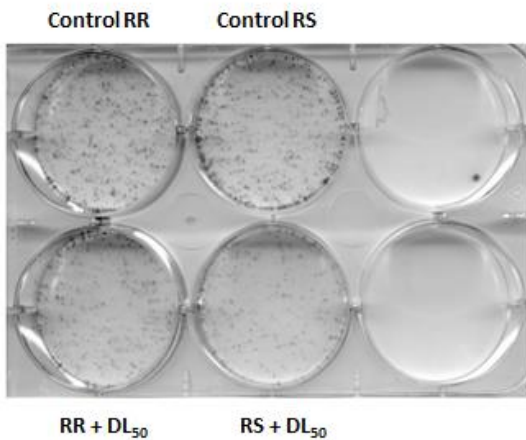
### Comprobación de la radioresistencia en las líneas celulares

Una vez que los cultivos celulares acumularon 50 Gy de radiación, fue necesario comprobar si efectivamente presentaban el fenómeno de radioresistencia. En la figura 8 se puede observar el resultado de los ensayos clonogénicos realizados en las tres líneas celulares así como sus graficas correspondientes. En los tres casos las líneas RR presentan una mayor capacidad clonogénica después de la radiación comparada con su control RS después de recibir una dosis DL50 de radiación, de esta forma comprobamos la radioresistencia de nuestros cultivos.

#### HeLa



#### CaSki



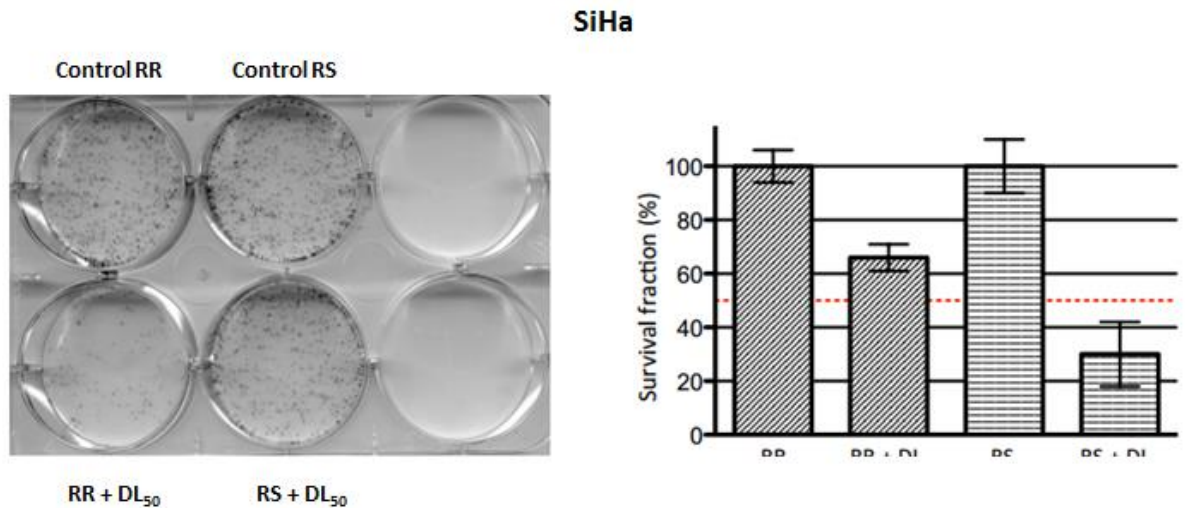


Figura 8. Determinación de la radioresistencia en las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki.

### miR-30c se encuentra subexpresado en líneas celulares RR de CaCu

Para poder determinar los niveles de expresión de miR-30c entre las líneas celulares RR y RS, se utilizó la técnica de qPCR. Como se observa en la figura 9 en las líneas celulares HeLa y SiHa, miR-30c se encuentra subexpresado significativamente en las células RR en comparación con las células RS. Pero no se observa el mismo fenómeno para la línea celular CaSki.

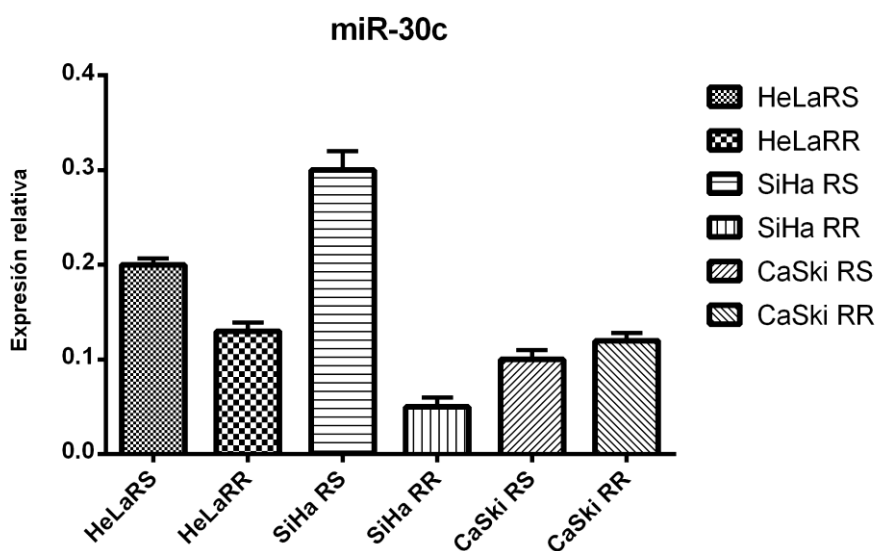
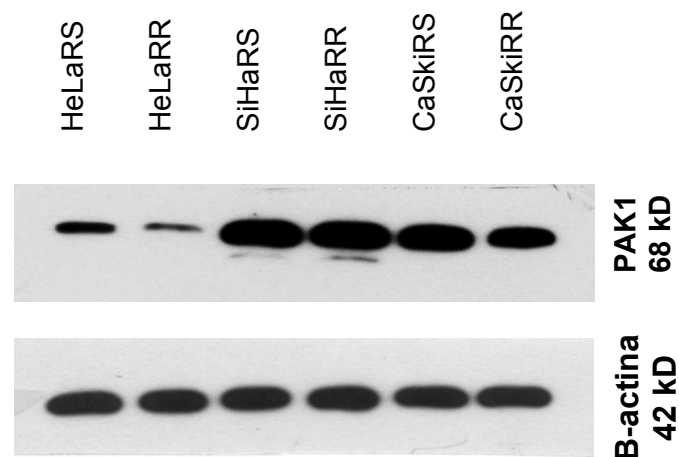


Figura 9. Expresión relativa de miR-30c en líneas celulares RS y RR derivadas de CaCu.



## Niveles de expresión de PAK1

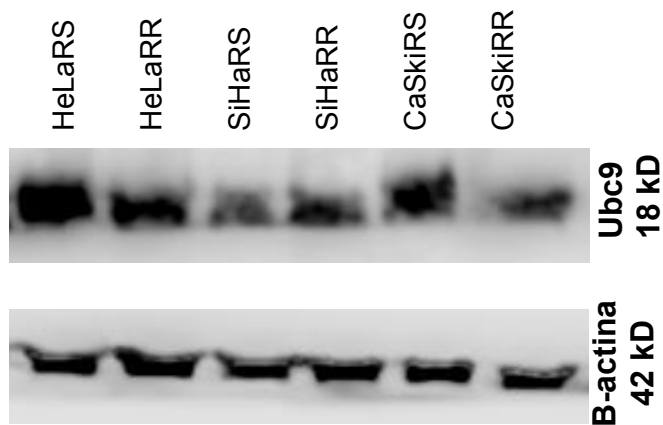
Se realizó ensayo de WB para detectar los niveles de proteína de PAK1. Como se observa en la figura 10 PAK1 se expresa en las líneas celulares derivadas de CaCu, en mayor medida en SiHa Y CaSki. También podemos observar que tanto en HeLa y CaSki radioresistentes (HeLa RR y CaSki RR) hay una ligera disminución en la detección de PAK1 al compararlo con su control radiosensible (RS) Esto es un hallazgo contrario a lo que se esperaba para poder establecer una posible regulación por miR.30c.



**Figura 10. PAK1 se expresa en mayor medida en las líneas celulares CaSki y SiHa de CaCu.** WB representativo del nivel de proteína de PAK1, el experimento se realizó por triplicado.

## UBC9 se sobreexpresa en líneas celulares radioresistentes

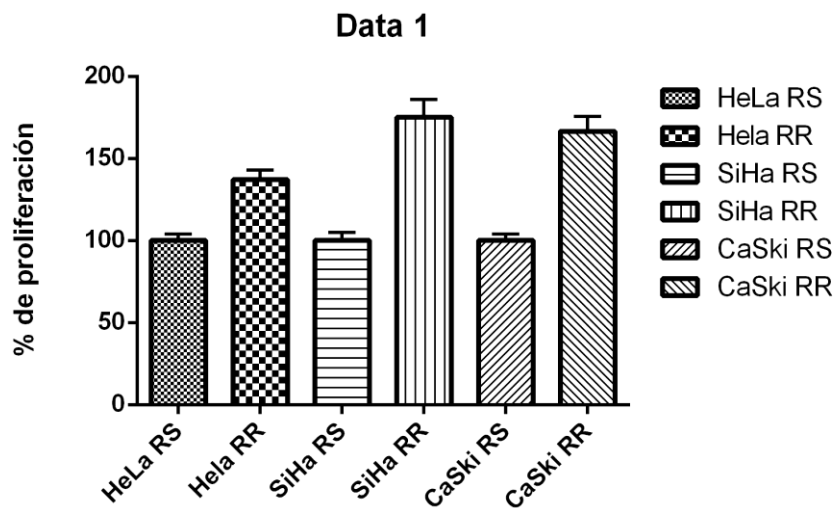
En la figura 11 se muestran los resultados de WB para dicha proteína. De las tres líneas celulares RR, solo en SiHa RR se ve un aumento en la detección de la proteína con respecto a las células RS, por tanto, solo en este caso se puede sugerir que miR-30c está regulando negativamente a Ubc9. Tanto en HeLa como en CaSki, se observa lo contrario, Ubc9 se ve disminuida a nivel de proteína.



**Figura 11. Ubc9 se encuentra sobreexpresada en la línea celular SiHa RR.** WB representativo del nivel de proteína de Ubc9, el experimento se realizó por triplicado.

### Las líneas celulares RR tienen una mayor tasa de proliferación

Mediante un ensayo de SRB se demostró que las líneas celulares RR tienen mayor capacidad de proliferación en comparación con las RS. El ensayo se realizó a diferentes tiempos, y en la figura 12 observamos que desde las 24 horas las células RR tienen una mayor capacidad de proliferación.



**Figura 12. Ensayo de proliferación en las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki.**

## VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo evaluamos la posible regulación de PAK1 Y Ubc9 por miR-30c en un modelo de líneas celulares RR derivadas de CaCu. Encontrando que miR-30c se encuentra subexpresado en las líneas celulares HeLa RR y CaSki RR comparándolas con su respectivo control RS.

Nuestro grupo de investigación, previamente reporto una lista con miRNAs que se encuentran expresados diferencialmente entre dos grupos de pacientes con CaCu (un grupo con respuesta completa al tratamiento convencional y el otro que no responde), y entre los miRNAs subexpresados en pacientes con RC se encuentra miR-30c (resultado que fue validado por qPCR). Los resultados de este trabajo evidencian que miR-30c se encuentra subexpresado en las líneas celulares RR; Sin embargo, la expresión de miR-30c no correlaciona negativamente con PAK1, para poder establecer una posible regulación.

De manera similar, existen reportes previos en los cuales no se encuentra la correlación esperada entre un miRNA y su gen blanco sugerido por las diversas herramientas bioinformáticas. Tal es el caso del trabajo de Erwun y colaboradores, en el cual midieron la expresión a nivel de mRNA de PAK1 y el nivel de expresión de miR-221-3p en diferentes líneas celulares de cáncer de mama pero no encontraron una correlación negativa entre el miRNA y el blanco propuesto (Ergun, *et al.*, 2015).

Ubc9 la única enzima de conjugación en el proceso de SUMOilación, regula la función de múltiples proteínas y juega un rol importante en el proceso de

tumorigénesis. Existen algunos estudios previos en los que se asocia una expresión aberrante de Ubc9 con la quimioresistencia. En células MCF7 con Ubc9 mutada también presentaban una desregulación de Bcl-2, lo cual fue asociado con una supervivencia limitada, lo que sugiere que Ubc9 puede mediar la quimioresistencia por regular una proteína antiapoptótica. En otro estudio, encontraron que el nivel de expresión de Ubc9 se encuentra sobrerregulados en cancer de mama con fenotipo tipo basal, el cual esta caracterizado clínicamente como más agresivo y con una menor respuesta al tratamiento estándar y por lo tanto se asocia con pobre diagnóstico. Los niveles de UBC9 que se encontraron en este trabajo, sugieren que el efecto de la radiación sobre las líneas celulares de CaCu es diferencial, siendo en SiHa RR donde se ve un aumento de la proteína. En consecuencia, en los tejidos RR cabe la posibilidad que los factores de transcripción- que son blancos de SUMOilación- presenten una mayor actividad, como sucede en leucemia mieloide aguda donde recientemente se demostró que la sobreexpresión de Ubc9 potencia la SUMOilación de IGF-1 (del inglés, *insulin-like growth factor 1 receptor*), promoviendo un mayor capacidad de proliferación celular (Zhang, *et al.*, 2015). Para demostrar esta idea en CaCu se requieren experimentos de detección de proteínas SUMOiladas en diferentes modelos de radioresistencia.

Los miRNAs pueden funcionar como supresores de tumores o como oncogenes. Entonces, se cree que una expresión aberrante de miRNAs juega un rol importante en la tumorigénesis. Se han hecho algunos estudios para establecer si Ubc9 es blanco de este tipo de regulación. En el 2009 Wu y colaboradores, fueron

los primeros en demostrar en un modelo de cáncer de mama, que la familia de miR-30 regulan negativamente a expresión de Ubc9.

Sin embargo, en este trabajo solo en la línea celular SiHa se encontró la correlación negativa UBC9 con miR-30c. El contraste de este resultado con los reportes de cáncer de mama muestra cuán diversa puede ser la regulación ejercida por los miRNAs: a pesar de tratarse de las mismas secuencias, no interactúan de la misma manera. Tomando en cuenta los scores que las bases de datos asignan a las interacciones miRNA-mRNA, es probable que exista una regulación por parte de miR-200b/c, que como se demostró se encuentra subexpresado en tumores de CaCu que no respondieron al tratamiento convencional (Pedroza-Torres, 2015); o incluso otros miRNAs cuyo nivel de expresión aún no se ha identificado en CaCu, como miR-429, miR-410, miR-504, miR-214, pero que las bases de datos los señalan como posibles reguladores de Ubc9.

La evidencia que sustentó el planteamiento de los objetivos de este trabajo, sugería que mir30c ejerce regulación sobre PAK1 y UBC9 en CaCu RR. Sin embargo, los resultados experimentales muestran lo contrario: miR-30c ejerce regulación sobre Ubc9 únicamente en SiHa. En el caso de PAK1, no se encontró evidencia de esta regulación mediante nuestro sistema experimental.

Los niveles de PAK1 son similares tanto en células RS y RR, sin embargo observamos una mayor proliferación en las células RR, por lo que hacen falta experimentos para demostrar si este efecto se debe a la actividad de PAK1.

## **IX. CONCLUSIONES**

No se encontró una relación entre miR-30c y PAK1.

La correlación negativa entre la expresión de miR-30c y UBC9 en SiHa sugiere la regulación postranscripcional ejercida sobre Ubc9.

Las células RR presentan mayor tasa de proliferación, pero se desconocen los mecanismos que lo hacen posible

## **X. BIBLIOGRAFÍA**

- Arias-Romero, L.E., Chernoff, J., 2008. A tale of two Paks. *Biol. Cell* 100, 97–108.
- Arias-Romero LE, Chernoff J. (2010) p21-activated kinases in Erbb2-positive breast cancer: A new therapeutic target? *Small GTPases* 1:124–128.
- Arias-Romero LE, Villamar-Cruz O, Pacheco A, Kosoff R, Huang M, Muthuswamy SK. (2010). A RacPak signaling pathway is essential for ErbB2-mediated transformation of human breast epithelial cancer cells. *Oncogene* 29:5839-49.
- Au Yeng, C.L.; Tsang, T.Y.; Yau, P.L.; Kwok, T.T. (2011). Human papillomavirus type 16 E6 induces cervical cancer cell migration through the p53/microRNA-23b/urokinase-type plasminogen activator pathway. *Oncogene* 30:2401–2410.
- Balasenthil S, Sahin AA, Barnes CJ, Wang RA, Pestell RG, Vadlamudi RK. (2004). P21-activated kinase-1 signaling mediates cyclin D1 expression in mammary epithelial and cancer cells. *J Biol Chem* 279: 1422-8.
- Banno, K. (2014). MicroRNA in Cervical Cancer: OncomiRs and Tumor Suppressor miRs in Diagnosis and Treatment. *The Scientific World Journal* Volume 2014: 1-8
- Bartel, D. (2009). MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136(2): 215-233.
- Beskow. (2009). Radioresistant cervical cancer shows upregulation of the NHEJ proteins DNA-PKcs, Ku70 and Ku86.
- Bettermann, K., Benesch, M., Weis, S. y Haybaeck, J. (2012). SUMOylation in carcinogenesis. *Cancer Letters* 316:113-125.
- Bekri S, Adélaïde J, Merscher S, Grosgeorge J, CaroliBosc F, Perucca-Lostanlen D. (1997). Detailed map of a region commonly amplified at 11q13–q14 in human breast carcinoma. *Cytogenet Cell Genet* 79:125-131.

Boyer SN, Wazer DE, Band V. (1996). E7 protein of human papillomavirus 16 induces degradation of the retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56: 4620-4624.

Bosch, F.; Muñoz, N.; Shah, K. y Meheus A. (1992). International Workshop on the epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. *Int J Cancer*: 171-173.

Brown JM. (1999). The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy – eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res* 59: 5863–5870.

Burk R. D. Kelly P. Feldman J. (1996). Declining presence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex. Transm. Dis* 23: 333-341.

Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration. (2008). Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: A systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J. Clin. Oncol.* 26: 5802–5812.

Ching YP, Leong VY, Lee MF, Xu HT, Jin DY, Ng IO. (2007). P21-activated protein kinase is overexpressed in hepatocellular carcinoma and enhances cancer metastasis involving c-Jun NH2-terminal kinase activation and paxillin phosphorylation. *Cancer Res* 67: 3601-8.

Citron M., Berry D., Cirincione C. (2003) Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: First report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol* 21: 1431-1439.

Dart, A.E., Wells, C.M., 2013. P21-activated kinase 4—not just one of the PAK. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 129–138.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17–27.



Denli, A., Tops, B., y Plasterk, R. (2004). Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature* 432: 231-235.

Deyrieux, G. Rosas-Acosta, M.A. Ozbun, V.G. (2007). Wilson, Sumoylation dynamics during keratinocyte differentiation, *J. Cell Sci.* 120 125–136.

Diederichs, S. & Haber, D. A. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131, 1097–1108.

DiLeva, G. (2014). microRNAs in cáncer. *Annu Rev Pathol.* 9: 287-314.

DiSaia PJ. (2002). *Oncología Ginecológica Clínica*. 6ª ed. Madrid, España; Mosby.

Du J, Sun C, Hu Z, Yang Y, Zhu Y, Zheng D. (2010). Lysophosphatidic acid induces MDA-MB-231 breast cancer cells migration through activation of PI3K/PAK1/ERK signaling. *PLoS One* 5:15940.

Dunnebie, J.L. Bermejo, S. Haas, H.P. Fischer, C.B. Pierl, C. Justenhoven, H. Brauch, C. Baisch, M. Gilbert, V. Harth, A. Spickenheuer, S. Rabstein, B. Pesch, T. Bruning, Y.D. Ko, U. Hamann. (2009). Common variants in the UBC9 gene encoding the SUMO-conjugating enzyme are associated with breast tumor grade, *Int. J. Cancer* 125. 596–602.

Erwun, S., Tayeb, T., Arslan, A., Temiz, E. (2015). The investigation of miR-221-3p and PAK1 gene expressions in breast cancer cell lines. *Gene.* 555(2): 377-381.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray. (2013). *F.GLOBOCAN v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11* [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.

Friedland JC, Lakins JN, Kazanietz MG, Chernoff J, Boettiger D, Weaver VM. (2007). Integrin activates Rac-dependent p21-activated kinase 1 to drive NF-

kappaB-dependent resistance to apoptosis in 3D mammary acini. *J Cell Sci* 120:3700-12.

Gill, G. (2005). SUMO changes Sox for developmental diversity, *Mol. Cell.* 20: 495–496.

Harada. (2007). Significance of HIF-1 active cells in angiogenesis and radioresistance. *Oncogene* 26, 7508-7516.

Hammond, S. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*.

Hashimoto, H., Sudo, T., Maruta, H. y Nishimura, R. (2010). The direct PAK1 inhibitor, TAT-PAK18, blocks preferentially the growth of human ovarian cancer cell lines in which PAK1 is abnormally activated by autophosphorylation at Thr 423. *Drug Discoveries and Therapeutics* 4(1): 1-4.

Hay, RT. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18:1–12

Holm C, Rayala S, Jirström K, Stål O, Kumar R, Landberg G. (2006). Association between Pak1 expression and subcellular localization and tamoxifen resistance in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 98:671-80.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1): 57-70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646-674.

Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A. (2001). Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 98: 1218–23.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338:423-428.

Holm C, Rayala S, Jirström K, Stål O, Kumar R, Landberg G. (2006). Association between Pak1 expression and subcellular localization and tamoxifen resistance in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 98:671-80.

Hu, X.; Schwarz, J.K.; Lewis, J.S., Jr.; Huettner, P.C.; Rader, J.S.; Deasy, J.O.; Grigsby, P.W.; Wang, X. (2010). A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. *Cancer Res* 70: 1441–1448.

Huynh N, Liu KH, Baldwin GS, He H. (2010). P21-activated kinase 1 stimulates colon cancer cell growth and migration/invasion via ERK- and AKT-dependent pathways. *Biochim Biophys Acta* 1803:1106- 13

Ihara, H. Koyama, Y. Uchimura, H. Saitoh, A. Kikuchi. (2007). Noncovalent binding of small ubiquitin-related modifier (SUMO) protease to SUMO is necessary for enzymatic activities and cell growth, *J. Biol. Chem.* 282: 16465–16475

Jaiswal. (2015). Oncogenic Human Papillomavirus 16E7 modulates SUMOylation of FoxM1b. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 58: 28-36.

Johnson, H. Grosshans, J. Shingara. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120(5): 635–647.

Kang, J.; Kim, E.; Kim, W.; Seong, K.M.; Youn, H.; Kim, J.W.; Kim, J.; Youn, B. . (2013). Rhamnetin and cirsiolol induce radiosensitization and inhibition of epithelial-mesenchymal transition (EMT) by miR-34a-mediated suppression of Notch-1 expression in non-small cell lung cancer cell lines. *J. Biol. Chem* 288: 27343–27357.

King, H., Nicholas, S. N. y Wells, M. C. 2004. Role of p21-Aktivated Kinases in Cancer Progression. *International Reviews of Cell and Molecular Biology* 309: 347-387.

Kim, N. V., Han, J., Siomi M. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature* 10: 126-139.

Kim, E. (2014). PAK1 Tyrosine Phosphorylation Is Required to Induce Epithelial–mesenchymal Transition and Radioresistance in Lung Cancer Cells. *Cancer Research* 79(14): 5520-5531.

Kumar R, Gururaj AE, Barnes CJ. p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:459- 71.

Kou, B., Gao, Y., Du, C., Shi, Q., Wang, C., Wang, X., He, D. y Guo P. (2014). miR-145 inhibits invasion of bladder cancer cells by targeting PAK1. *Urol Oncol* 32(6): 846-854.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.

Li, H., Niu, H., Peng, Y. Wang, J. y He, P. (2013) Ubc9 promueve invasión and metástasis of lung cáncer cells. *Oncology Reports* 29: 1588-1594.

Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z. S. & Lim, L. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 367, 40–46

(1994)Mantovani F y Banks L. (2001). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20:7874-7878

Marchetti, P., Cannita, K., y Ricevuto, E. (2003) Prognostic value of p53 molecular status in high-risk primary breast cáncer. *Ann Oncol.* 14(5): 704-705.

McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. (2001) Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Patho* 82:15-33.

Melar-New, M.; Laimins, L.A. (2010). Human papillomaviruses modulate expression of microRNA 203 upon epithelial differentiation to control levels of p63 proteins. *J. Virol.* 84: 5212–5221.

Miglierini, P., Malhaire, G., Goasduff, G., Miranda, O. y Pradier, O. (2015). Cervix cancer brachytherapy: High dose rate. *Cancer/Radiothérapie* 18: 452–457.

Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. (2004). Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 5: 429–441.

Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, Meijer CJ, Munoz N, Franceschi S. (2003). HPV Study Group. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol* 158:486-494.

Morris, C. Boutell, M. Keppler, R. Densham, D. Weekes, A. Alamshah, L. Butler, Y. Galanty, L. Pagon, T. Kiuchi, T. Ng, E. Solomon. (2001). The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress, *Nature* 462 (2009) 886–890  
Munger K, Basile JR, Duensing S. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20: 7888–7898.

Ong CC, Jubb AM, Haverty PM, Zhou W, Tran V, Truong T. (2011). Targeting p21-activated kinase 1 (PAK1) to induce apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:7177–82.

Parkin, D., Bray, F. y Pisani, P. (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *International Journal of Cancer* 94(2): 153-156.

Pedroza-Torres, A. (2015). Tesis de doctorado.

Pereira, J. P. Marques, A. R. Soares, L. Carreto, and M. A. S. Santos. (2010). MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One* 5 (7).

Provenzano, E., Hopper, J. y Giles, G. (2003). Biological markers that predict clinical recurrence in ductal carcinoma in situ of the breast. *Eur, J Cancer* 399(5): 622-630.

Quinn, M.A.; Benedet, J.L.; Odicino, F.; Maisonneuve, P.; Beller, U.; Creasman, W.T.; Heintz, A.P.M.; Ngan, H.Y.S.; Pecorelli, S. (2006) Carcinoma of the cervix uteri. FIGO 26th annual report on the results of treatment in gynecological cancer. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 95.

Radu, M., Semenova, G., Rachelle K y Chernoff, J. 2014. Pak Signaling in the Development and Progression of Cancer. *Nat Rev Cancer*. 14(1): 13-25.

Raut, S., Kumar, A., Singh, G., 2015. miR-30c Mediates Upregulation of Cdc42 and Pak1 in Diabetic Cardiomyopathy. *Cardiovasc Ther* 33(3): 89-97.

Rayala SK, Talukder AH, Balasenthil S, Tharakan R, Barnes CJ, Wang RA. (2006). P21-activated kinase 1 regulation of estrogen receptor-alpha activation involves serine 305 activation linked with serine 118 phosphorylation. *Cancer Res* 66:1694-701.

Reddy SD, Ohshiro K, Rayala SK, Kumar R. (2008). MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res* 68:8195-200.

Reimers LL, Anderson WF, Rosenberg PS, Henson DE, Castle PE. (2009). Etiologic Heterogeneity for Cervical Carcinoma by Histopathologic Type, using comparative age period-cohort models. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 18(3): 792-799.

Suntharalingam, N. (2005). Chapter 14. Basic radiobiology. In *Radiation Oncology Physics*. Podgorsak EB. International Atomic Energy Agency 485-504.

Symonds, R. y Foweraker, K. (2006). Principles of chemotherapy and radiotherapy. *Current Obstetrics & Gynaecology*. 16(2): 100- 106.

Surace EI, Haipek CA, Gutmann DH. (2004). Effect of merlin phosphorylation on neurofibromatosis 2 (NF2) gene function. *Oncogene* 23:580-7.

Tang Y, Marwaha S, Rutkowski JL, Tennekoon GI, Phillips PC, Field J. (1998). A role for Pak protein kinases in Schwann cell transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5139-44.

Tazawa, H.; Tsuchiya, N.; Izumiya, M.; Nakagama, H. (2007). Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F

pathway in human colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 15472–15477.

Scottish Intercollegiate Guidelines Network. (2008). Management of cervical cancer. A national clinical guideline. Escocia.

Vadlamudi RK, Bagheri-Yarmand R, Yang Z, Balasenthil S, Nguyen D, Sahin AA. (2004). Dynein light chain 1, a p21-activated kinase 1-interacting substrate, promotes cancerous phenotypes. *Cancer Cell* 5:575-85.

Vadlamudi RK, Li F, Barnes CJ, Bagheri-Yarmand R, Kumar R. (2004) p41-Arc subunit of human Arp2/3 complex is a p21-activated kinase-1-interacting substrate. *EMBO Rep* 5:154-60

Volinia, G. A. Calin, C.-G. Liu. (2006). microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(7): 2257–2261.

von Knebel Doeberitz M. (2002). New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer*. 38: 2229-2242.

Walboomers, J.; Jacobs, M.; Manos M.; FX, B.; Kummer J.; Shah, K.; Snijders P.; Peto J.; Meijer C.; y Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 12-19.

Wang RA, Zhang H, Balasenthil S, Medina D, Kumar R. (2006). PAK1 hyperactivation is sufficient for mammary gland tumor formation. *Oncogene*. 25:2931-6

Wang, P.; Zhang, J.; Zhang, L.; Zhu, Z.; Fan, J.; Chen, L.; Zhuang, L.; Luo, J.; Chen, H.; Liu, L. (2013). MicroRNA 23b regulates autophagy associated with radioresistance of pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 145: 1133–1143.

Wang RA, Mazumdar A, Vadlamudi RK, Kumar R. (2002). P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor-alpha and promotes hiperplasia in mammary epithelium. *EMBO J* 21:5437-47.

Welch, C.; Chen, Y.; Stallings, R.L. (2007). MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 26: 5017–5022.

Wu, F. (2009). MicroRNA-mediated regulation of Ubc9 expression in cancer cells. *Clin Cancer Res* 15(5): 1550-1557.

Xu L, Sun FQ, Wang ZH. (2011). Radical trachelectomy versus radical hysterectomy for the treatment of early cervical cancer: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011 Jul 1. *Scand*. 90 (11): 1200-1209

Yang HJ, Kim N, Seong KM, Youn H, Youn B. (2013). Investigation of radiation-induced transcriptome profile of radioresistant non-small cell lung cancer A549 cells using RNA-seq. *PLoS ONE* 8.

Zhang, J. Huang, N. Yang. (2006). MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(24): 9136–9141.

Zhang, J. (2015). SUMOylation of insulin-like growth factor 1 receptor, promotes proliferation un acute myeloid leukemia. *Cancer Letters* 357: 297-306.

Zhang, X., Mao, H., Chen, J., Wen, S., Ye, M., Lv, Z. (2013). Increased expression of microRNA-221 inhibits PAK1 in endothelial progenitor cells and impairs its function via c-Raf/MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 431(3): 404-408.

Zhao, Y. (2012). Metadherin regulates radioresistance in cervical cancer cells. *Oncology Reports* 27:1520-1526.



Zhao, Z., Tan, X., Zhao, A., Zhu, L., Yin, B., Yuang, J., Qiang, B. y Peng, X. (2012). microRNA-214-mediated UBC9 expression in glioma. *BMB Reports* 45(11): 641-646.

Zhu G, Wang Y, Huang B, Liang J, Ding Y, Xu A. (2012). A Rac1/PAK1 cascade controls beta-catenin activation in colon cancer cells. *Oncogene* 31: 1001-12

Zi, D. y Field, J. 2012. PAK signaling in cáncer. *Cellular Logistics* 2(2): 105-116.

zur Hausen H. (1974). Virus-induced hematologic diseases. *Med Welt*. 25(40) 1581-584.

zur Hausen H. (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol*; 78:1–30.