



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE STUDIOS DE POSGRADO
SECRETARIA DE SALUD

HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

***“INMUNOLocalización de la Proteína B-Catenina en un Modelo Murino de
Cáncer Cervical”***

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
ANATOMÍA PATOLÓGICA

PRESENTA:

DRA. MARIA YOLOTZIN VALDESPINO VAZQUEZ

TUTOR DE TESIS

DR. JOSÉ BONILLA DELGADO

ASESOR DE TESIS

DRA. MARIA EVELIN CORTÉS GUTIÉRREZ

México, D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AUTORIZACION DE TESIS

Dr. Carlos Viveros Contreras
Jefe de la División de Enseñanza
Hospital Juárez de México

Dr . Rafael Peñavera Hernández
Profesor Titular del Curso de Anatomía Patológica
Hospital Juárez de México

Número de registro de tesis: HJM 2375/14-R

DIRECTOR DE TESIS
Dr. José Bonilla Delgado

ASESOR DE TESIS
DRA. María Evelin Cortés Gutiérrez

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanas, José Manuel, amigos y maestros.

Contenido Temático/Índice

Resumen/Abstract.....	8
Introducción.....	10
Objetivos.....	15
Materiales y Métodos.....	15
Resultados.....	17
Discusión.....	18
Conclusiones.....	20
Perspectivas.....	20
Referencias.....	21
Figuras.....	25

Lista de Abreviaturas

(Universales)

APC: Proteína de Pólipos Adenomatosos del Cólon.

B-Cat: β -catenina.

Birc5: Survivina.

CC: Cáncer Cervical.

CCND1: Ciclina D1.

CK1: Caseína Cinasa 1.

CIN: Neoplasia Intra-epitelial del Cérvix.

CK1-2: Caseína Cinasa I o II.

DNA: Ácido Desoxi-ribonucleico.

Dvl: Dishevelled.

E: Genes de Expresión Temprana “Early”.

EGFR: Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico.

E6-AP: Proteína Asociada a E6.

GSK3 β : Glucogeno-cinasa-sintasa-3 β .

HPV: Virus del Papiloma Humano.

HR-HPV: Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo.

IP: Yoduro de propidium.

K6: Citoqueratina 6.

K14: Citoqueratina 14.

L: Genes de Expresión Tardía “L”.

LCR: Región Larga de Control.

MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad.

mRNA: RNA mensajero.

pRb: Proteína de Retinoblastoma.

RNA: Ácido Ribonucleico.

RT-PCR: Retro-transcripción y Reacción en Cadena de la polimerasa.

RT-qPCR: RT-PCR cuantitativo.

Scrib: Scribble.

TCF4: Factor de células “T”/Factor de Transcripción 4.

WHO: Organización Mundial de Salud.

ZA: “Zonula Adherens” o “Uniones Adherentes”.

Resumen

Introducción. La contribución de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en la carcinogénesis asociada al virus del papiloma humano (HPV) es poco conocida. Sin embargo, la proteína β -catenina puede encontrarse a menudo localizada en el núcleo celular de biopsias cervicales provenientes de infecciones por HPV. Por otro lado, los modelos transgénicos tales como: K14-E6 y K14-E6 Δ PDZ muestran una clara asociación con la oncoproteína E6, y en particular, con su dominio de unión a proteínas PDZ para incrementar la vía Wnt/ β -catenina.

Objetivo. Demostrar mediante un modelos *in vivo* la asociación entre la oncoproteína E6 del virus del papiloma humano tipo 16 y el aumento de la vía de señalización Wnt/ β -catenina.

Material y Métodos. Se evaluó la tinción de β -catenina mediante inmunohistoquímica en la piel dorsal de ratones transgénicos K14-E6, K14-E6 Δ PDZ y ratones silvestres (FVB) a lo largo de 1 año de vida.

Resultados. La presencia nuclear de β -catenina depende del dominio PDZ de E6 en modelos *in vivo*.

Conclusiones. La vía Wnt/ β -catenina puede ser incrementada por la oncoproteína E6 en modelos *in vivo* e *in vitro*.

Abstract

Introduction. The contribution of Wnt/ β -catenin signaling pathway in HPV-related carcinogenesis is poorly understood. However, the nuclear presence of β -catenin in human cervical biopsies shows a clear association with HPV infections. Additionally, *in vivo* models such as K14-E6 and K14-E6 Δ PDZ show that the enhancement of the Wnt/ β -catenin pathway depends on the PDZ-binding domain of the E6 viral oncoprotein.

Objective. Using *in vivo* models we demonstrate the association between the E6 oncoprotein and the enhancement of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Materials and Methods. The staining pattern of β -catenin protein was evaluated in dorsal skin of K14-E6, K14-E6 Δ PDZ transgenic mice and FVB non-transgenic mice along 1 year of life by immunohistochemistry.

Results. The nuclear presence of β -catenin depends on the E6's PDZ-binding in *in vivo* models.

Conclusions. The Wnt/ β -catenin signaling pathway can be enhanced by the E6 oncoprotein in *in vivo* and *in vitro* models.

Introducción

Generalidades

El Virus del Papiloma Humano

El virus del papiloma humano (HPV) es un virus pequeño (tamaño ≈ 55 nm) no-envuelto capaz de infectar virtualmente todos los epitelios estratificados. Su genoma se compone de una molécula circularizada de DNA de doble cadena que codifica genes de expresión temprana “E” (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), genes de expresión tardía “L” (L1 y L2), y una región larga de control (LCR) (1).

La naturaleza viral del HPV fue observada por primera vez en 1907 por Ciuffo a partir de un filtrado de verrugas humanas (Ver Figura 1) el cual fue capaz de infectar a individuos sanos. Posteriormente, en la década de los 20s, se pudo establecer la naturaleza infecciosa del HPV en verrugas genitales y papilomas laríngeos (2). La liberación de partículas virales a partir de papilomas fue demostrada en 1949 mediante microscopía electrónica (3), y en la década de los 70s, Harald zur Hausen demostró la heterogeneidad del HPV a partir de pruebas de hibridación RNA-DNA, este tipo de pruebas, también estableció que los HPVs cutáneos pueden hibridar con los HPV plantares; sin embargo, los HPV plantares no hibridan con infecciones del tracto genital (4, 5). El primer HPV fue aislado y identificado por Shope en 1983 (1).

Las primeras observaciones que sugerían un potencial oncogénico para el HPV comenzaron en 1972. Estas observaciones se basaban en reportes anecdóticos de la literatura médica que describían una rara conversión maligna de verrugas genitales (condiloma acuminata) hacia carcinomas celulares escamosos (6), esto condujo a la hipótesis de que el cáncer cervical podía evolucionar a partir de los HPVs causantes de verrugas genitales. En 1976, Meisels y Fortin postularon que las células coilocíticas obtenidas del moco cervical de pacientes con lesiones displásicas presentan un cambio citopatogénico provocado por el HPV, y podían ser utilizadas para diagnosticar aquellas

lesiones que evolucionarán hacia cáncer cervical (CC) (7). No fue sino hasta 1982 (y gracias a las técnicas de secuenciación de DNA), que se pudo demostrar la presencia del HPV en biopsias derivadas de CC (8).

Actualmente, se han caracterizado la secuencia completa de alrededor de 120 genotipos ó tipos diferentes de HPVs, de estos, sólo un tercio puede infectar el epitelio escamoso del tracto ano-genital (siendo los tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66 y 69 los más comunes a nivel mundial). Dentro de los HPVs que infectan el tracto ano-genital, alrededor de 15 son considerados como papilomavirus “de alto riesgo” (HR-HPVs) debido a que su genoma se ha encontrado en el 99% de las neoplasia cervicales intra-epiteliales ó CINs (9). De los HR-HPVs, los tipos 16 (HPV16) y 18 (HPV18) son los responsables del 85% de los CCs a nivel mundial, y son considerados como los arquetipos de HR-HPVs por excelencia (10).

Estructura del HPV16

Como se mencionó previamente, el HPV16 es el tipo más frecuente de HPV típicamente clasificado como “de alto riesgo”. El HPV16 no sólo se ha caracterizado en infecciones del cérvix, sino también de vagina, vulva, ano, pene, laringe, lengua y piel (11). La estructura y función de su genoma comprenden a E6 y E7 como sus principales oncogenes, a E1 y E2 como proteínas encargadas de regular la expresión de E6/E7, a E4 cuya función se relaciona posiblemente a la liberación de las partículas virales, y a E5, el cual posee un potencial oncogénico bajo (12). Ambos, E6 y E7 son capaces de interactuar con proteínas encargadas de regular el ciclo celular, la apoptosis y la adhesión celular (13). Por otro lado, E5 se ha demostrado que su participación oncogénica consiste en incrementar la actividad del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en las células infectadas e inhibir la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (14)

El oncogén E6

El oncogén E6 es uno de los principales oncogenes del HPV, codifica para una proteína de 151 aminoácidos la cual puede encontrarse histológicamente tanto en el núcleo celular, como en el citoplasma. La oncoproteína E6 posee dos motivos (CXXC) los cuales conforman dos dedos de zinc, posee un dominio de interacción con una ubiquitina-ligasa endógena conocida como E6-AP, la cual es necesaria para degradar al supresor de tumores p53 (15). E6 es clasificado como oncogén debido a su capacidad para inducir proliferación celular anómalos en células mamarias (16), habilidad que se atribuye a su capacidad para degradar a al supresor de tumores p53 (17). Adicionalmente, el oncogén E6 se ha encontrado constitutivamente expresado en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino (18) y puede cooperar con la oncoproteína E7 para inducir la inmortalización de cultivos primarios de queratinocitos obtenidos de prepucio (19).

No obstante, las células transformadas con E6 rara vez inducen tumores al ser inyectadas en ratones desnudos, lo que sugiere, que son necesarios otros eventos moleculares para que las células transformadas con E6 generen tumores (20).

Las proteínas con dominios PDZ

Los dominios PDZ son dominios organizadores de complejos proteínicos implicados en la formación de uniones celulares (como es el caso de la unión estrecha), transporte iónico, y transmisión de señales entre células adyacentes para la regulación de crecimiento y diferenciación. Los dominios PDZ fueron originalmente descritos en la proteína post-sináptica PSD95/SAP90, la proteína supresora de tumores de *Drosophila* dlg-A y la proteína de la unión estrecha ZO-1. Actualmente cerca de 75 proteínas se han reportado con este tipo de dominios, los cuales suelen presentarse en multicopias en las proteínas que poseen este tipo de dominios (21).

La gran mayoría de las proteínas con dominio PDZ están asociadas en la membrana plasmática formando dominios subcelulares como en el caso de las sinapsis, contactos célula-célula, y para la formación de dominios apicales, basales y laterales, lo cual llevó a la hipótesis de que este tipo de dominios son centrales en la organización de dominios en la membrana plasmática. La primera evidencia de que este tipo de proteínas son organizadoras de complejos proteínicos en membrana surgió del hecho de que el dominio C-Terminal del canal iónico de Potasio Shaker se une al segundo dominio PDZ de la proteína PSD95 tanto *in vitro* como *in vivo*. Análisis mutacionales, demostraron posteriormente que las proteínas PDZ reconocen el motivo (T/S) XV donde X es cualquier aminoácido.

No obstante, las interacciones de las proteínas con dominio PDZ no se limitan a proteínas transmembranales sino que incluyen también un gran número de proteínas citoplasmáticas las cuales son reclutadas a la membrana citoplasmática a través de este tipo de dominios y un ejemplo de estas proteínas son las sintrofinas y la óxido nítrico sintetasa (nNOS). Los dominios PDZ también están implicados en la formación de transducisomas ya que muchas proteínas citoplasmáticas que interactúan con proteínas de membrana asociadas a proteínas PDZ son componentes de vías de transducción de señales como por ejemplo: Proteína-cinasas, reguladores de proteínas G y Fosfolipasa C, etc.

Antecedentes Directos

La familia de proteínas Wnt poseen funciones pleiotrópicas que incluyen: Proliferación, migración, y diferenciación celular. En ausencia de proteínas Wnt, β -catenina, su regulador maestro, es detectable histológicamente únicamente en las uniones celulares adherentes (esta β -catenina se conoce como “estructural”). No obstante de que β -catenina puede localizarse en las uniones celulares, es la forma citosólica, la que tiene un papel funcional en la regulación génica (22).

La proteína β -catenina citosólica ó de novo, es fosforilada en residuos de Serina y Treonina por el complejo trimérico GSK3 β -Axina2-APC, las fosforilaciones de este complejo le permiten a β -catenina ser reconocida por la ubiquitina-ligasa β -TrCP para su ubiquitinación y posterior degradación por la vía del proteasoma. No obstante, cuando ciertos ligandos Wnt se unen a su receptor Frizzled y al co-receptor transmembranal LRP5/6, se establece un complejo en membrana que une y fosforila a la proteína Dishevelled (Dvl). Una vez fosforilada, Dvl interactúa con Axina2 e impide la formación del complejo de degradación de β -catenina, permitiendo que esta se acumule en el citoplasma y migre al núcleo donde formará un complejo con el factor de transcripción Tcf-4 para regular la transcripción de ciertos genes como es el caso de: *c-myc* (23), ciclina D1 (24), la proteína de multi-resistencia a drogas 1 (25), matrisilina (26), Axina2 (27) y Birc5 (28), entre otros.

La participación de la vía canónica de Wnt en CC es evidente, debido a que la acumulación nuclear de β -catenina se correlaciona con la progresión de tumores provocados por HPV en pacientes humanos, siendo este fenómeno común para lesiones malignas, pero raro para lesiones benignas (29-32). Adicionalmente, estudios recientes *in vitro* sugieren que E6 puede potenciar la vía canónica de Wnt por sí sólo (33). En este estudio, presentamos por primera vez estudios *in vivo* que demuestran que E6 puede potenciar la vía canónica de Wnt; sin embargo, hemos encontrado que la participación del dominio PDZ de E6 es controversial, mientras que los estudios *in vivo* sugiere tener un papel crucial, estudios *in vitro* sugieren que dicho dominio no es relevante.

Justificación

El cáncer relacionado a las infecciones por HPV son la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer a nivel mundial (especialmente en mujeres jóvenes). De acuerdo con la Organización Mundial de Salud (WHO), el HPV tiene una prevalencia del 20% en mujeres sexualmente activas y cada año se reportan alrededor de 500,000 infecciones nuevas, de estas, 250,000 derivan en muertes (34). Aunque a la fecha existen vacunas profilácticas

contra el HPV como lo son: Gardasil® (Producida por Merck Sharp & Dhome) (35), y Cervarix® (Producida por Glaxo Smithkline) (36, 37), éstas no protegen contra alrededor de un 30% de HR-HPVs, y resultan ineficaces para eliminar al HPV una vez establecida la infección. Por consiguiente, el estudio de los mecanismos oncogénicos del HPV, así como el diseño de futuras vacunas terapéuticas, son en la actualidad la mejor estrategia para controlar las carcinogenesis provocadas por el HPV. La presente obra, estudia un mecanismo oncogénico del HPV poco conocido, este mecanismo es la vía de señalización Wnt/ β -catenina, la cual se ha encontrado activa en lesiones precancerosas malignas y CCs, y se cree, que es un paso crucial para la transición de lesiones precancerosas hacia cancerosas.

Pregunta de Investigación

¿La vía Wnt/ β -catenina puede ser inducida por la oncoproteína E6-HPV16?

Hipótesis

“La oncoproteína E6 del HPV-16 potenciará la vía Wnt/ β -catenina en modelos *in vivo*. Este mecanismo podría deberse a la inactivación de proteínas celulares con dominios “PDZ” relacionadas directa o indirectamente con la vía Wnt/ β -catenina.”

Objetivos

Objetivo General

“Demostrar mediante modelos *in vivo* e *in vitro* la asociación entre la oncoproteína E6 del virus del papiloma humano tipo 16 y el aumento de la vía de señalización Wnt/ β -catenina.”

Objetivos Particulares

1. Mediante inmunofluorescencia, caracterizar la localización citológica de β -catenina en biopsias de piel dorsal de los modelos murinos: FvB (Wt), K14E6 y K14E6 Δ PDZ.

Materiales y Métodos

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

- **Diseño del Estudio:** Experimental, Prospectivo, Longitudinal, No-Aleatorio.
- **Análisis Estadístico:** La señal de las placas radiográficas, o la señal de las técnicas histológicas, fue cuantificada mediante un conteo de píxeles utilizando el software “Image-Pro Plus 7.0 software program (Media Cybernetics)”. El análisis estadístico de la señal positiva se evaluó a través de un estadístico “t Student” mediante el programa “SPSS 13.0 software package (IBM)” considerando las siguientes significancias estadísticas: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$.

Propagación de Ratones: FvB, K14E6, K14-E6 ^{Δ 146-151} (K14E6 Δ PDZ) y Axina2^{+LacZ}

Los ratones transgénicos: K14E6, K14E6 Δ PDZ, y Axina2^{+LacZ} fueron generados (38-40) y amablemente donados por el Dr. Paul F. Lambert (McArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin Medical School, U.S.A.). Todas las cepas transgénicas, y la cepa silvestre, poseen un fondo genético FvB, el cual es permisivo al desarrollo de carcinogénesis asociada a HR-HPVs (en contraste con las cepas C57BL/6 o BALB/c).

Los ratones transgénicos K14E6 y K14E6 Δ PDZ se caracterizan por dirigir la expresión de sus oncoproteínas (completa y trunca, respectivamente) bajo el control de un promotor de citoqueratina 14 (K14) humana. Todas las cepas transgénicas utilizadas en este estudio, fueron propagadas y experimentalmente manipuladas, de acuerdo a las normas de la Asociación Americana para el Manejo de Animales de Laboratorio (AALAC), y el protocolo de investigación fue aprobado por el comité interno del Cinvestav-IPN (UPEAL-CINVESTAV-IPN, México; NOM-062-ZOO-1999).

Para la obtención de biopsias, se rasuró el lomo de los ratones, y se removió una sección de piel dorsal de aproximadamente 1 mm de diámetro; posteriormente, las biopsias se fijaron en Paraformaldehído 4%-PBS 1X e incluyeron en parafina para ser usadas en los estudios histológicos. Para los procedimientos histológicos, se utilizaron cortes transversales de 5 μ m de espesor los cuales fueron montados en portaobjetos electro-cargados (marca Fisher Scientific, USA) para ser utilizados en técnicas de Inmunofluorescencia.

Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia

Los cortes de 5 μ m de espesor fueron desparafinados, rehidratados, y sometidos a una recuperación antigénica con Buffer de Citratos 20X (BioSB, U.S.A) durante 12 min en olla de presión. Tras la recuperación antigénica, las muestras se lavaron en PBS 1X y se incubaron con anticuerpos específicos para posteriormente ser incubados con un anticuerpo secundario conjugado con FITC (Zymed, U.S.A), contra-teñidos con Yoduro de Propidium, y montados en Vectashield (Vector, U.S.A.). Las preparaciones fueron examinadas por microscopia confocal SP2 (Leica Microsystems). Las imágenes se capturaron, e importaron al analizador de imágenes “ImageJ software program (versión 1.37v, NIH, Bethesda, MD) para la superposición, y equalización de las imágenes.

Resultados

1. El dominio de unión a proteínas con dominios PDZ de E6-HPV16 induce la translocación nuclear de β -catenina y potencia la vía Wnt/ β -catenina.

Para evaluar si la vía canónica de Wnt podría activarse en los ratones K14E6, evaluamos la inmunolocalización de la proteína β -catenina, el regulador maestro de la vía canónica de Wnt (Figura 3). En animales jóvenes (8 días de edad), no hay diferencias en la inmunolocalización de β -catenina en las tres cepas; sin embargo, a partir de los 4 meses de edad, puede detectarse una cantidad mínima de la proteína β -catenina en el núcleo de los ratones K14E6, siendo este fenómeno más acentuado conforme los animales envejecen (al año de edad) (ver Figura 3A). Esto podría explicar, en parte, el por qué no existen diferencias en animales jóvenes y si en animales adultos (en los cuales β -catenina comienza a acumularse).

Para evaluar si la β -catenina inmunolocalizada en la piel de los ratones adultos es transcripcionalmente activa, evaluamos la expresión de uno de sus genes blancos (*Axina2*) a través de cruzar cada una de las cepas de ratones: FvB, K14E6 y K14E6 Δ PDZ con un ratón transgénico el cual contiene la inserción del gen LacZ en uno de los alelos de *Axina2* (ratón *Axina2*^{+LacZ}). El ratón *Axina2*^{+LacZ}, tiene la habilidad de expresar al gen reportero LacZ como *Axina2*, y al mismo tiempo, no genera un fenotipo de ausencia de *Axina2*. Como puede observarse en la Figura 3B, únicamente la cruce *Axina2*^{+LacZ}/K14E6 genera la máxima expresión de LacZ en comparación con la cruce con las cepas FvB o K14E6 Δ PDZ. Lo que podría sugerir que la proteína β -catenina, además de inmunolocalizarse en el núcleo, es transcripcionalmente activa.

Discusión

El ratón K14E6 es un modelo útil para el estudio del cáncer de piel provocado por el HPV (38). En este modelo, la expresión de la oncoproteína E6-HPV16 es dirigida a la capa basal de todos los epitelios estratificados (piel, cristalino, cérvix, etc.) mediante un promotor humano de citoqueratina 14 (38, 42). Aunque la oncoproteína E6 se expresa virtualmente en todos los epitelios estratificados, únicamente en piel es capaz de desarrollar tumores y cáncer por sí sola (38, 43). Lo que sugiere que factores tejido-específicos son críticos para el potencial oncogénico de la oncoproteínas E6-HPV16.

Como un primer acercamiento para conocer estos “factores tejido-específicos”, nuestro grupo reportó las diferencias globales en el transcriptoma de tejido cervical y piel en comparación con ratones silvestres (43). Nuestro grupo de trabajo reportó, que los genes que participan en adhesión celular y la vía Wnt cambian preferentemente en piel que en el tejido cervical (43). Con bases en estas observaciones, creemos que la piel de los ratones K14E6 son un modelo adecuado para estudiar la relación de la oncoproteína E6 con la vía Wnt/ β -catenina.

Estudios subsecuentes con el modelo de ratón K14E6 Δ PDZ, demostraron que el potencial oncogénico de la oncoproteína E6 residen en su dominio de unión a proteínas con dominio PDZ (39). En este estudio, demostramos que los ratones K14E6 y K14E6 Δ PDZ presentan un fenotipo muy similar en piel cuando los ratones son muy jóvenes (de 8 días de edad), esto podría sugerir que el dominio de unión a proteínas PDZ no es necesario para iniciar un efecto hiperproliferativo en piel, pero sí es necesario para mantenerlo en el adulto.

Gran parte de los estudios que demuestran una asociación clara entre las infecciones por HPV y la inducción de la vía canónica de Wnt proceden de pacientes humanos son lesiones cervicales pre-malignas y malignas (29-32). En la mayoría de estos estudios, existe una clara asociación entre el progreso de las lesiones cervicales, y la acumulación gradual de β -catenina en el núcleo, de tal suerte que es frecuente encontrar a β -catenina con tinción nuclear en biopsias derivadas de CIN III o en CC, pero no en neoplasia leves o moderadas (CIN I o II). Adicionalmente, en un estudio muy elegante el Dr. Üren y cols. demostraron que, la activación de la vía Wnt/ β -catenina es un indispensable para que aquellos queratinocitos inmortalizados con HPV obtengan un crecimiento celular dependiente de anclaje, es decir que adquieran un fenotipo maligno (32). Por consiguiente, la infección por HPV es necesaria para la inmortalización celular más no para la transformación celular, y el encendido de otras vías de señalización (como la vía canónica de Wnt) son necesarias para la generación de un genotipo maligno.

Contrario a lo ocurrido en el cérvix, el oncogén E6 sí es suficiente para provocar tumores y que luego estos progresen a lesiones cancerosas; sin embargo, al igual que en el cérvix, la vía canónica de Wnt se activa durante las etapas tardías de la carcinogénesis de piel inducida por E6 (Ver Figura 3). Es necesario enfatizar, que la oncoproteína E6 logra generar lesiones malignas en piel cuando los ratones alcanzan el año de edad, y es precisamente en esta edad, cuando la tinción nuclear de β -catenina es máxima. Aunque en este estudio hemos demostrado que la oncoproteína E6 es capaz de acumular a β -catenina en el núcleo celular, el mecanismo celular por el cual lo consigue está lejos de ser el objetivo del presente trabajo; sin embargo, una posible explicación podría residir en las vías de señalización reguladas por las proteínas con dominios PDZ blancos de E6.

Es sabido que Dlg1 y Scribble participan en la formación de uniones ZAs, y que estas mismas proteínas participan en la regulación de la vía Wnt/ β -catenina. Por ejemplo, ambas proteínas (Dlg1 y Scribble) pueden interactuar con la proteína APC en una región necesaria para su actividad antitumoral (44, 45). Adicionalmente, los complejos hDlg-APC son capaces de regular negativamente el ciclo celular en fibroblastos de ratón NIH3T3 (46). Por consiguiente, la degradación de Dlg1 y Scribble por parte de la oncoproteína E6 (20) podría conducir a un decremento de la acción de APC y que esto derive en la acumulación y translocación de β -catenina en el núcleo celular.

Este trabajo demuestra por primera vez, que la vía canónica de Wnt puede potenciarse en un modelo *in vivo*, y a su vez, refuerza las observaciones recientemente reportadas por Lichtig y cols. El mecanismo de esta inducción está lejos de demostrarse en el presente trabajo, y se requieren de más estudios en el futuro para esclarecer el mecanismo por el cual E6 puede potenciar la vía Wnt/ β -catenina.

Conclusión

La vía Wnt/ β -catenina puede ser incrementada por la oncoproteína E6 en un modelo *in vivo*.

Perspectivas

- A) Realizar una cinética de la acumulación de β -catenina en piel dorsal con un mayor número de tiempos. Realizar esta cinética mediante inmunohistoquímica y Western blot (extractos totales y por fraccionamiento celular).
- B) Estudiar la posibilidad de una acumulación nuclear de β -catenina en cultivos celulares transfectados con E6-HPV16 tanto en transfecciones transitorias como estables.
- C) Estudiar otros el mRNA y la proteína de otros genes reguladores de la vía Wnt/ β -catenina (Ejem. TCF4, APC, CK1, etc.).
- D) Estudiar las modificaciones post-traduccionales de β -catenina.
- E) Estudiar estos eventos en otros epitelios estratificados donde E6 se ha demostrado ser suficiente para inducir neoplasia (como el cristalino (47) para el caso del ojo, o el epitelio del recto (48)).

Referencias

1. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009;384:260-5.
2. Syrjanen S, Syrjanen K. The history of papillomavirus research. *Cent Eur J Public Health*. 2008;16 Suppl:S7-13.
3. Strauss MJ, Shaw EW, et al. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1949;72:46-50.
4. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer*. 1974;13:650-6.
5. zur Hausen J, Schulte-Holthausen H, Wolf H, Dorries K, Egger H. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human herpes group viruses. *Int J Cancer*. 1974;13:657-64.
6. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1977;78:1-30.
7. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol*. 1976;20:505-9.
8. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80:3812-5.
9. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189:12-9.
10. Porras C, Bennett C, Safaeian M, Coseo S, Rodriguez AC, Gonzalez P, et al. Determinants of seropositivity among HPV-16/18 DNA positive young women. *BMC Infect Dis*. 2010;10:238.
11. Conway MJ, Alam S, Ryndock EJ, Cruz L, Christensen ND, Roden RB, et al. Tissue-spanning redox gradient-dependent assembly of native human papillomavirus type 16 virions. *J Virol*. 2009;83:10515-26.
12. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci*. 2007;98:1505-11.
13. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1288:F55-78.
14. Tsai TC, Chen SL. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol*. 2003;148:1445-53.

15. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990;248:76-9.
16. Liu Y, Chen JJ, Gao Q, Dalal S, Hong Y, Mansur CP, et al. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol*. 1999;73:7297-307.
17. Band V, De Caprio JA, Delmolino L, Kulesa V, Sager R. Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *J Virol*. 1991;65:6671-6.
18. Woodworth CD, Doniger J, DiPaolo JA. Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. *J Virol*. 1989;63:159-64.
19. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*. 1989;8:3905-10.
20. Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes PJ. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol*. 2008;153:397-408.
21. Fanning AS, Anderson JM. PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest*. 1999;103:767-72.
22. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810.
23. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998;281:1509-12.
24. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999;398:422-6.
25. Yamada T, Takaoka AS, Naishiro Y, Hayashi R, Maruyama K, Maesawa C, et al. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis. *Cancer Res*. 2000;60:4761-6.
26. Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, et al. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*. 1999;18:2883-91.
27. Yan D, Wiesmann M, Rohan M, Chan V, Jefferson AB, Guo L, et al. Elevated expression of axin2 and hnk2 mRNA provides evidence that Wnt/beta-catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:14973-8.
28. Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, et al. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1603-8.
29. Imura J, Ichikawa K, Takeda J, Fujimori T. Beta-catenin expression as a prognostic indicator in cervical adenocarcinoma. *Int J Mol Med*. 2001;8:353-8.
30. Pereira-Suarez AL, Meraz MA, Lizano M, Estrada-Chavez C, Hernandez F, Olivera P, et al. Frequent alterations of the beta-catenin protein in cancer of the uterine cervix. *Tumour Biol*. 2002;23:45-53.

31. Shinohara A, Yokoyama Y, Wan X, Takahashi Y, Mori Y, Takami T, et al. Cytoplasmic/nuclear expression without mutation of exon 3 of the beta-catenin gene is frequent in the development of the neoplasm of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2001;82:450-5.
32. Uren A, Fallen S, Yuan H, Usubutun A, Kucukali T, Schlegel R, et al. Activation of the canonical Wnt pathway during genital keratinocyte transformation: a model for cervical cancer progression. *Cancer Res.* 2005;65:6199-206.
33. Lichtig H, Gilboa DA, Jackman A, Gonen P, Levav-Cohen Y, Haupt Y, et al. HPV16 E6 augments Wnt signaling in an E6AP-dependent manner. *Virology.* 2010;396:47-58.
34. Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virol J.* 2011;8:269.
35. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer.* 2006;95:1459-66.
36. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2004;364:1757-65.
37. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet.* 2006;367:1247-55.
38. Song S, Pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol.* 1999;73:5887-93.
39. Nguyen ML, Nguyen MM, Lee D, Griep AE, Lambert PF. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J Virol.* 2003;77:6957-64.
40. Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, et al. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol.* 2002;22:1184-93.
41. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-8.
42. Song S, Liem A, Miller JA, Lambert PF. Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. *Virology.* 2000;267:141-50.
43. Mendoza-Villanueva D, Diaz-Chavez J, Uribe-Figueroa L, Rangel-Escareao C, Hidalgo-Miranda A, March-Mifsut S, et al. Gene expression profile of cervical and skin tissues from human papillomavirus type 16 E6 transgenic mice. *BMC Cancer.* 2008;8:347.
44. Matsumine A, Ogai A, Senda T, Okumura N, Satoh K, Baeg GH, et al. Binding of APC to the human homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Science.* 1996;272:1020-3.

45. Takizawa S, Nagasaka K, Nakagawa S, Yano T, Nakagawa K, Yasugi T, et al. Human scribble, a novel tumor suppressor identified as a target of high-risk HPV E6 for ubiquitin-mediated degradation, interacts with adenomatous polyposis coli. *Genes Cells*. 2006;11:453-64.
46. Ishidate T, Matsumine A, Toyoshima K, Akiyama T. The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. *Oncogene*. 2000;19:365-72.
47. Nguyen MM, Nguyen ML, Caruana G, Bernstein A, Lambert PF, Griep AE. Requirement of PDZ-containing proteins for cell cycle regulation and differentiation in the mouse lens epithelium. *Mol Cell Biol*. 2003;23:8970-81.
48. Stelzer MK, Pitot HC, Liem A, Schweizer J, Mahoney C, Lambert PF. A mouse model for human anal cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3:1534-41.

URLs

1. <http://hpvvirusinwomen.com>

Anexo I (Figuras)



Figura 1: Verruga en la piel provocada por HPV (condilomata acuminata). Las verrugas cutaneas provocadas por HPV usualmente tienen una forma típica de “coliflor” (Obtenido de la URL <http://hpvvirusinwomen.com>).

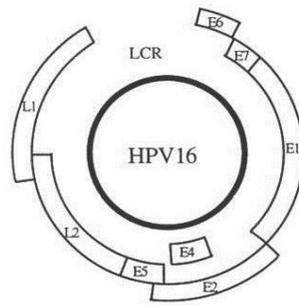


Figura 2: Mapa del Genoma del HPV-16. Esta figura muestra los principales marcos de lectura abierta que poseen la habilidad de codificar proteínas así como la region larga de control (Tomado de la Ref. (34)).

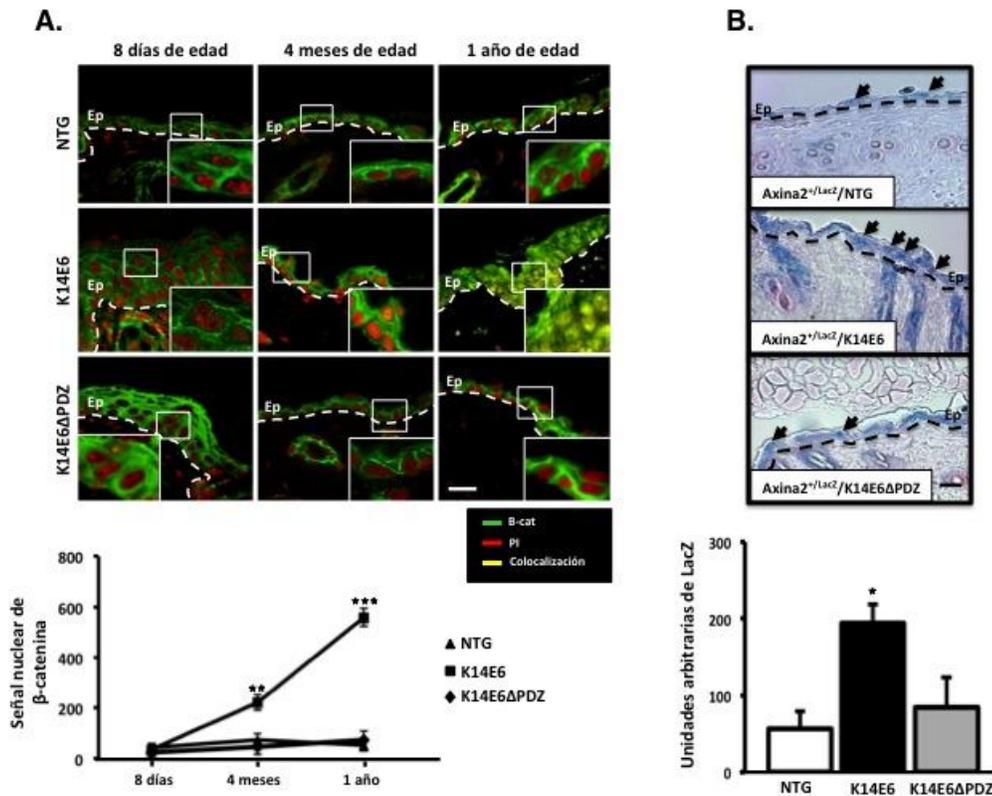


Figura 3. Translocación nuclear de β -catenina e inducción *in vivo* de la vía canónica de Wnt. (A) Detección de la proteína β -catenina mediante inmunofluorescencia en cortes de 5- μ m de espesor provenientes de piel dorsal a tres edades diferentes (indicadas en la figura). Nótese que únicamente la cepa K14E6 es capaz de acumular gradualmente a la proteína β -catenina, y que la acumulación más alta ocurre al año de edad. (B) Inducción de la vía Wnt/ β -catenina mediante la evaluación de la expresión de LacZ (el cual es dependiente de la expresión de Axina2) en la piel dorsal de ratones de 7 meses de edad doble-transgénicos. Nótese que únicamente la cruce Axina2^{+/LacZ}/K14E6 muestra la máxima señal de LacZ en comparación con sus contrapartes mutante y silvestre. En (A): Señal verde = β -catenina, Señal roja = Yoduro de Propidium (PI), Señal Amarilla = Superposición. En (B): La señal azul representa la actividad de LacZ activity, y la contra-tinción se llevó a cabo mediante “Fast Red”. Aumento: 40X. Ep = Epidermis. Línea punteada = Membrana basal. Barra de escala = 30 μ m. Flechas = Señal nuclear positiva de LacZ.

