



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Efectos de la expresión del gen E5 de VPH-16
sobre la abundancia y localización de la proteína β -catenina
en queratinocitos humanos HaCaT”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

DANIEL ARTURO RANGEL DE LEÓN

ASESORA

M. EN C. ALICIA MARÍA REVELES ESPINOZA

CO-ASESORA

M. EN C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efectos de la expresión del gen E5 de VPH-16 sobre la abundancia y localización de la proteína β -catenina en queratinocitos humanos HaCaT.

Que presenta el pasante: Daniel Arturo Rangel de León
Con número de cuenta: 306754968 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Mayo de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
2do. SUPLENTE	Dra. Ana Paola Rojas Meza	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm*

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE GRÁFICOS	vi
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Generalidades del cáncer cérvico-uterino	2
Epidemiología del cáncer cérvico-uterino	3
El cérvix	5
Epitelio escamoso estratificado	7
Células troncales somáticas	11
Virus del papiloma humano	13
Componentes del VPH-16	20
La proteína E5 de VPH-16	21
La proteína β -catenina	22
La vía canónica de WnT	30
La proteína β -catenina en cáncer	33
Alteraciones de β -catenina por E5 de VPH-16	34
Células HaCaT como modelo de estudio	35
JUSTIFICACIÓN	37
HIPÓTESIS	37
OBJETIVOS	38
Objetivo general	38
Objetivos particulares	38
METODOLOGÍA	39
Cultivo celular	39
Exposición a cloruro de litio	39
Inmunofluorescencia indirecta	39
Inmunodetección en fase sólida	40
Estandarización de IFI en subpoblación $\alpha 6$ -intbriCD71dim	43

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	61
PERSPECTIVAS	62
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXO	69
Material y reactivos	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del útero.	6
Figura 2. Epitelio escamoso estratificado.	8
Figura 3. Árbol taxonómico del VPH.	14
Figura 4. Genoma del VPH-16.	17
Figura 5. Vías de entrada del VPH.	19
Figura 6. Estructura primaria de β -catenina.	24
Figura 7. Estructura primaria de axina.	26
Figura 8. Estructura primaria de APC.	27
Figura 9. Complejo de degradación de β -catenina.	28
Figura 10. La vía Wnt.	32
Figura 11. IFI de células HaCaT expuestas a LiCl por 48 horas.	46
Figura 12. IFI de células HaCaT expuestas a LiCl durante 168 horas.	47
Figura 13. IFI de células HaCaT que expresan el gen E5 y LacZ α .	49
Figura 14. Exportación de β -catenina del núcleo.	51
Figura 15. Inmunodetección en fase sólida de β -catenina.	52
Figura 16. IFI de células HaCaT después de su separación por citometría de flujo.	56
Figura 17. IFI de células HaCaT con características de troncalidad.	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Marcadores de queratinocitos según su estadio de diferenciación.	9
Tabla 2. Preparación de muestras para obtener la curva patrón.	41

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Cambios en la concentración de β -catenina.	53
Gráfico 2. Comparación de la intensidad media de fluorescencia.	59

ABREVIATURAS

20R2:	Repetido 2 de 20 a.a.
a.a.:	Aminoácidos.
AMPc:	Adenosin monofosfato cíclico.
APC:	Poliposis adenomatosa coli.
Arm:	Dominio en repetidos de armadillo.
ATP:	Adenosin trifosfato.
BCL9:	Linfoma de células B 9.
CaCU:	Cáncer cérvico-uterino.
CBP:	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc.
CIN:	Neoplasia intraepitelial cervical.
CK1:	Caseín cinasa 1.
GSK-3:	Cinasa glucógeno sintasa 3.
CCD:	Células comprometidas a diferenciación.
CDC:	Centro de control de enfermedades.
CID:	Dominio inhibitorio de catenina.
CRM-1:	Región de mantenimiento del cromosomal 1.
CTA:	Células transitoriamente amplificadas.
CTC:	Células troncales cancerosas.
CTS:	Células troncales somáticas.
DAPI:	4',6-diamino-2-fenilindol.
DISC:	Complejo de señalización de inducción a muerte.
DMEM:	Medio Esencial Dulbecco Modificado.

dpi:	Días post-infección.
ECL:	Reactivo quimioluminiscente.
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico.
FACS:	Separación celular por activación fluorescente.
FasL:	Ligando de Fas.
HSIL:	Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado.
HaCaT-wt:	Queratinocitos humanos inmortalizados silvestres.
HaCaT-E5:	Queratinocitos humanos inmortalizados que expresan E5.
HaCaT-LacZ α :	Queratinocitos humanos inmortalizados que expresan LacZ α .
HCT116:	Células de carcinoma colorectal humano.
IARC:	Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer.
IF:	Inmunofluorescencia.
IFI:	Inmunofluorescencia indirecta.
IgG:	Inmunoglobulina clase G.
IP:	Yoduro de propidio.
LCR:	Región larga de control (no codificante).
LEF:	Factor de unión potenciador linfoide.
LSIL:	Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado.
LiCl:	Cloruro de litio.
LRP:	Receptor lipoproteico de baja densidad.
MHC:	Complejo principal de histocompatibilidad.
NES:	Señales de exportación nuclear.
NIH:	Instituto Nacional de Salud (EE.UU.).
NLS:	Señales de localización nuclear.
NPC:	Complejo de poro nuclear.
Nup:	Proteína nucleoporina.
OMS:	Organización Mundial de la Salud.
PE:	Ficoeritrina.
PE-Cy5:	Ficoeritrina Cy5.

PBS:	Buffer salino de fosfatos.
PCP:	Polaridad celular plana.
PFA:	Paraformaldehído.
PP2A:	Fosfoproteína fosfatasa 2A.
PRR:	Papilomatosis respiratoria recurrente.
RIPA buffer:	Buffer para ensayo de radioinmunoprecipitación.
RGS:	Dominio homólogo del regulador de señalización de proteína G.
SCF:	Complejo Skp, Cullina, F-box.
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
SFB:	Suero fetal bovino.
SV-40:	Virus del simio 40.
TCF:	Factor de transcripción.
VPH:	Virus del papiloma humano.
VAR:	VPH de alto riesgo.
VBR:	VPH de bajo riesgo.
Xpo1:	Exportina 1.

RESUMEN

La β -catenina es una proteína con actividad doble dentro de las células, participa en las uniones adherentes junto con la E-cadherina, y forma parte de la vía canónica de Wnt como factor de transcripción mediando la diferenciación y proliferación celular. Es en este último proceso en donde aumenta su importancia, principalmente como causa posible de la génesis de tumores y la progresión a cáncer, además de que se ha visto particularmente activa en cáncer colorrectal. Por otro lado, β -catenina también se ha visto alterada en muestras de pacientes con lesiones intraepiteliales de cérvix y/o cáncer cérvico-uterino. Cáncer que a nivel nacional tiene alta prevalencia y a nivel mundial es el cuarto cáncer más común en mujeres; adicional a esto, se sabe que gran parte de los casos reportados es debido a la infección persistente del virus del papiloma humano. Por todo lo anterior, en este trabajo se buscó determinar si β -catenina se veía afectada en localización y/o abundancia por efecto del virus del papiloma humano, específicamente de la expresión del gen *E5* del tipo 16.

Se encontró que la presencia del gen viral no causaba una translocación de β -catenina hacía el núcleo donde se presumía su presencia para su actividad intrínseca transcripcional. Por otro lado, E5 provocó un aumento de la proteína y su acumulación en citoplasma, pudiendo afectar al proteosoma encargado de la degradación de β -catenina, o alterando el movimiento de la misma a través del citoplasma después de su síntesis. Ahora bien, el hecho de mejorar la técnica para observar a β -catenina en células con características de troncalidad, abre la posibilidad de fijar nuevos y mejores objetivos con el fin de saber qué efecto tiene E5, específicamente en esta subpoblación de queratinocitos humanos.

INTRODUCCIÓN

Generalidades del cáncer cérvico-uterino

El cáncer cérvico-uterino (CaCU), cáncer cervical o cáncer de cérvix es una anomalía caracterizada por el crecimiento descontrolado del tejido epitelial del cérvix o cuello uterino, específicamente de las células escamosas o glandulares, denominado carcinoma y adenocarcinoma, respectivamente. Mientras que el carcinoma se origina en la superficie del ectocérvix, el adenocarcinoma aparece en las capas más internas del útero, en las glándulas productoras de moco del endocérvix (Jusman, Ng; et al., 2014). El CaCU se origina a partir de células normales, produciendo una displasia o células precancerosas en un periodo de hasta 2 a 3 décadas, pero en ocasiones demora menos de 120 meses (Ault, 2006), lo que da pie a pensar que su causa es multifactorial. De hecho, el desarrollo de cáncer se ha asociado con el tabaquismo y algunas infecciones por Herpes Virus Simple y/o *Chlamydia trachomatis*, las cuales provocan la persistencia del agente causal del CaCU (Ault, 2006).

En primera instancia, la displasia no se establece como células malignas, sino que se conoce como neoplasia intraepitelial cervical (CIN, por sus siglas en inglés). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció un sistema para la clasificación de las neoplasias cervicales: CIN de grado 1, 2 y 3. Además, el sistema Bethesda se introdujo (desde 1988) para simplificar la clasificación: lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL) que incluyen a las CIN 1, y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL) que comprenden a las CIN 2 y CIN 3 (Jusman; et al., 2014). Se ha descrito que dos tercios de las lesiones CIN 1, la mitad de CIN 2 y un tercio de CIN 3 pueden regresar a la normalidad, y sólo una pequeña porción progresa a cáncer (Cronje, 2005). A pesar de esta afirmación, hoy en día el CaCU es causa de mortalidad elevada, lo que debe una atención especial, si bien no sólo en cuanto al tratamiento y diagnóstico que llegan a ser muy invasivos o agresivos, sino también con un enfoque en la prevención.

Epidemiología del cáncer cérvico-uterino

Actualmente, el CaCU es el cuarto cáncer más común en todo el mundo con 528 mil nuevos casos al año y 266 000 muertes estimadas en el 2012 (IARC, Septiembre 2015). El 85% de los casos se presenta en países de medianos y bajos recursos. Además, es la cuarta causa de muerte sólo por debajo de cáncer de mama, pulmón y colorectal (Tornesello, Buonaguro; et al., 2013). En los países en vías de desarrollo, el 1.9% de las mujeres padecen CaCU y el 1.1% muere a causa del mismo antes de los 75 años. Mientras que en países desarrollados la incidencia y la mortalidad son 2 a 3 veces menores: 0.9% y 0.3%, respectivamente.

Esto debido al éxito en los programas de chequeo citológicos (prueba de Papanicolaou) (Arbyn, Castellsague; et al., 2011). Para ejemplificar, en Suecia, el 80 % de las mujeres se monitorean con regularidad, mientras que en Sudáfrica menos del 1 % de las mujeres acude a un chequeo citológico desde que éste se implementó en la década de los 80's (Cronje, 2005).

Hoy en día, el CaCU es el segundo tipo de patología tumorigénica más común en mujeres. Tan sólo en 2008, se estimó una tasa de incidencia de 15 mujeres por cada 100 000, es decir que 530 000 mujeres desarrollaron CaCU. Mientras que la tasa de mortalidad fue de 8 defunciones por cada 100 000 mujeres, es decir, 275 000 muertes a causa del cáncer cervical (Arbyn; et al., 2011). El mismo año, tan sólo en México se diagnosticaron 13 939 nuevos casos; a pesar de que es muy bien conocida la etiología de la neoplasia; las medidas preventivas, el diagnóstico y mejoras en los tratamientos aún son precarias, por lo que la incidencia y la mortalidad del CaCU han aumentado en las últimas décadas, y esto es debido al limitado acceso que se tiene al servicio médico especialmente en regiones rurales (Ortega-Cervantes, Rojas-Garcia; et al., 2013).

Por otro lado, la Secretaria de Salud ha proyectado que para lograr un descenso en la mortalidad de la enfermedad se requiere una cobertura de al menos 80% en la detección, diagnóstico y tratamiento del CaCU, ya que para el 2011 tan sólo se tenía cubierto el 43% de la población. Por otro lado, se han registrado más de cuatro mil muertes por año debidas a este

cáncer, números muy alarmantes por disminuir (Torres Lobaton, Bustamante Iglesias; et al., 2013).

El CaCU es causado por el virus del papiloma humano (VPH), aproximadamente ocurren 6.2 millones de infecciones por este virus cada año, y actualmente existen 20 millones de personas infectadas tan sólo en EE.UU. (Ault, 2006). El VPH se transmite vía contacto sexual por lo que prevalece en la población sexualmente activa. El Centro de Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) en EE.UU. estima que al menos la mitad de los individuos sexualmente activos estarán en contacto con el virus en algún punto de su vida, por lo que aproximadamente el 80% de las mujeres se infectarán por VPH para los 50 años de vida (Ault, 2006).

El VPH también puede causar cáncer en vulva y vagina; y sin discriminar género, en hombres puede provocar cáncer de pene. Morales, et. al. (2012) presentaron un estudio realizado en México donde determinaron que la incidencia de VPH en hombres de ciudades rurales era del 15%. Además, el VPH es causante de cáncer orofaríngeo en ambos sexos. Así mismo, el 90% de los casos con tumor maligno en cabeza y cuello están asociados a carcinomas de células escamosas debido al VPH, principalmente del tipo 16. De hecho, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer ha reportado, hasta el 2012, que el tipo 16 es responsable de más de la mitad del cáncer cervical (54.4 %), mientras que el tipo 18 sólo lo es del 16.6 % a nivel mundial (Septiembre 2015). En Alemania en 2008, se reportaron 15 583 casos de cáncer en cabeza y cuello y 6 100 pacientes murieron debido a ello. Además su prevalencia está altamente asociada al consumo de alcohol y nicotina, provocando que el cáncer en boca y labios escale a la posición 15º, por arriba del carcinoma de laringe (20º) y de orofaringe (22º) a nivel mundial (Tribius y Hoffmann, 2013).

El cérvix

El útero se divide en 3 partes principales: cuerpo, istmo y cérvix (cuello en latín), este último es la parte más inferior que conecta al útero con la vagina. El istmo es la porción de transición entre el endocérvix y el cuerpo; mientras que la parte que conecta con la vagina es denominada exocérvix (Fig. 1). El cérvix es un canal elíptico que contiene crestas de mucosa longitudinalmente, mide entre 2.5 y 3 cm de longitud y en su diámetro interno mide hasta 8 mm en su parte más amplia. Éste se compone de tejido fibroso, muscular y elástico, recubierto por epitelio columnar y escamoso estratificado. El primero se presenta en el endocérvix (canal cervical) y se conforma por células secretoras de mucina; mientras que el escamoso presenta una zona basal, intermedia y superficial (Blaustein y Kurman, 2002).

Entre ambos tejidos se encuentra una zona de especial énfasis para comprender la etiología del CaCU: la zona de transformación o unión escamocolumnar, y como su nombre lo dice, es la unión entre el epitelio escamoso del exocérvix y el columnar del endocérvix. La zona de transformación puede variar en forma y tamaño por factores hormonales y físicos como: edad, actividad sexual, embarazo, entre otros; lo que es destacable es que se presentan células con alta capacidad proliferativa (Doorbar, Quint; et al., 2012) debido a que son células del epitelio columnar que son remplazadas por epitelio escamoso metaplásico (Blaustein; et al., 2002).

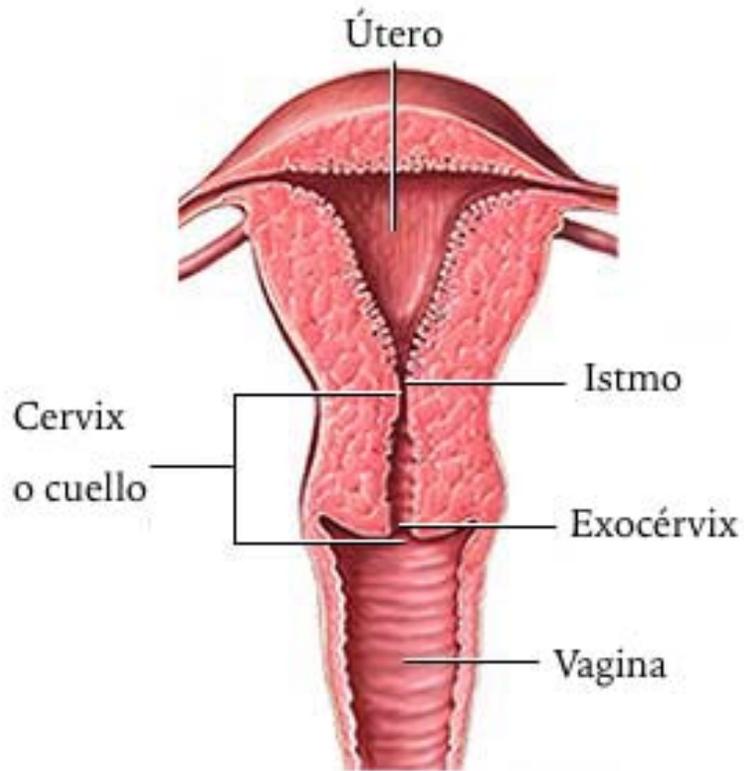
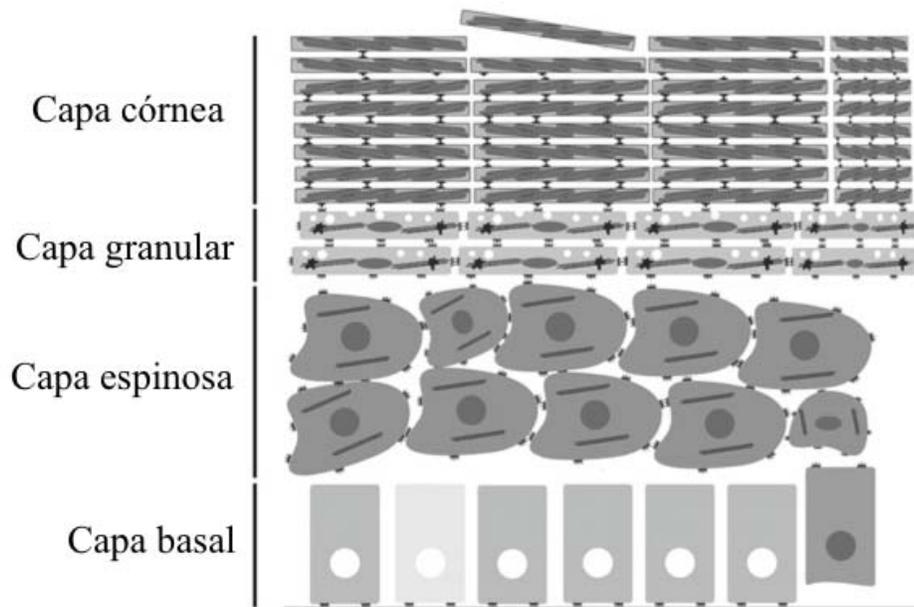


Figura 1. Anatomía del útero.

El útero tiene conexión con la vagina mediante el cérvix o cuello uterino, lugar muy susceptible al desarrollo de CaCU, en especial por el exocérvis, lugar donde se encuentra la zona de transformación.

Epitelio escamoso estratificado

El epitelio escamoso estratificado está comprendido por 3 zonas principales: una zona basal, zona intermedia y zona superficial. Estas zonas también son características de la epidermis, y dado que el epitelio del cérvix es una estructura multicapa al igual que la epidermis de la piel (Alberts, Wilson; et al., 2008) se hará referencia a ésta de una forma general para poder comprender la morfología del epitelio del cérvix. La epidermis es la barrera más amplia que tiene el organismo en defensa a la abrasiones físicas, químicas y biológicas del ambiente, además, provee un sistema de protección a la luz ultra violeta gracias a la pigmentación. Estas características de la epidermis están dadas por su organización como epitelio escamoso estratificado, conformado por queratinocitos en diversos estadios de diferenciación en: capa basal, espinosa, granular y córnea (Fig. 2); de ésta última las células se desprenden pero son continuamente remplazadas por las células de las capas interiores (Pasquariello, Oddi; et al., 2009).



Modificada de Pasquariello (2009).

Figura 2. Epitelio escamoso estratificado.

Los diferentes estadios de diferenciación de los queratinocitos durante su transición por el epitelio escamoso estratificado. En la capa basal se muestran células troncales somáticas (núcleo incoloro y citoplasma gris claro), células de transición amplificadas (núcleo incoloro y citoplasma gris obscuro) y células comprometidas a diferenciación (núcleo gris y citoplasma gris intenso).

Capa basal: En esta zona se localizan las células que darán lugar a todos y cada uno de los estadios diferenciados de las capas superiores, mismas que presentan características de células troncales somáticas (CTS). Su proceso de división puede dar lugar tanto a una célula diferente (diferenciación) como a una célula igual (autorenovación) en características bioquímicas y fisiológicas. Si bien, estas células presentan baja actividad en el ciclo celular, poseen un gran potencial proliferativo y por ello son esenciales en la reconstitución y el mantenimiento del tejido (Blanpain, Lowry; et al., 2004).

Así mismo, esta capa es residencia de otro tipo de células que, si bien aún son progenitoras, disminuye su capacidad proliferativa y de diferenciación, son las células transitoriamente amplificadas (CTA). Sin embargo, su ciclo celular es rápido para proveer células de diferenciación terminal, llamadas células post-mitóticas o comprometidas a diferenciación (CCD) (Pasquariello; et al., 2009). Además de su ciclo celular, estas células se diferencian en sus capacidades pluripotenciales y su posible localización en la capa basal; estas células también presentan propiedades bioquímicas diferentes (Tabla 1), especialmente en los marcadores $\beta_1/\alpha_6\beta_4$ integrinas y CD71.

Tabla 1. Marcadores de queratinocitos según su estadio de diferenciación.

Proteína	Descripción	Estadio de diferenciación
CD71	Receptor de transferrina	CCD / CTA
Corneodesmosina	Envuelve la superficie del desmosoma	Granular
Filagrina	Proteína rica en histidina involucrada en los filamentos de queratina	Granular
Integrina $\beta_1/\alpha_6\beta_4$	Adhesión célula-célula o célula-membrana basal. Uniones adherentes y hemidesmosomas	Células troncal y CTA
Involucrina	Componente mayor de la envoltura corneal	Espinosa / granular
Queratina 1/10	Filamentos intermedios	Suprabasal
Queratina 5/14	Filamentos intermedios	Basal
Sulfhidrido oxidasa	Cataliza la formación puentes disulfuro en la envoltura cornea	Granular
β -Defensina 2	Peptido antimicrobiano	Granular

Modificada de Pasquariello (2009).

Capa espinosa: Una vez que las células se comprometen a diferenciación, su maquinaria bioquímica cambia, disminuyen las integrinas, además la matriz extracelular se altera; de tal forma que son capaces de moverse hacia las capas superiores. Además, los desmosomas (estructuras de adherencia celular) incrementan en número provocando que la célula tome una forma espinosa (o con púas, de ahí el nombre de la capa) (Pasquariello; et al., 2009).

Capa granular: Esta capa se localiza superior a la capa espinosa. Sus células se caracterizan por la granularidad, la cual puede ser de dos tipos: *i*) gránulos de queratohialina y *ii*) gránulos o cuerpos lamelares, éstos son organelos secretores de fosfolípidos, colesterol, glucosilceramida y diversas proteínas que mantienen la homeostasis de la descamación y la formación de la envoltura corneal. Por otro lado, los gránulos de queratohialina están formados principalmente por profilagrina, precursor de la filagrina: proteína que agrega los tonofilamentos de queratina en microfibras, la cual es el inicio de la transformación a células cornificadas (Pasquariello; et al., 2009).

Capa córnea: Conforme los queratinocitos salen a la luz del epitelio entran a una fase inerte en su metabolismo. Estas células, ahora llamadas corneocitos, pierden organelos citoplasmáticos junto con el núcleo. Al final de la diferenciación, las células son planas y están muertas, se unen fijamente con filamentos de queratina a la envoltura corneal. Además existen uniones especiales entre los corneocitos: corneodesmosomas; cuya lisis se lleva a cabo por proteínas intercelulares de una manera muy controlada, pues de esto depende la descamación del epitelio (Pasquariello; et al., 2009).

Células troncales somáticas

Como ya se mencionó anteriormente, la epidermis está constituida por una serie de capas de queratinocitos anclados a una membrana basal y mediante un proceso de diferenciación, pierden este anclaje aproximándose a la luz de la epidermis para descamarse posteriormente.

Este anclaje está dado por diferentes moléculas como los receptores heterodiméricos que consisten en una subunidad α y una β . Actualmente, estos receptores se denominan integrinas, y su función principal es mediar las uniones célula-matriz extracelular pero también las uniones intercelulares. $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_6\beta_4$ son las integrinas más predominantes. La integrina $\alpha_6\beta_4$ se expresa únicamente en unas estructuras denominadas hemidesmosomas que anclan a la células con la membrana basal y se ha demostrado que su expresión disminuye con el transcurso de la diferenciación del queratinocito (Kaur y Li, 2000).

Actualmente, se ha descrito que este biomarcador de superficie permite la separación de CTS mediante citometría de flujo con una técnica denominada: separación celular por activación de fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés). Anteriormente, se utilizaba la alta expresión de integrina $\alpha_6\beta_4$ para separar las células de la capa basal; sin embargo, era insuficiente para separar CTS y CTA. Li, et. al. (1998) implementaron el uso de un segundo marca-dor: 10G7 (posteriormente denominado CD71), el cual está relacionado con elevada proliferación, logrando así discernir entre ambas subpoblaciones.

Las CTS de queratinocitos representan una minoría de células quiescentes con gran potencial proliferativo, pero a su vez, ilimitada capacidad de autorenovación. Estas células poseen tres características esenciales que las separan de las células somáticas diferenciadas:

1. Generar células idénticas manteniendo su capacidad de autorenovación por periodos largos.
2. Producir células hijas capaces de diferenciarse con funciones específicas.
3. Responder a controles homeostáticos para autorenovación y/o progenie diferenciada (Lopez, Valdez-Morales; et al., 2013).

Las células troncales han sido tema de discusión por ser potenciales células blanco del VPH; el hablar de su mantenimiento y proliferación también capta la atención pues se ha propuesto que la vía Wnt es de vital importancia en estos procesos, especialmente el rol de β -catenina.

Además, se les ha encontrado relación con el establecimiento y mantenimiento de las llamadas células troncales cancerosas (CTC) (Polakis, 2012). Se ha denominado CTC a aquellas células que, dentro de un tumor dado, tienen la capacidad de iniciar, hacer crecer y provocar recurrencia del mismo, dado que poseen las mismas características que las CTS, es decir, capacidad de diferenciación y de autorenovación.

Es precisamente en la autorenovación donde la vía Wnt/ β -catenina tiene un papel destacable, ya que como se profundizará más adelante, activa genes como *ciclina D1*, *c-Jun* y *c-Myc* (Wang, Wu; et al., 2013). Es aquí donde recae la importancia de las células troncales y su vulnerabilidad a ser transformadas a células troncales cancerosas por acción del VPH; procediendo a posible tumorigénesis y finalmente al desarrollo de cáncer.

Virus del papiloma humano

El VPH es un virus pequeño, de entre 50 y 55 nm, perteneciente a la familia *papovaviridae*. Este virus contiene un genoma circular de doble hebra de DNA de 8 kilobases (kb), y es un virus no envuelto con una cápside icosaédrica formada por 72 capsómeros, los cuales están compuestos por las dos proteínas estructurales L1 y L2. Estas proteínas le confieren tropismo por células del epitelio de piel y mucosas; así mismo le dan especificidad entre especies, pues se conoce que además de virus humanos, también existen algunos que infectan gatos, conejos y primates, cabe mencionar que no se han reportado cruce entre especies (Leto, Santos Junior; et al., 2011).

Actualmente, se conoce por completo la secuencia nucleotídica de 150 tipos de VPH, y a razón de análisis bioinformáticos han podido ser identificados y clasificados en 5 géneros: *Alfa-*, *Beta-*, *Gama-*, *Ni-* y *Mi-papilomavirus* (Fig. 3). La mayoría de los incluidos en los géneros *Beta* y *Gama* son capaces de producir infección asintomática sólo en individuos inmunocomprometidos. Algunos virus están tan bien adaptados al hospedero, que pueden completar su ciclo replicativo sin causar ninguna enfermedad aparente, y por tanto no causan una respuesta del sistema inmune. Este es un equilibrio virus-hospedero, que se cree, se ha desarrollado a lo largo de 350 millones de años (Doorbar; et al., 2012).

Los papilomavirus *Alfa* están divididos en cutáneos y mucosales, estos últimos a su vez se subdividen en alto y bajo riesgo. A pesar de la denominación “mucosales”, existen algunos que son capaces de producir lesiones cutáneas especialmente en genitales; sin embargo, no producen ningún tipo de neoplasia.

Cabe destacar la diferencia entre VPH de alto riesgo (VAR) y VPH de bajo riesgo (VBR), éstos últimos son capaces de producir lesiones en piel y mucosas; sin embargo, dichas lesiones llegan a desaparecer con el tiempo. Un ejemplo de VPH de bajo riesgo es los tipos VPH-2 y VPH-57: causantes de verrugas comunes, mientras que las verrugas planas son producidas por los tipos VPH-3 y VPH-10 (Doorbar; et al., 2012). Por otro lado, los VAR tienen la habilidad de persistir en la células hospedera, alterando el metabolismo y llevar a una hiperproliferación de las células basales (Doorbar; et al., 2012).

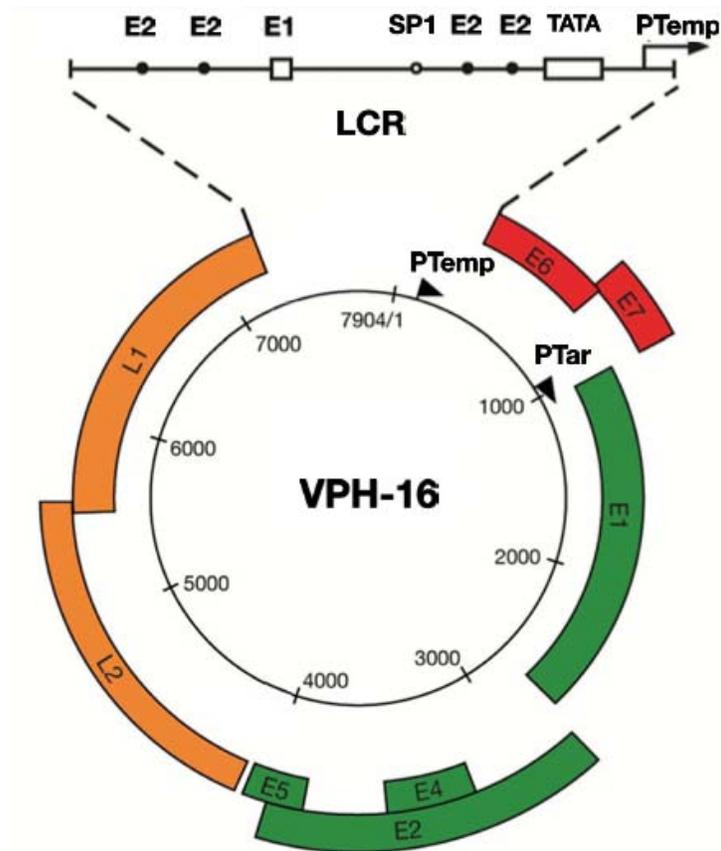
Dicha alteración se debe a la expresión de varios genes virales, entre ellos: E6 y E7 (que más adelante se detallan), los cuales llevan a una acumulación de daños genéticos en la célula hospedadora; además, la integración del genoma viral sucede con una ruptura en el marco de lectura de la proteína E2, la cual es la responsable de controlar la expresión de los genes tempranos. Todos ellos son factores acumulativos para la progresión a cáncer. Un aspecto igualmente importante es la afinidad de unión con la que E6 y E7 se unen a sus proteínas diana, en los VAR se unen fuertemente provocando el efecto deseado: degradación de la proteína; mientras que en los VBR este efecto final puede no llevarse a cabo (Doorbar; et al., 2012).

Retomando a los *Alfa-papilomavirus*, actualmente es el género más estudiado de entre todos los tipos de papilomavirus, debido a que a éste pertenecen los virus ya designados, por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), como carcinogénicos: VPH16, -18, -31, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59 y -66 (Hu, Plafker; et al., 2009). De hecho se ha comprobado la presencia de alguno de estos virus en 96.6% de muestras de pacientes con CaCU (Kose y Naki, 2014); con mayor frecuencia detectados los tipos VPH-16 y VPH-18 (Graham, 2010). De hecho, el VPH-16 mantiene una prevalencia del 36.3% en adenocarci-

noma y 59.3% en carcinoma. Por otro lado, VPH-18 se ha encontrado en más casos de adenocarcinoma: 36.8%, pero con tan sólo el 13.2% en carcinomas (Tornesello; et al., 2013). Por lo anterior, no debe sorprender la razón del estudio tan escrupuloso de VPH-16 y por ende, electo para casi todo modelo de estudio.

Ahora bien, la infección por VPH-16 puede asociarse clínicamente a cambios en la morfología epitelial que sugieren hiperproliferación. En muchas mujeres, la respuesta inmune se establece una vez que se tiene contacto con el virus, y después de un periodo de meses o años resulta una adecuada eliminación de éste; sin embargo, la infección persistente y las características *per se* del virus (alto riesgo) son factores determinantes para la progresión a cáncer. No obstante, se considera que la carcinogénesis es un evento raro y que depende de muchos factores (Doorbar; et al., 2012).

El genoma del VPH-16, como se mencionó con anterioridad, es circular (Fig. 4) y lo componen 3 regiones principales (no precisamente en el siguiente orden): *i*) la región no codificante o LCR (por sus siglas en inglés) de 1 kb, que controla la expresión génica; *ii*) la región de 3 kb que da lugar a las proteínas estructurales (L1 y L2), y por último, y quizás la más importante, *iii*) la región de 4 kb, que da lugar a las proteínas que ejercen un papel importante en la replicación viral (E1 y E2) y la transformación celular (E5, E6 y E7) (Rampias, Sasaki; et al., 2014).



Modificada de Doorbar (2012).

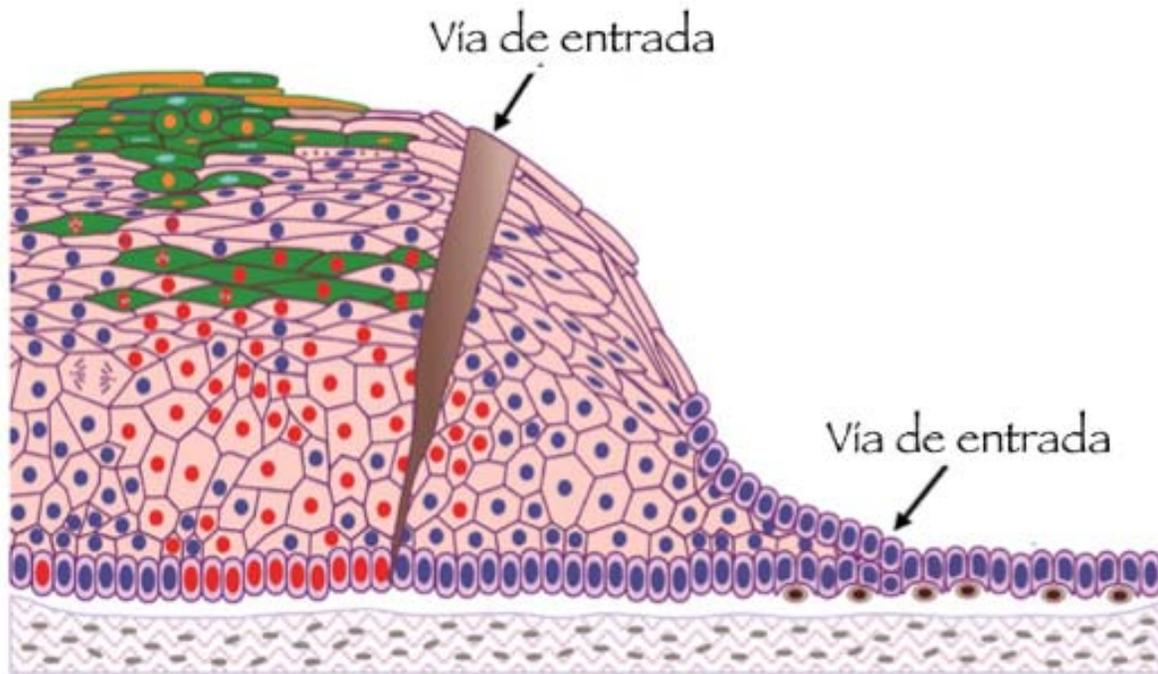
Figura 4. Genoma del VPH-16.

Consta de 8 genes que dan lugar a 8 proteínas del mismo nombre: E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 y L2; así mismo, presenta la LCR que contiene sitios de unión para E2, la principal proteína reguladora de la transcripción; y para SP1, y una caja TATA. También se indican el promotor temprano (PTemp) y el promotor tardío (PTar).

El VPH-16 presenta tropismo por el epitelio escamoso: tanto cutáneo como mucosal. Dicho tropismo es específico a las células de la capa basal (en células troncales más que en células transitoriamente amplificadas), de tal forma que es necesaria de una microlesión para que exista el contacto entre el virus y dichas células (Fig. 5). Se ha propuesto que se requiere la interacción de partículas virales, propiamente las proteínas L1 y L2, con marcadores de super-

ficie de la célula hospedera: proteoglicano heparan sulfato y laminina. Así mismo, cambios en la cápside vírica promueven la unión con receptores secundarios en los queratinocitos, como α_6 -integrina y receptores de factores de crecimiento, que a su vez funcionan como mediadores para la internalización del genoma vírico. En este paso, la proteína L2 forma un complejo con el DNA viral, y asegura su entrada al núcleo (Doorbar; et al., 2012).

Además de la microlesión y/o abrasión en el epitelio escamoso estratificado, se considera como blanco de entrada del virus la unión escamo-columnar (metaplasia). La susceptibilidad de esta zona radica en la accesibilidad y proliferación de las células de reserva, que se encuentran por debajo del epitelio columnar del endocérvix y que eventualmente formarán el epitelio estratificado conforme el cérvix madure (Doorbar; et al., 2012). Adicional a esto, el VPH puede infectar el epitelio glandular del endocérvix resultando en neoplasia glandular y adenocarcinoma (Ault, 2006). Se ha propuesto que la diferencia en los patrones de progresión de cáncer está relacionada al tipo de células infectadas.



Modificada de Doorbar (2012).

Figura 5. Vías de entrada del VPH.

Se muestran las vías de entrada del VPH tanto en el epitelio estratificado como en la zona metaplásica. Las células con núcleo rojo presentan alta amplificación de genoma viral, mientras que las células verdes presentan gran cantidad de la proteína E4, común en la síntesis viral, y la alta síntesis de proteínas estructurales virales se presenta en aquellas con núcleo naranja, y aún más en aquellas células con citoplasma del mismo color.

Componentes del VPH-16

Una vez que la célula es infectada, el DNA viral sólo se presenta en forma episomal (extra-cromosomal) en un bajo número de copias (alrededor de 200 por célula infectada), sin que se produzca virus. Se sabe que E1 y E2 son esenciales en la replicación viral. El aspecto más destacable de E2 es que posee sitios de unión a la LCR, iniciando la replicación. Así mismo, E2 interviene en la segregación del episoma viral durante la mitosis celular. Además es capaz de reclutar a la helicasa dependiente de ATP E1 al sitio del origen de la replicación; este evento explica cómo no es necesario de ciertos factores celulares para que se lleve a cabo la replicación, y demuestra que dicho evento es independiente a la replicación del genoma hospedero (Doorbar; et al., 2012). Posteriormente, un evento crucial para la carcinogénesis es la integración del DNA vírico en el genoma eucarionte, proceso desarrollado en lesiones de alto riesgo asociado a progresión e invasión. Se ha determinado que dicha integración ocurre en sitios frágiles de los cromosomas (Tornesello; et al., 2013).

La proteína E4 se expresa abundantemente durante los periodos tardíos de la replicación viral, y aunque no se tiene claro cual es su papel, se cree que tiene suma importancia en la liberación del virión durante la descamación del epitelio. Las proteínas E6 y E7 promueven la replicación viral mediante la formación de un micro-ambiente adecuado. La proteína E6 se une a la proteína supresora de tumores p53, y eventualmente induce su degradación mediante el sistema ubiquitina/proteosoma. Mientras que E7 promueve la eliminación de otras proteínas supresoras de tumor de la familia pRb (Rampias; et al., 2014), entre ellas p105, p107 y p130; esto lleva a la activación de los factores de transcripción E2F, y la consecuente expresión de genes que dirigen a la fase S del ciclo celular (Moody y Laimins, 2010). Es por ello que la presencia de estas proteínas, como se mencionó anteriormente, promueve la carcinogénesis y principalmente en infecciones persistentes dadas por VAR, debido a la acumulación de aberraciones génicas por la evasión en los *checkpoints* del ciclo celular como consecuencia de la eliminación de las proteínas diana de E6 y E7.

Los genes tardíos L1 y L2 se traducen a proteínas del mismo nombre. La proteína L1 es enviada al núcleo después de su síntesis para el empaquetamiento de la cromatina viral; por otro lado L2 es la proteína de la cápside y a su vez recluta a L1 para que tanto las partículas virales como el genoma del mismo se ensamblen (Rampias; et al., 2014).

Se ha hablado de casi todas las proteínas de VPH-16, sin embargo, se debe destacar el rol de la proteína E5, que es objeto de estudio en este trabajo. La proteína E5 es capaz de amplificar las características oncoprotéicas de E6 y E7; así mismo, puede transformar fibroblastos de ratón. De igual forma, la proteína E5 incrementa la tumorigénesis y el cáncer de piel en ratones transgénicos (Maufort, Williams; et al., 2007), debido a la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) (Greco, Kivi; et al., 2011).

La proteína E5 de VPH-16

El gen *E5* es de aproximadamente de 251 pb, tiene un marco de lectura abierto del nucleótido 3849 al 4100 en el genoma viral (Oelze, Kartenbeck; et al., 1995), y da lugar a una proteína de 83 aminoácidos. La proteína E5 posee un carácter altamente hidrofóbico, por lo que está muy asociada a membranas celulares como: aparato del Golgi, retículo endoplásmico y membrana nuclear. Aún no se entiende claramente el papel de E5 en el ciclo replicativo del virus. Sin embargo, *in vivo* se han encontrado grandes cantidades de mRNA de E5 en algunas verrugas cervicales y en lesiones de bajo grado CIN1, lo que sugiere que su expresión ocurre en estadios tempranos de la infección (Kabsch y Alonso, 2002).

Por lo que se ha sugerido que su transcripción temprana puede llevar a un mejor ambiente replicativo mediante la alteración de ciertos factores y procesos celulares. E5 también altera el arreglo del citoesqueleto de actina inhibiendo la endocitosis y ciertas vías de señalización, especialmente la del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Kabsch; et al., 2002); activa la

vía de las MAP-quinasas mediante el incremento del EGFR y su fosforilación, debido a que E5 inhibe una bomba de protones del endosoma, la cual se encarga de la degradación del receptor, resultando en un aumento en el reciclaje del mismo a la membrana; además, inhibe la funcionalidad de c-Cbl, una ubiquitin ligasa, lo que resulta en incumplimiento de la degradación del EGFR (Maufort; et al., 2007).

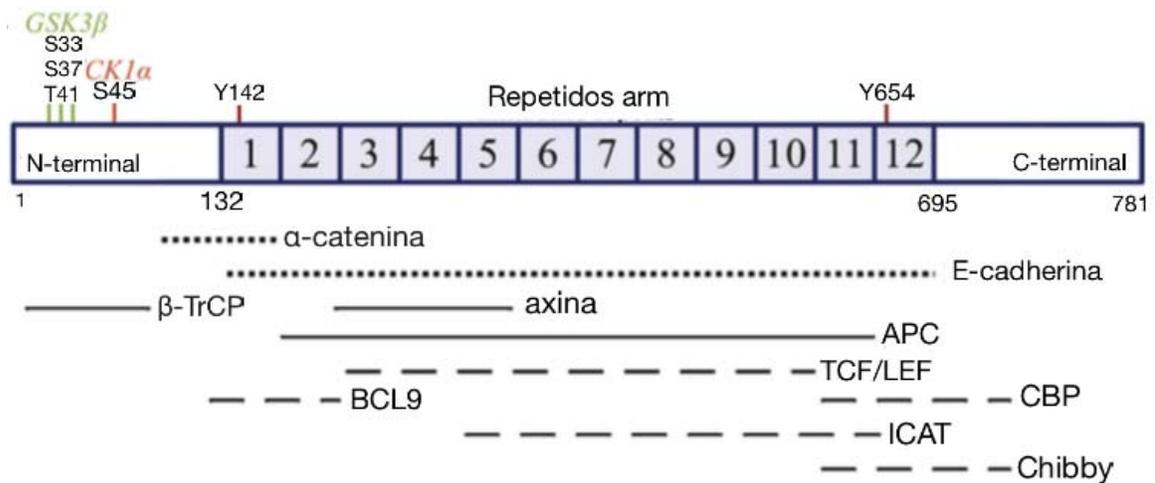
Así mismo, la expresión de E5 en queratinocitos humanos previene la muerte celular provocada por estrés promovida por radiación UV; en adición, esta proteína viral actúa sobre la formación del complejo de señalización de inducción a muerte (DISC, por sus siglas en inglés), inhibiendo la apoptosis extrínseca promovida por FasL (Kabsch; et al., 2002). E5 también afecta la comunicación intercelular de las uniones gap de células HaCaT (Oelze; et al., 1995), e inhibe la maduración del complejo MHC-II (complejo principal de histocompatibilidad de clase II), evitando la presentación de antígenos (Zhang, Li; et al., 2003). En las mismas células HaCaT, E5 puede formar células binucleadas mediante fusión celular, dicho evento se ha propuesto también como iniciador de la carcinogénesis (Hu; et al., 2009).

La proteína β -catenina

La β -catenina es una proteína de 94 kDa que contiene 12 repetidos de armadillo, llamados dominio arm, cada uno con 42 aminoácidos (a.a.) repetidos (Fagotto, 2013), el cual interactúa con el citoesqueleto de actina, α -catenina, E-cadherina, complejos transcripcionales (LEF, TCF, ICAT y Chibby) y el complejo de degradación; además, la caracteriza un dominio de transactivación en su región carboxilo terminal y un dominio de 140 a.a. en su amino terminal donde posee sitios de unión a proteínas cinasas (APC y GSK-3) (Fig. 6) (Jamieson, Sharma; et al., 2014). El gen que codifica a β -catenina es *CTNNB1*, constituido por 16 exones y 15 intrones, posee un tamaño de 23.2 kb y se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 3 y abarca la región p22 - p21.3 (Nollet, Berx; et al., 1996).

La β -catenina participa en las uniones intercelulares adherentes de la membrana citoplasmática formando un complejo junto con α -catenina y E-cadherina con unión al citoesqueleto de actina. Esta función está regulada por la fosforilación de β -catenina en Tyr142, la cual disminuye la afinidad entre β -catenina y α -catenina. Además, la fosforilación en Tyr654 (misma que también aumenta la afinidad por TCF) por c-Src altera la unión con E-cadherina; ambas fosforilaciones resultan en la desagregación del complejo β -catenina, α -catenina, E-cadherina y actina. Cuando no está participando en las uniones adherentes, β -catenina es capaz de pasar al citoplasma en forma libre y translocarse al núcleo para participar como factor de transcripción (Rosenbluh, Wang; et al., 2014).

En ausencia de un estímulo adecuado (por ejemplo, las proteínas Wnt) la β -catenina es constitutivamente marcada para su degradación por un complejo formado por la cinasa glucógeno sintasa 3 (GSK-3), la caseína cinasa 1 (CK1), la proteína axina, la proteína poliposis adenomatosa coli (APC) y la ubiquitin ligasa E3 (β -TrCP) (Stamos y Weis, 2013); de tal forma que es fosforilada, ubiquitinada y posteriormente sufre degradación proteosomal (Polakis, 2012). Por otro lado, cuando existe una mutación en cualquiera de los componentes del complejo antes mencionado, la β -catenina se estabiliza y activa genes indebidamente, produciendo ciertas anomalías como en el caso de cáncer de colon en el que se presenta mutación en APC (Ying, Li; et al., 2008).



Modificada de Jamieson (2014).

Figura 6. Estructura primaria de β -catenina.

Se muestran los 12 repetidos arm y los sitios de unión con sus proteínas blanco, tanto de membrana citoplasmática (línea punteada), de citoplasma (línea continua) y de núcleo (línea discontinua). Cerca del amino terminal ocurre el marcaje para la degradación proteosomal de β -catenina.

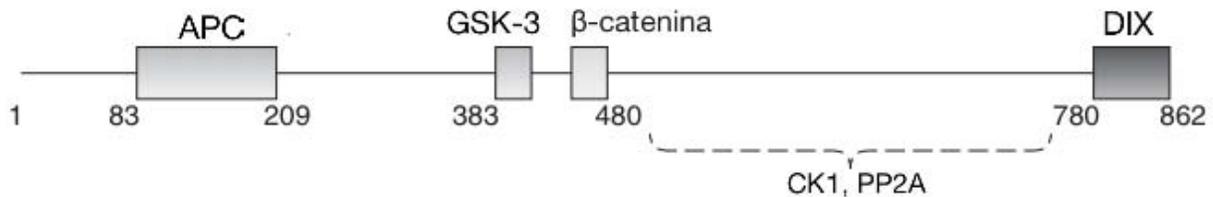
Cabe mencionar ciertas características de las proteínas que se involucran en la regulación de la actividad de β -catenina. La proteína CK1 puede presentar varias isoformas como: α , γ , δ y ϵ . La γ que se encuentra anclada en la membrana; δ y ϵ que presentan un carboxilo terminal autofosforilable, cuya función es de autoinhibición. Las isoformas citoplasmáticas, que pueden unirse a axina y fosforilar a β -catenina en el sitio diana son: la α , δ y ϵ . Actualmente, se ha determinado que CK1 α es la principal responsable de la fosforilación de β -catenina (Stamos; et al., 2013).

Por otro lado, GSK-3 se expresa de dos diferentes isoformas GSK-3 α y GSK-3 β , cuya diferencia radica en el amino terminal de GSK-3 α rico en glicina. Ambas proteínas tienen acción sobre β -catenina; sin embargo, se ha dado más énfasis hacia GSK-3 β en CaCU (Abbo, Vincek; et al., 2007). La fosforilación en residuos de tirosina (Tyr279 para α y Tyr216 para β)

incrementa su actividad cinasa, mientras que en sitios conservados cerca del amino terminal, específicamente en Ser21 de GSK-3 α y Ser9 (además Thr390) de GSK-3 β , regulan su funcionalidad de forma negativa, inhibiendo su actividad cinasa (Stamos; et al., 2013).

Otra proteína que también forma parte del complejo de destrucción de β -catenina es la proteína axina. La cual posee sitios de unión diferentes tanto para β -catenina como para el resto del complejo proteico: CK1 y GSK-3 β . Mediante estudios en carcinoma hepatocelular, se comprobó que la activación inadecuada de β -catenina era ocasionada por la alteración en la eliminación de la catenina por mutaciones en axina (Satoh, Daigo; et al., 2000). Axina interactúa con APC mediante un dominio RGS cercano al amino terminal, para posteriormente atraer a ambas cinasas para que realicen sus actividad con β -catenina (Polakis, 2012).

El carboxilo terminal de axina, que tiene unión con β -catenina y GSK-3, también se une al dominio catalítico de PP2A (fosfoproteína fosfatasa 2A). La simultánea unión de axina con esta cinasa y β -catenina mejora la eficiencia de la fosforilación hacia la catenina. Por otro lado, se ha demostrado que axina no interfiere con la actividad intrínseca de las cinasas GSK-3 ni CK1 (Sobrado, Jedlicki; et al., 2005). Más alejado, en el carboxilo terminal de axina se encuentra un dominio DIX, el cual forma un complejo con Dishevelled, unión crucial para desestabilizar la proteína β -catenina (Fig. 7) (Stamos; et al., 2013).



Modificada de Stamos (2013).

Figura 7. Estructura primaria de axina.

Se muestran las estructuras clave de interacción con otras proteínas: β -catenina, APC, GSK-3 y DIX (dominio en común con Dishevelled), además las líneas discontinuas muestran la unión para CK1 y PP2A.

La proteína APC, de igual forma perteneciente al complejo de destrucción de β -catenina, tiene un peso molecular de 310 kDa, y presenta una región *motif* de unión a β -catenina y a axina; además, contiene en su región amino terminal un dominio de dimerización y un dominio de repetidos de armadillo (arm), a través del cual, APC se une a PP2A (específicamente a la subunidad B56) (Seeling, Miller; et al., 1999). PP2A se ha propuesto que es capaz de regular la fosforilación de APC, es decir, defosforila a APC (Stamos; et al., 2013).

Los sitios de unión de APC hacia β -catenina contienen repetidos de 15 a 20 a.a.. En el humano se han detallado 4 repetidos de 15 a.a. y 7 repetidos de 20 a.a.; éstos pueden ser fosforilados por GSK-3 y CK1 para aumentar su afinidad por β -catenina. Por otro lado, las uniones de APC con axina son secuencias de aproximadamente 16 a.a. denominadas repetidos SAMP, los cuales varían en número según isoforma y especie (Fig. 8). Se ha determinado que al menos se necesita un repetido SAMP con dos sitios de unión para β -catenina para la correcta degradación de ésta última (Stamos; et al., 2013).



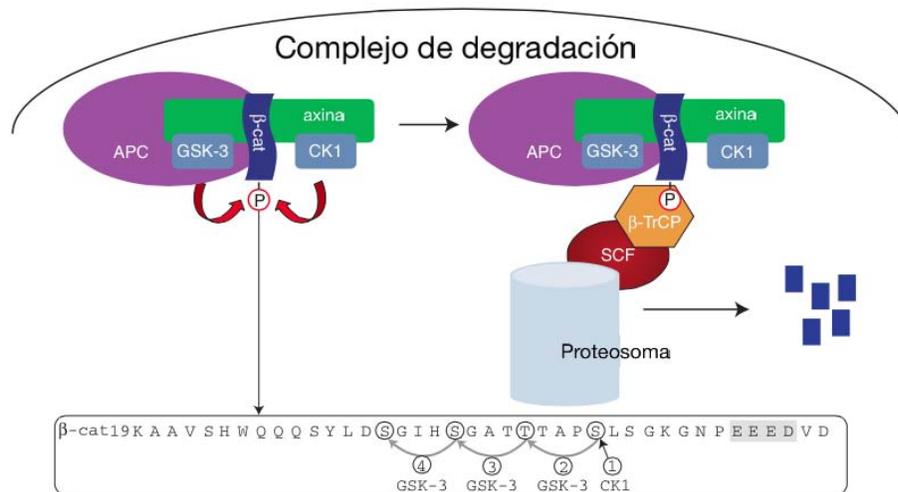
Modificada de Stamos (2013).

Figura 8. Estructura primaria de APC.

Se muestran los repetidos SAMP, el dominio arm, 4 repetidos de 15 a.a (A-D), y 7 repetidos de 20 a.a. (1-7).

Todo el conjunto de proteínas, anteriormente descrito, trabajan en concomitancia para llevar a cabo al marcaje de β -catenina, es decir, su fosforilación en sitios específicos, y con esto dar pie a su degradación proteosomal. Posterior a la fosforilación, la ubiquitinación de β -catenina es promovida y mediada por la presencia del repetido 2 de 20 a.a. (20R2) y una secuencia seguida de ésta denominada dominio inhibitorio de catenina (CID, por sus siglas en inglés) en APC (Stamos; et al., 2013). Su; et al. (2008) determinaron que esta región (20R2-CID) de APC interacciona con β -TrCP para la ubiquitinación eficiente de β -catenina.

El elemento primordial para la ubiquitinación de β -catenina es la presencia de 2 aminoácidos conservados: Ser33 y Ser37 en β -catenina, los cuales interaccionan con un dominio F-box presente en la ubiquitin ligasa β -TrCP (Fig. 9). Esta ubiquitin ligasa forma un complejo con Skp1 y cullin denominado SCF, el cual une la ubiquitina a la proteína β -catenina. Precisamente, GSK-3 reconoce los mismos aminoácidos de β -catenina (además de fosforilar Thr41), de tal forma que los fosforila previamente para generar el sitio de reconocimiento de β -TrCP (CK1 actúa previamente a GSK-3 sobre Ser45) (Stamos; et al., 2013).



Modificada de Jamieson (2014).

Figura 9. Complejo de degradación de β -catenina.

Se muestran los componentes del complejo, así como los sitios de fosforilación en la cadena polipeptídica de β -catenina por acción de GSK-3 y CK1.

Ahora bien, cuando existe un estímulo que evite la degradación de β -catenina, o no exista alguna razón para su degradación, dicha proteína es capaz de translocarse al núcleo sin necesidad de proteínas “acarreadoras”. La proteína β -catenina no posee un mecanismo de transporte que la conduzca a través del poro nuclear, es decir, no presenta señales de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) ni señales de exportación nuclear (NES, por sus siglas en inglés). Por tanto, se cree que la entrada de β -catenina hacía el núcleo es independiente de importinas y exportinas; de hecho, la transición se lleva a cabo mediante la interacción directa entre sus repetidos arm 10-12 con múltiples proteínas nucleoporinas (Nups, por sus siglas en inglés) del complejo del poro nuclear (NPC, por sus siglas en inglés) (Jamieson; et al., 2014).

De tal forma que la ubicación de β -catenina a través de la célula depende fuertemente de la localización de otras proteínas a las cuales esté unida, siendo la expresión y la afinidad factores muy determinantes. Es así que puede observarse acumulación de β -catenina tanto en núcleo como en citoplasma. Para ejemplificar esto, Ha, et al. (2004) han propuesto un esquema dinámico por el cual β -catenina puede quedar acumulada en citoplasma: la unión de axina con APC fomenta la fosforilación de ésta última, y con esto aumenta su afinidad por β -catenina, de tal forma que previene la translocación de ésta hacia el núcleo y la retiene en citoplasma si no existe señalización de Wnt y la concentración de β -catenina es baja. Henderson, et al. (2002), por otro lado, proponen que a pesar de que β -catenina puede asociarse con varias proteínas en el núcleo, LEF-1 es la proteína de unión predominante a la catenina y más importante aún, compete con APC (no fosforilada) y E-cadherina para mantenerla en este sitio celular.

Hasta ahora se ha hablado de un conjunto de proteínas que actúan y regulan en varias formas a β -catenina, y no debe sorprender la razón de tanto control, ya que esta proteína tiene un papel importante en la proliferación, diferenciación y migración, tanto de células embrionarias como adultas mediante la vía de señalización de Wnt (Fathke, Wilson; et al., 2006). La vía de señalización Wnt, comienza con unos ligandos conformados por la familia Wnt, que son proteínas glicosiladas que actúan a través de las vías canónica y no canónica. La vía canónica, la más estudiada, consiste en la cascada de β -catenina. Mientras que la vía de polaridad celular plana (PCP) y la vía Wnt/ Ca^{2+} corresponden a la no canónica y son independientes de β -catenina (Abu-Baker, Laganier; et al., 2013).

La vía canónica de Wnt

Cuando se habla de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, se cree que está únicamente relacionada con el desarrollo embrionario, sin embargo, también juega un papel importante en el mantenimiento de células troncales, la regeneración del tejido y más importante aún, la reparación de tejido dañado. Debido a su papel en el desarrollo y la homeostasis del tejido, esta vía juega un rol importante cuando se habla de la desregulación en la señalización, ya que está involucrada en ciertas patologías. Por ejemplo, en algunos tipos de cáncer se ha determinado una activación constitutiva de β -catenina (Cadigan, 2008).

En la familia Wnt se ha encontrado una secuencia de veintiún cisteínas (no continuas) altamente conservadas; lo que da a entender que estas proteínas se han mantenido a través de la evolución, de hecho se conocen catorce genes en *Drosophila*, cinco en *Caenorhabditis elegans* y diecinueve en ratones y humanos (Cadigan, 2008). Los ligandos Wnt son proteínas de secreción que durante su proceso de biosíntesis son glucosiladas en el retículo endoplásmico.

Aunado a este cambio post-traducciona, también se produce la palmitoilación en la primera cisteína de la cadena conservada, y en serina de algunos Wnt. La ausencia de ciertos pasos en la biosíntesis y la palmitoilación conlleva a que la proteína sea disfuncional. Por otro lado, la existencia de una mutación en la acetiltransferasa localizada en la membrana del retículo endoplásmico, codificada por el gen *porcupine* (*porc*), bloquea la secreción de Wnt (Cadigan, 2008).

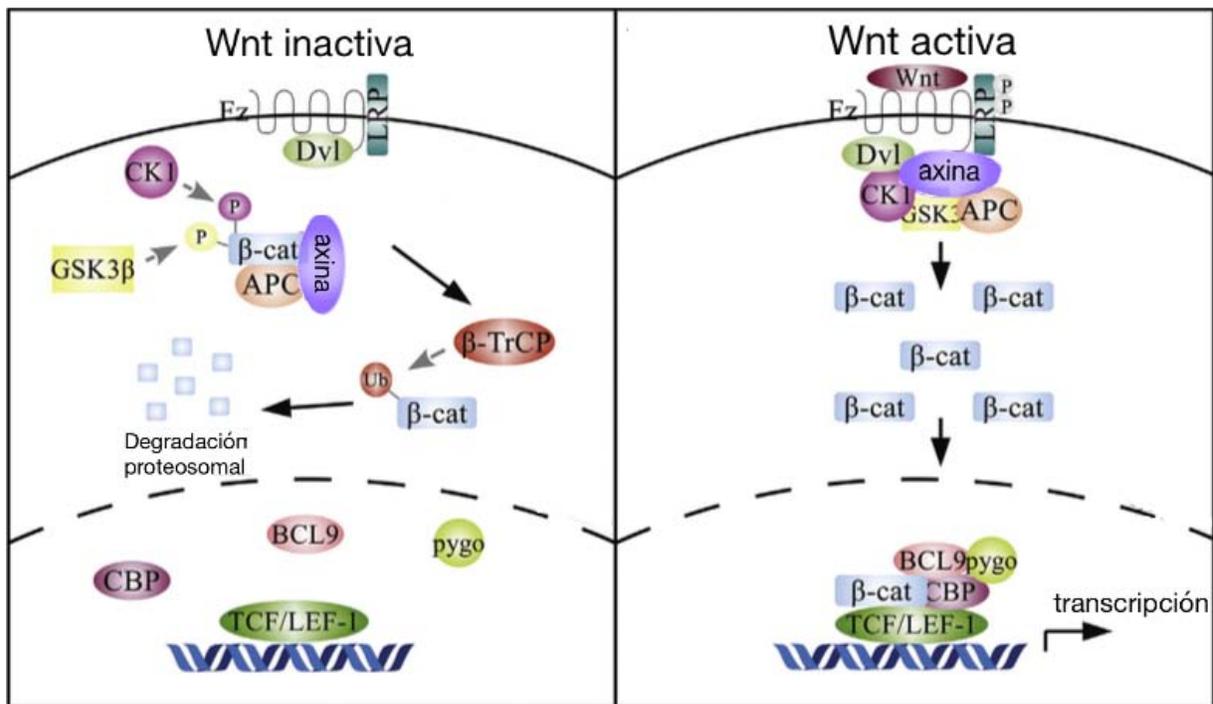
Para el proceso de excreción celular de Wnt se requiere además, de una proteína membranal denominada Wntless (Wls), la cual se localiza en el aparato de Golgi, la superficie celular y los endosomas. Esta proteína es capaz de asociarse a Wnt, lo que sugiere una función de guía desde el Golgi hasta la membrana citoplasmática. Wls es reciclada por un complejo, que si tiene alguna alteración en su secuencia de aminoácidos en alguna subunidad, se refleja en la disminución de Wls y por tanto en la señalización de Wnt. El aspecto fundamental de la vía de Wnt es la estabilización de β -catenina, cuyos niveles altos de la proteína promueven la transcripción génica. Sin embargo, la degradación constitutiva de β -catenina se lleva a cabo por un

mecanismo doble: la fosforilación y la degradación ubiquitina proteosoma, como ya se ha mencionado, evitando la acumulación innecesaria de β -catenina en el núcleo (Cadigan, 2008).

Los receptores Frizzleds (Fzs), a los cuales se unen las proteínas Wnt, son miembros de una gran familia de proteínas transmembranales acoplados a proteína G que median una amplia variedad de eventos de señalización. Los co-receptores lipoproteicos LRP5 y LRP6 participan junto con Fzs en la asociación de Wnt para que se lleve a cabo la activación del receptor y con ello la señalización. El evento subsecuente a la unión de Wnt con su receptor, es la fosforilación de LRP6 en una secuencia PPPS/TP de su parte citoplasmática. Esta fosforilación se lleva a cabo por CK1 y GSK-3, mismas cinasas que actúan en la degradación de la catenina; es decir, regulan tanto positiva (LRP6) como negativamente (β -catenina) en la vía de señalización Wnt. La fosforilación de LRP requiere al receptor Fz, el cual está unido por proteínas de dominios PDZ llamadas Dvls (dishevelleds). Las proteínas Dvls promueven la fosforilación del LRP para reclutar a axina, de tal manera que se compromete la actividad del complejo de fosforilación de β -catenina, además GSK-3 es secuestrado dentro de endosomas como efecto del estímulo de Wnt. Todo esto permite la estabilización y acumulación de β -catenina en el citoplasma (Taelman, Dobrowolski; et al., 2010). Justo después, β -catenina se transloca al núcleo, pasando a través del complejo del poro nuclear (Fig. 10), y a pesar de que es una propiedad intrínseca de la proteína, existen diversos factores que influyen en el importe y exporte de la misma, como ya se ha redactado con anterioridad.

Una vez en el núcleo, β -catenina se une a sitios específicos en la cadena de DNA por acción de ciertas proteínas como: Foxo, PitX2, SOX9 y SOX17; pero en la mayoría de los casos por reclutamiento de las proteínas de la familia TCF y LEF (Polakis, 2000). La interacción de β -catenina con TCF es crucial para la activación de los genes diana. Sin embargo, la activación inapropiada por niveles bajos de β -catenina también es crítica, por lo que la existencia de “buffers” en el núcleo son esenciales para este proceso; factores como ICAT, Chibby, Sox9 y CtBP-APC compiten con TCF por la unión con β -catenina, mientras que miembros de la familia TLE/Gro lo hacen hacia TCF, por lo que una vez que β -catenina ha alcanzado niveles

suficientes, TCF se libera de su represor. Además, β -catenina tiene sitios de unión de co-factores como BCL9 (linfoma de células B 9) y CBP (proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc) que, así como colaboran en la transcripción de los genes Wnt, también definen cuales genes serán traducidos (Jamieson; et al., 2014). Cabe mencionar que la vía de señalización Wnt también regula negativamente la expresión de ciertos genes, sin embargo este rol de β -catenina aún no está bien estudiado (Cadigan, 2008).



Modificada de Jamieson (2014).

Figura 10. La vía Wnt.

La eliminación de β -catenina mantiene apagada la transcripción génica (izquierda), mientras que su activación mantiene niveles altos de β -catenina permitiendo su entrada al núcleo (derecha).

La proteína β -catenina en cáncer

Como se mencionó anteriormente, β -catenina juega un rol importante como factor de transcripción para regular la homeostasis del tejido, dado que si se ve constitutivamente activa puede promover la generación de cáncer, de tal forma que no basta con conocer las causas de su acumulación en citoplasma sino también qué sucede más allá al momento de translocarse hacia el núcleo. El transporte a través de la membrana nuclear de proteínas mayores a 40 kDa se lleva activamente mediante importinas y exportinas, por lo que defectos en estas vías pueden producir una mala ubicación de dichas proteínas y producir anomalías ligadas al cáncer: por mencionar algunas BRCA1, APC, p53, entre otras (Jamieson; et al., 2014).

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, β -catenina no se rige por estos mecanismos, por lo que resulta aún más importante determinar las causas por las que la β -catenina abandona la membrana citoplasmática y llega a activarse en núcleo, dicha acción está muy correlacionada a neoplasias. De tal forma que la proteína β -catenina también tiene un papel determinante en el cáncer, de manera general se ha afirmado que inhibir la vía Wnt previene el crecimiento y sobrevivencia del tumor (Polakis, 2000). En células HT29 (adenocarcinoma colorectal) se encuentra mutado APC; experimentalmente con la expresión de APC *wild-type* se obtiene como resultado una disminución del crecimiento celular debido a apoptosis celular. Además, al eliminar el amino terminal de TCF-4, que es sitio de unión para β -catenina, la expresión génica se vio alterada resultando en arresto celular (Polakis, 2012).

Al considerar el papel que tiene β -catenina en la vía Wnt y su correlación con cáncer, se ha propuesto como objeto de estudio para nuevos tratamientos. En las CTC se ha observado una actividad alta de Wnt, y que al eliminar efectivamente a β -catenina se presenta una regresión del tumor epidermal. A pesar de que esto fue descrito en un modelo murino, también se ha observado alta actividad de Wnt en carcinomas de células escamosas de humanos (Polakis, 2012). Gottardi, et al. (2001) lograron inhibir el crecimiento celular de células cancerosas de colon SW480 mediante cadherinas quiméricas, aprovechando el mismo sitio de unión que posee β -catenina con E-cadherina y el factor de transcripción TCF. Así mismo Green, et al.

(2001) inhibieron la expresión de β -catenina con oligonucleotidos antisentido en ensayos *in vitro* e *in vivo* utilizando células de cáncer de colon. Sin embargo, se propuso que dicha eliminación podía afectar al complejo en el que β -catenina interviene para formar las uniones adherentes; de tal forma que Cong, et al. (2003) lograron degradar la β -catenina libre, modificando únicamente la vía de señalización de Wnt y no aquella que participa en las uniones intercelulares. De esta forma las células perdieron su potencial tumorigénico dado únicamente por la expresión génica y no por la adhesión celular.

Alteraciones de β -catenina por E5 de VPH-16

La causa del cáncer, hoy en día se describe como multifactorial, sin embargo, el hecho de poder señalar una molécula como causa probable de éste aumenta la posibilidad de mejorar el tratamiento. En displasias cervicales, se ha demostrado que las proteínas E-cadherina, N-cadherina y β -catenina se expresan a través de todo el epitelio, mientras que en tejido normal su expresión está restringida a las capas más basales del epitelio. Además, en carcinogénesis, disminuye E-cadherina y por tanto, el complejo E-cadherina y β -catenina de las uniones adherentes, suponiendo una abundancia de la forma libre de β -catenina en citoplasma (Polakis, 2012). Actualmente se sabe que la activación de la vía Wnt acelera y promueve el desarrollo de carcinoma cervical mediado por E7 de VPH-16 en un 94% (15/16) en ratones transgénicos (Bulut, Fallen; et al., 2011).

Aunque no se ha descrito muy bien el mecanismo de activación de la vía Wnt, se cree que β -catenina podría estar involucrada. Por otro lado, se ha observado que E5 puede alterar la expresión de varios genes implicados en la motilidad y adhesión celulares en queratinocitos humanos; se ha observado que la expresión de N-cadherina, E-cadherina y β -catenina, se aumenta después de la inducción de la expresión de E5 de VPH-16 (Greco; et al., 2011).

De ahí un punto importante para discernir la causa de la activación de Wnt, ya sea que la presencia de la proteína E5 de VPH-16 active de alguna forma a β -catenina o mediante otro mecanismo.

Células HaCaT como modelo de estudio

La aplicación de métodos y técnicas específicas y consistentes en el estudio de la biología y de toda ciencia básica resulta fundamental. De igual forma, es sustancialmente importante la selección y el correcto uso de modelos que sean lo más parecido al sistema en cuestión para obtener un resultado confiable a lo que *in vivo* quiere demostrarse u obtenerse. Es así que en este trabajo se utilizó una línea celular de queratinocitos humanos denominadas HaCaT.

Las células HaCaT son queratinocitos humanos obtenidos a partir de un cultivo primario de piel de adulto, transformados *in vitro*. Son células inmortalizadas (>140 pases celulares) que, aunque presentan alteraciones cromosómicas tienen algunos marcadores estables; además es una línea celular no tumorigénica. La característica más destacable de las células HaCaT es su capacidad de diferenciación, la cual no se ve alterada, de ahí su importancia en este proyecto. Su nombre se debe a que fueron obtenidas de humano adulto (Ha) en bajas concentraciones de Ca^{2+} (Ca) y altas temperaturas (38.5° C) (T) (Boukamp, Petrussevska; et al., 1988).

Además del uso de las células HaCaT, en este trabajo también se destaca la aplicación de técnicas como inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunodetección en fase sólida (Western Blot) y la separación de células por activación fluorescente (FACS). La IFI se basa en el uso de anticuerpos unidos o marcada con un fluoróforo para evidenciar la presencia de la proteína en cuestión en células vivas o previamente fijadas. El aspecto importante de esta técnica es que dicho anticuerpo no se une directamente a la proteína blanco sino que lo hace mediante un anticuerpo intermediario o primario, de tal forma que el anticuerpo marcado se denomina secundario. Una de las ventajas de la IFI es que el anticuerpo secundario es capaz de amplificar la señal para evidenciar con facilidad la presencia de la proteína señalada.

A diferencia de la técnica anterior, en la inmunodetección en fase sólida existe una lisis celular para exponer las proteínas celulares de tal forma que puedan ser separadas por peso molecular en un gel de poliacrilamida y posteriormente plasmadas en membranas de nitrocelulosa, todo

mediante el uso de campos eléctricos aplicados a las mismas. Aquí no se utiliza fluorescencia para evidenciar a la proteína en cuestión sino quimioluminiscencia.

Por último, en la técnica de FACS se basa en la separación de células, considerando las características presentadas por dicha célula (que previamente ha sido marcada con fluoroforos -anticuerpos-) derivada de la excitación por un láser, de tal forma que puedan ser separadas por citometría de flujo.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta prevalencia del VPH-16 se ha propuesto la búsqueda de alternativas para el tratamiento del cáncer cervical. Se sabe que en diferentes tipos de cáncer la vía de señalización de Wnt se ve alterada, siendo ésta una de las principales rutas que controlan la proliferación y la diferenciación celular, dos procesos que están en absoluta concomitancia con el desarrollo del cáncer cervical. La proteína β -catenina tiene un papel fundamental en dicha vía de señalización, por lo que es importante determinar si esta proteína se ve afectada en los queratinocitos debido a la presencia del gen *E5* de VPH-16, cuyo producto proteico tiene un papel importante durante las etapas del desarrollo del cáncer cervical. Además, ya que se ha propuesto que las células troncales son la célula blanco para la infección del VPH, resulta interesante conocer el estado de la proteína β -catenina en estas células.

HIPÓTESIS

La proteína β -catenina se encontrará alterada en los queratinocitos humanos por la expresión del gen *E5* de VPH-16. Resultando en un aumento cuantificable de la β -catenina y en un cambio en su localización basal, de permanecer en la membrana citoplasmática a encontrarse en el núcleo, fungiendo como factor de transcripción que conlleva a la proliferación y diferenciación celular.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar los efectos del gen E5 de VPH-16 sobre la localización y la abundancia de la proteína β -catenina en la línea celular inmortalizada de queratinocitos humanos HaCaT.

Objetivos particulares

1. Analizar la localización de la proteína β -catenina en células HaCaT-E5 y HaCaT-LacZ α a diferentes tiempos de expresión del transgén E5 y LacZ α .
2. Determinar la abundancia de la proteína β -catenina en células HaCaT-E5 y HaCaT-LacZ α a diferentes tiempos de expresión del transgén correspondiente.
3. Evaluar la localización de la proteína β -catenina por inmunofluorescencia indirecta en las células con características de troncales (subpoblación α 6-integrina^{bri}CD71^{dim}) de los queratinocitos humanos HaCaT.

METODOLOGÍA

Cultivo celular

Las células HaCaT se mantuvieron en medio DMEM, suplementado (ver anexo) con L-glutamina, piruvato, penicilina-estreptomocina y 10 % de suero fetal bovino (SFB), a 37° C con una atmósfera al 5 % de CO₂. Se utilizaron sistemas lentivirales para la transducción del transgén de interés: E5 (HaCaT-E5) y LacZ α (HaCaT-LacZ α), este último como control de infección.

Además, estos sistemas lentivirales contenían un gen que confería resistencia a la puromicina, por lo que se adicionaron 0.35 μ g de puromicina por mL de medio de cultivo suplementado 48 horas después de la infección, para la selección de las células transducidas exitosamente. En cada ensayo se trabajaron cuando alcanzaron una confluencia del 80%, a los 9, 12 y 15 días posteriores a la infección (dpi), para inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunodetección en fase sólida.

Exposición a cloruro de litio

Las células se sembraron en placas de 6 pozos sobre cubreobjetos (las células se adhieren a los cubreobjetos para hacer con mayor facilidad las laminillas de lectura al microscopio) limpios y estériles, se mantuvieron en las condiciones de cultivo previamente descritas y se les adicionó cloruro de litio (LiCl) para una concentración final de 10, 20, 30 y 40 mM durante 48 horas; y por otro lado a 10 y 20 mM por 138 horas. Posteriormente, estas células se fijaron y se tiñeron por IFI como se describe más adelante.

Inmunofluorescencia indirecta

Para determinar la localización de β -catenina se realizó lo siguiente: 48 horas antes de que se cumplieran los 9, 12 y 15 dpi con E5 y LacZ α , las células se sembraron en placas de 6 pozos sobre cubreobjetos limpios y estériles en las condiciones de cultivo descritas previamente. A partir de este punto, las células expuestas a LiCl se procesaron bajo el mismo procedimiento, a

excepción de la confluencia que no se tomó en cuenta debido a la diferencia proliferativa. Las células al 80% de confluencia se lavaron con buffer salino de fosfatos (PBS) a 37°C y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS (atemperado a 37°C) por media hora a temperatura ambiente, después de este tiempo se lavaron dos veces con PBS con agitación constante por 5 minutos. Enseguida, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.25% en PBS por media hora y se lavaron 3 veces con PBS en agitación durante 5 minutos.

Para evitar la unión inespecífica o aleatoria del anticuerpo, las células se bloquearon con suero de cerdo al 3% en PBS por 2 horas. Posteriormente, se les adicionó un anticuerpo primario hecho en conejo anti β -catenina (ver anexo) en una dilución 1:50, o un anticuerpo del mismo isotipo como control, a una concentración equivalente a la dilución 1:50 del anticuerpo anterior, éstos se incubaron a 4°C durante toda la noche.

Cumplido el tiempo, se realizaron 3 lavados para retirar los anticuerpos que no se hubieran unido con PBS/Tween 20 al 0.1 % en agitación constante durante 10 minutos. Se agregó un anticuerpo secundario contra IgG de conejo acoplado a FITC (ver anexo) en una dilución de 1:200, éste se incubó a temperatura ambiente por 2 horas cubierto de la luz. Seguido, se lavó tres veces con PBS/Tween 20 al 0.2% en agitación constante por 15 minutos. Posteriormente, se contratiñeron los núcleos utilizando yoduro de propidio (IP) a una concentración de 1 μ g/mL por 6 minutos a temperatura ambiente. Las observaciones se realizaron en microscopio confocal Leica para determinar la localización de β -catenina.

Inmunodetección en fase sólida

De igual forma, se consideraron los días post-infección ya establecidos y se realizó la lisis celular de HaCaT-E5 y HaCaT-LacZ α , todos y cada uno por triplicado. A la monocapa celular se le adicionaron 200 μ L de buffer RIPA-Bolen enriquecido con inhibidor de proteasas “*Complete*” a una concentración de 30 μ L por cada mL de buffer. La monocapa celular se incubó con el buffer de lisis por 5 minutos en hielo y posteriormente se hizo un raspado con un gendarme. El extracto de proteínas se recolectó en un tubo para microcentrifuga para ser sonificado aplicando 3 ciclos de 3 a 5 pulsos de 20 segundos cada uno, reposando 1 minuto entre

cada ciclo; utilizando los siguientes parámetros en el sonicador: “*duty cycle*” del 20% y “*output control*” en nivel 2. Posteriormente, la concentración de proteínas se cuantificó en cada muestra por el método de Lowry modificado con el Kit DC “*Protein Assay*” de Bio-Rad de acuerdo a una curva estándar de albúmina sérica bovina (tabla 2). Así mismo, las cargas proteicas se normalizaron tiñendo geles de poliacrilamida con azul de Coomasie y mediante un análisis densitométrico.

Tabla 2. Preparación de muestras para obtener la curva patrón.

Tubo	Stock albúmina sérica bovina [100 mg/mL] (μL)	Buffer RIPA-Bolen (μL)	Concentración final [mg/mL]
0	0	100	0
1	2	98	2
2	4	96	4
3	6	94	6
4	8	92	8
5	10	90	10

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), las muestras proteicas se diluyeron 1:2 con buffer de carga de Laemmli (adicionado con β-mercaptoetanol) y se dejaron en ebullición por 3 minutos. La misma cantidad de proteínas (30 μg) de cada muestra se cargó en un gel de poliacrilamida-bisacrilamida (30:1) al 8% y se migraron electroforéticamente en buffer de corrida a 25 mA constantes por noventa minutos aproximadamente. Posteriormente, el gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa se introdujeron en buffer de transferencia por 30 minutos en agitación constante, e inmediatamente después se realizó la electrotransferencia del gel a la membrana a 90 volts constantes por hora y media, cuidando de mantener la temperatura del sistema a 4° C.

Para corroborar la transferencia proteica a la membrana, ésta se tiñó con una solución de rojo de Ponceau, y que eventualmente, se retiró completamente mediante lavados con PBS y agua bidestilada. La membrana se bloqueó con leche baja en grasa al 5 % en PBS, por 1 hora, con agitación leve constante. Al término, se retiró la solución de bloqueo y se cortó la membrana por la mitad. La mitad superior se incubó con el anticuerpo primario anti β -catenina (1:2,500) y la mitad inferior con un anticuerpo contra anti-actina (ver anexo) (1:1,500) durante toda la noche a 4° C, con agitación constante.

Posteriormente, se lavaron las membranas 3 veces con PBS/Tween 20 al 0.2%, en agitación leve constante. Enseguida, éstas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo (para β -catenina) a 1:15,000 y anti-IgG de ratón (para actina) a 1:5,000, ambos en PBS/leche baja en grasa al 5%. Ambos acoplados a peroxidasa.

En seguida, se lavaron las membranas 3 veces con PBS/Tween 20 al 0.2%, con agitación leve constante. Para revelar, el procedimiento se realizó en un cuarto oscuro. A ambas membranas se les adicionó el reactivo quimioluminiscente ECL por 1 minuto. Enseguida, las membranas se expusieron por un tiempo que osciló entre 1 y 3 minutos a placas de autoradiografía, éstas se revelaron y se fijaron por 5 minutos en cada paso. Para finalizar, se realizó una densitometría para el análisis de las bandas proteicas, utilizando el software ImageJ del Instituto Nacional de la Salud (NIH, por sus siglas en inglés) de EE.UU.. De forma general, dicho programa mide la intensidad de las bandas obtenidas de la autoradiografía, dicha intensidad se refleja como una campana de Gauss, que posteriormente, es utilizada para medir el área bajo la curva, siendo ésta la cantidad o concentración de la proteína.

Para la tinción con azul de Coomasie, se realizó la SDS-PAGE, y el gel de poliacrilamida se sumergió en solución de azul de Coomasie por 2 horas. Posteriormente, se dejó en solución desteñidora de 24 a 48 horas. Se escanearon los geles y se analizaron las bandas para normalizar la misma carga de proteínas mediante un análisis densitométrico con el mismo programa ImageJ.

Estandarización de IFI en subpoblación $\alpha 6$ -int^{bri}CD71^{dim}

Se buscaron las condiciones ideales para detectar β -catenina en las subpoblaciones celular $\alpha 6$ -integrina^{bri}CD71^{dim} y no $\alpha 6$ -integrina^{bri}CD71^{dim}, que son las subpoblaciones que cumplen con las características de troncalidad y no troncalidad, respectivamente. Debido a que la subpoblación con características de troncalidad ($\alpha 6$ -integrina^{bri}CD71^{dim}) es tan sólo el 1% de la población total se adecuó la técnica con 2000 células (número adecuado de células troncales por separar para evitar en lo máximo posible la dispersión entre ellas pero a la vez sin perder el contacto necesario entre ellas) teñidas con los 2 marcadores de superficie utilizados: CD71 y $\alpha 6$ -integrina.

Para obtener las 2000 células se utilizó un citómetro de flujo MoFlo de Beckman Coulter, siguiendo los pasos consecuentes: a cultivos de células HaCaT a 80% de confluencia, se les agregó 1 mL de tripsina al 1x y se incubaron por 8 minutos a 37° C. Una vez en solución la monocapa, se retiró la tripsina con centrifugación a 100 xg por 5 minutos, se resuspendió el botón celular en 1 mL de medio de cultivo. Posteriormente, se realizó un conteo celular en un hemocitómetro, teñiendo con azul de tripano al 0.2 % en PBS para verificar su viabilidad.

Enseguida, las células en suspensión se lavaron con 3 ml de PBS, se centrifugaron (100 xg por 5 minutos). Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL de solución de bloqueo por cada millón de células, en esta solución se mantuvieron en hielo por 15 min.

Posteriormente, se distribuyeron 500,000 células por cada condición de tinción en tubos para microcentrifuga, se centrifugaron (por 5 minutos a 1,100 xg) y se resuspendieron los botones en solución de marcaje (100 μ L por condición). Las condiciones de tinción fueron según los marcadores de superficie:

- Sin teñir
- $\alpha 6$ -integrina (PE) (sencillo)
- CD71 (PE-Cy5) (sencillo)
- $\alpha 6$ -integrina y CD71 (doble)

Se adicionaron a las suspensiones celulares los anticuerpos específicos anti $\alpha 6$ -integrina acoplado a ficoeritrina (PE) (ver anexo) diluido 1:100 y/o CD71 acoplado a PE-Cy5 (ver anexo) diluido 1:250 y se incubaron en hielo por 45 minutos cubiertas de la luz con agitación cada 15 minutos. Se lavaron 2 veces con PBS⁺ a 1,100 xg por 5 minutos, las células se resuspendieron en 0.5 mL de PBS⁺ y se pasaron a tubos para citómetro. De aquí, las células se llevaron al citómetro de flujo para ser separadas. Las células sin teñir sirvieron como control de autofluorescencia celular, y las células teñidas sencillas se usaron para realizar la compensación y definir con mayor precisión el enriquecimiento de las células $\alpha 6$ -integrina^{bri}CD71^{dim}. Las subpoblaciones celulares se enriquecieron mediante FACS sobre cubreobjetos en placas de 24 pozos con 1mL de medio DMEM enriquecido más 10% SFB y se incubaron a 37 °C a una atmósfera con 5% de CO₂ por 24 horas más, para así proceder con la inmunofluorescencia (IF): Las células se lavaron 2 veces con PBS (a 37°C), se fijaron con PFA al 4% en PBS (a 37°C) por media hora a temperatura ambiente, y se lavaron nuevamente con PBS 2 veces. Se permeabilizaron por media hora con Triton X-100 al 0.25% en PBS; seguido, se lavaron 3 veces con PBS, y se bloquearon con suero de cerdo al 5% en PBS por 2 horas. Se adicionó el anticuerpo primario anti β -catenina en una dilución 1:300 y el control de isotipo en una dilución equivalente al de β -catenina, se incubaron toda la noche a 4° C. Posteriormente, se lavaron con PBS/Tween 20 al 0.1% en agitación constante durante 10 minutos, 3 veces.

Enseguida se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Flour 594 en una dilución de 1:300 y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas cubierto de la luz; posteriormente, se lavó 3 veces en agitación constante por 15 minutos con PBS/Tween 20 al 0.3%. Para finalizar, se contratiñeron los núcleos con DAPI a una concentración de 0.2 μ g/mL en PBS, por 3 minutos a temperatura ambiente. Las observaciones se realizaron en microscopio confocal para determinar la localización de β -catenina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Anteriormente, en diversos trabajos de investigación científica se ha reportado alteraciones de la proteína β -catenina, tanto en líneas celulares derivadas de cáncer cervical como en muestras de pacientes con lesiones intraepiteliales de diferente grado, demostrando sobre-expresión y alteración en la localización basal. Sin embargo, no ha podido demostrarse una única causa específica a estos cambios ya que dichas alteraciones, se cree, pueden ser ocasionadas por diversas proteínas del VPH o por cambios celulares subsecuentes a éstas. De tal modo, que en este trabajo se enfocó a una sólo proteína del virus del papiloma humano para determinar si era causa de las alteraciones de β -catenina.

Efectos del cloruro de litio sobre la localización de la proteína β -catenina en células HaCaT

Para analizar la translocación de β -catenina desde la membrana citoplasmática hacia el núcleo como punto final de acción como factor de transcripción en la vía Wnt; las células HaCaT se expusieron a LiCl en solución, el cual fue añadido al medio. Los iones Li^+ muestran actividad inhibitoria sobre GSK-3 β , favoreciendo la translocación de β -catenina al núcleo debido a su precedente acumulación en citoplasma por falta de fosforilación y, eventualmente, ubiquitinación de la misma (Abu-Baker; et al., 2013). Cabe mencionar que debido a la actividad inhibitoria en la proliferación celular del mismo ión, se consideró pertinente exponer las células a diversas condiciones tanto en tiempo como en concentración de LiCl con el fin de asegurar el resultado deseado. Es decir, se utilizaron concentraciones finales de 10, 20, 30 y 40 mM por 48 horas; observándose una acumulación de β -catenina sólo en citoplasma a partir de 30 y 40 mM (Fig. 11). Por otro lado, las células también fueron expuestas a 10 y 20 mM (concentración final) de Li^+ por 168 horas, las cuales mostraron un resultado similar, sin embargo la acumulación citoplasmática no fue tan evidente (Fig. 12).

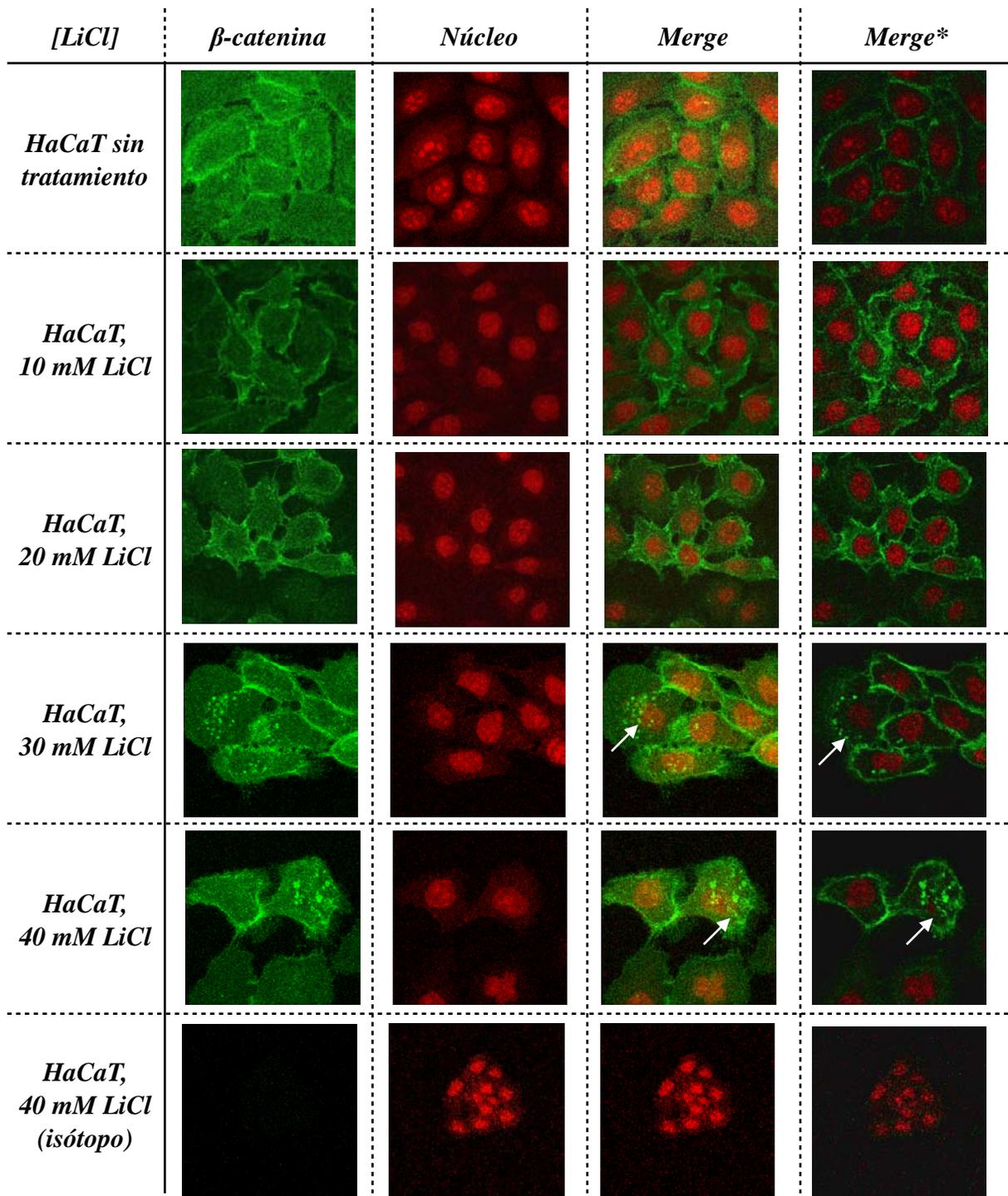


Figura 11. IFI de células HaCaT expuestas a LiCl por 48 horas.

La proteína β -catenina se encuentra teñida con FITC (verde) y el núcleo con yoduro de propidio (rojo). Las flechas blancas indican la acumulación de β -catenina en citoplasma. Merge es la unión de todo los cortes ópticos seriados o proyecciones máximas. Por otro lado, Merge* es un solo corte, elimina la información proveniente de otros planos.

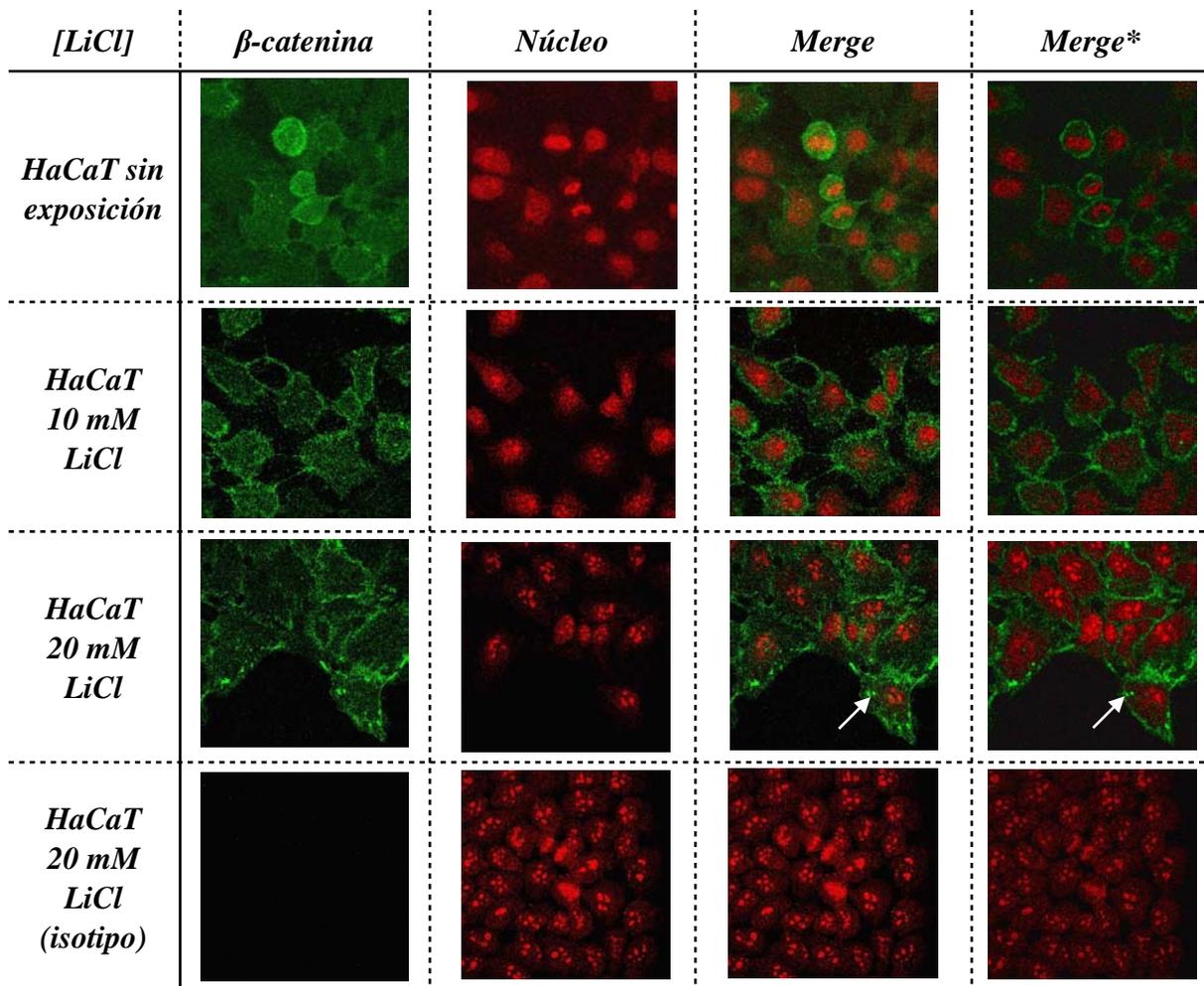


Figura 12. IFI de células HaCaT expuestas a LiCl durante 168 horas.

La proteína β -catenina se encuentra teñida con FITC (verde) y el núcleo con yoduro de propidio (rojo). Las flechas blancas indican la acumulación de β -catenina en citoplasma. Merge es la unión de todo los cortes ópticos seriados o proyecciones máximas. Por otro lado, Merge* es un solo corte, elimina la información proveniente de otros planos.

Como se observa en las figuras anteriores, en las células expuestas a LiCl es evidente la relocalización de β -catenina por efecto de los iones Li^+ , situando a la proteína desde su estado basal en la membrana citoplasmática hasta el citoplasma. Sin embargo, la ubicación en núcleo, que era el resultado esperado, no pudo observarse en ninguna condición aun con exposición prolongada o a dosis altas de Li^+ . Si bien se tiene documentado el mecanismo por el cual dicho ión inhibe la degradación de β -catenina en ciertas células, es un dato no reportado en células

HaCaT. Por otro lado, existen reportes donde se describe la presencia de β -catenina en el núcleo en células HaCaT por inducción de luz ultravioleta de onda larga (UVA) de 356 nm (Jean, Bogdanowicz; et al., 2011), lo que rechaza la posibilidad de sugerir que exista un mecanismo inesperado que evite la translocación nuclear de β -catenina en dichas células.

Lo que permite postular que la β -catenina se acumula sólo en citoplasma debido a que grandes cantidades de la misma en el núcleo pueden cambiar la expresión génica, y no exactamente llevar a proliferación, sino que se activan genes de inducción de apoptosis como una forma de modulación negativa, con el fin de prevenir la posible formación de tumores; dando como resultado una elevada actividad de p53 en células que sobreexpresan β -catenina en condiciones experimentales, tal y como lo describe Albuquerque; et al., (2002). Esto puede explicar el efecto negativo del LiCl sobre la proliferación celular que anteriormente se mencionó.

Localización de la proteína β -catenina en células HaCaT-E5 y HaCaT-LacZ α .

Para determinar el efecto de E5 de VPH-16 sobre la localización de la proteína β -catenina en células HaCaT, se realizaron IFIs para esta proteína a 9, 12 y 15 días post-infección del lentivirus que contenía el transgen E5. Como control se utilizaron células HaCaT infectadas con un lentivirus que contenía el transgen LacZ α de *Escherichia coli*, ya que esto nos asegura que cualquier cambio observado es puramente por los efectos de E5 y no por el estrés causado por la infección con el lentivirus, la selección de las células infectadas con el antibiótico u algún otro factor presente durante el proceso. En los resultados se observó una acumulación de β -catenina en el citoplasma de las células HaCaT-E5 (Fig. 13) que incrementó conforme al tiempo, ya que 15 dpi se observaron más campos de células con dicho fenómeno. Por otro lado, en las células HaCaT-LacZ α la localización de β -catenina fue similar a lo que se observó en las células HaCaT en condiciones basales: en la membrana citoplasmática.

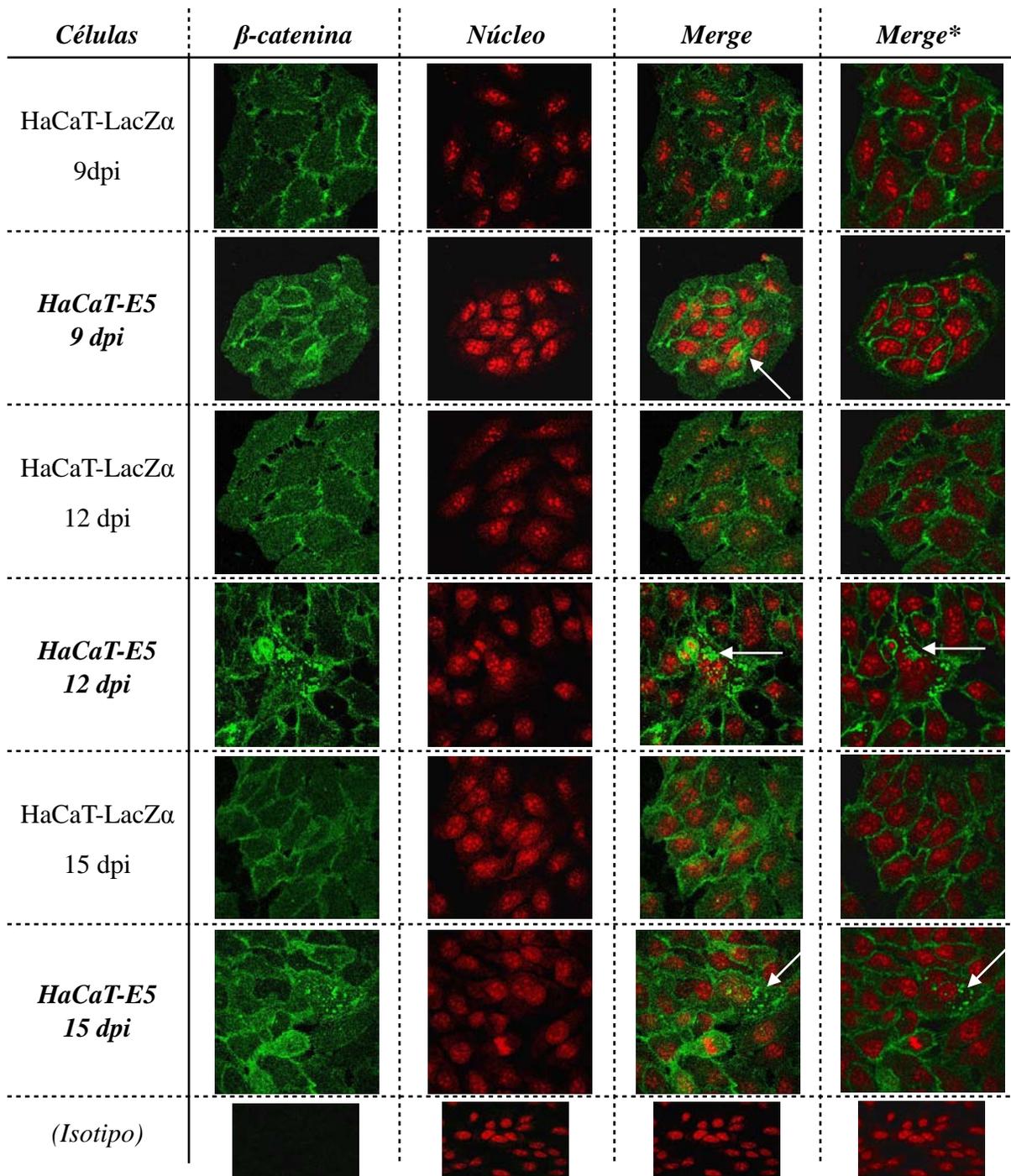


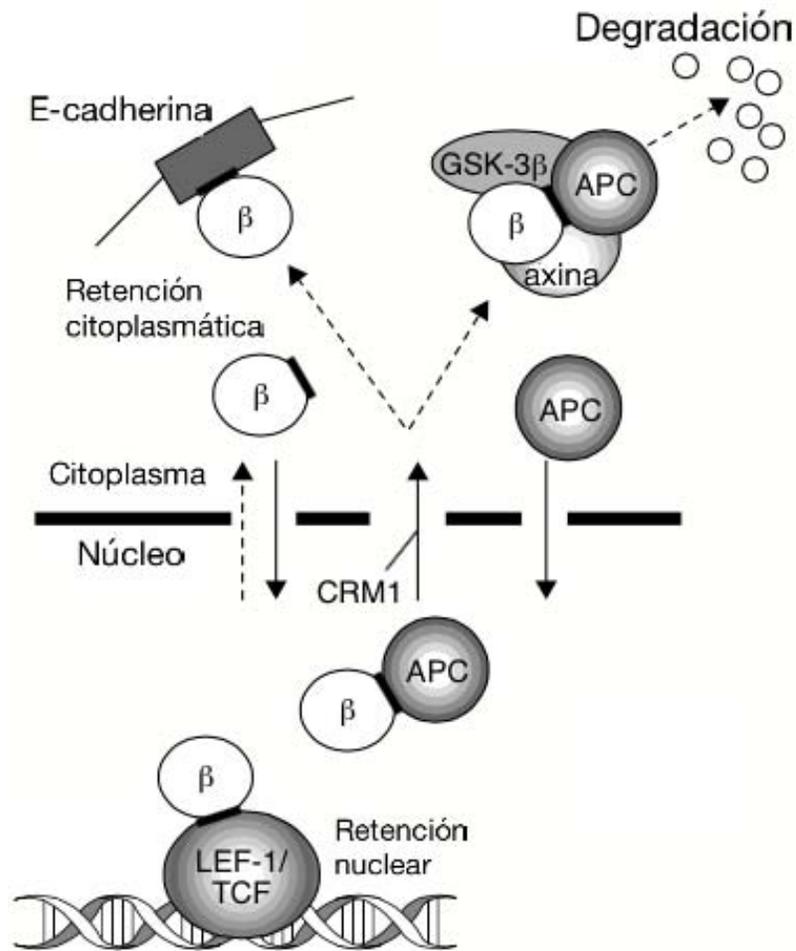
Figura 13. IFI de células HaCaT que expresan el gen E5 y LacZ α .

La proteína β -catenina fue teñida con FITC (verde) y el núcleo con yoduro de propidio (rojo). El isotipo sin señal nos asegura que no hay unión inespecífica del anti β -catenina. Las flechas blancas indican la acumulación de β -catenina en citoplasma a diferentes tiempos post-infección. Merge es la unión de todos los cortes ópticos seriados o proyecciones máximas. Por otro lado, Merge* es un solo corte, elimina la información proveniente de otros planos.

Kivi, et al. (2008) demostraron mediante un ensayo de “reparación de heridas” que E5 incrementa la motilidad de las células HaCaT. Ellos comprobaron que las células que expresaban E5 eran capaces de cerrar más rápidamente una “supuesta” herida en comparación con aquellas que no expresaban el gen, sin que hubiera un aumento significativo en el número de células, es decir, su proliferación no se afectaba por la presencia de E5. Esto sugiere que si bien E5 puede modificar la ubicación de β -catenina de alguna forma, no provoca su translocación al núcleo ni su activación consecuente. Además, *in vivo* la adhesión celular se altera por pérdida parcial de las uniones adherentes en las que β -catenina y E-cadherina participan, dichas proteínas cambian su localización de la membrana citoplasmática a citoplasma celular en muestras con lesiones intraepiteliales escamosas cervicales; siendo esto un factor determinante para la progresión y propagación del cáncer cervical (Rodriguez-Sastre, Gonzalez-Maya; et al., 2005).

De hecho, este fenómeno está muy bien documentado por Rodriguez-Sastre, et al. (2005), ellos reportaron la acumulación de β -catenina en el citoplasma y muy poca o casi nula en el núcleo celular en muestras de cáncer cervical. Sólo en 3 de 58 muestras de pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas y cáncer cervical (adenocarcinoma, carcinoma escamoso o adenoescamoso), se observó la presencia de β -catenina nuclear, también confirmaron que no existía mutación en *CTNNB1*, como dato adicional. Estas observaciones realizadas *in vivo* respaldan lo obtenido en este trabajo *in situ*, donde la acumulación sólo ocurre en citoplasma. La causa puede deberse a dos razones: la primera, la existencia de un mecanismo apoptótico que evite la acumulación de β -catenina en el núcleo, que se consideraría como el mismo efecto que se obtiene al tratar las células con LiCl; y la segunda, quizás la principal es que puede deberse a una acción alterna de APC, la cual además de actuar en el complejo de degradación de β -catenina, también regula su exportación del núcleo hacia el citoplasma, como se representa en la figura 14. La proteína APC, a diferencia de β -catenina, sí presenta NES que se asocia con receptores CRM1 (también denominado Xpo1). De hecho, Henderson, et al. (2000) afirmaron que APC sólo actúa como chaperona para la eliminación de β -catenina. Por otro lado, se han reportado de igual forma que, así como β -catenina es capaz de entrar al núcleo sin

ayuda de factores intracelulares, también puede salir independientemente de la acción de exportinas o de CRM1, receptor presente en el núcleo (Eleftheriou, Yoshida; et al., 2001). Sin embargo, la siguiente cuestión que se plantea es, de regreso en citoplasma ¿por qué β -catenina no es degradada como constitutivamente lo sería?



Modificada de Henderson (2000).

Figura 14. Exportación de β -catenina del núcleo.

Modelo que postula la adecuación de los niveles de β -catenina nuclear mediante su exportación a citoplasma mediada por APC.

Abundancia relativa de la proteína β -catenina en células HaCaT-E5 y HaCaT-LacZ α .

La figura 15 muestra un ensayo representativo de la inmunodetección en fase sólida realizados para determinar la expresión de la proteína β -catenina en extractos de células HaCaT-E5 y HaCaT-LacZ α , éstas últimas como control. Después de normalizar con un control de carga como actina (proteína constitutiva y encontrarse en todas las células); se determinó la abundancia relativa de β -catenina mediante un análisis densitométrico de la intensidad de las bandas. Los resultados fueron tratados estadísticamente, de tal forma que arrojaron que sólo existía cambio significativo en la expresión de β -catenina a 15 días posteriores a la infección (gráfico 1).

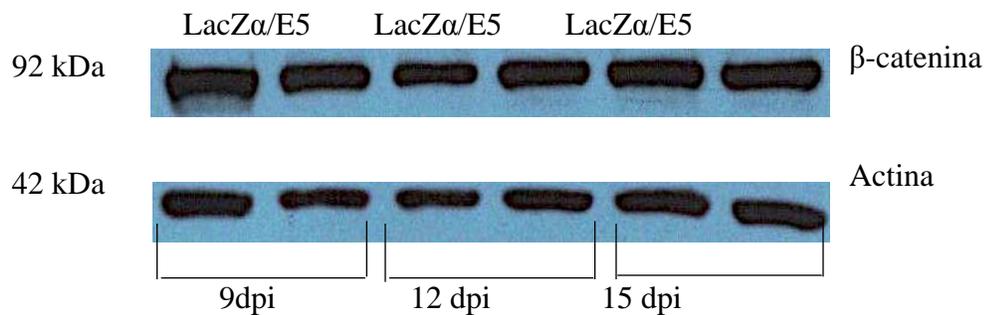


Figura 15. Inmunodetección en fase sólida de β -catenina.

Expresión de β -catenina en las células HaCaT-E5 y HaCaT-LacZ α (control) en diferentes dpi. La expresión de actina se utilizó como control de carga para normalizar y determinar los cambios en la expresión de β -catenina. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, sólo se muestra un ensayo representativo.

Proteína β -catenina en células HaCaT

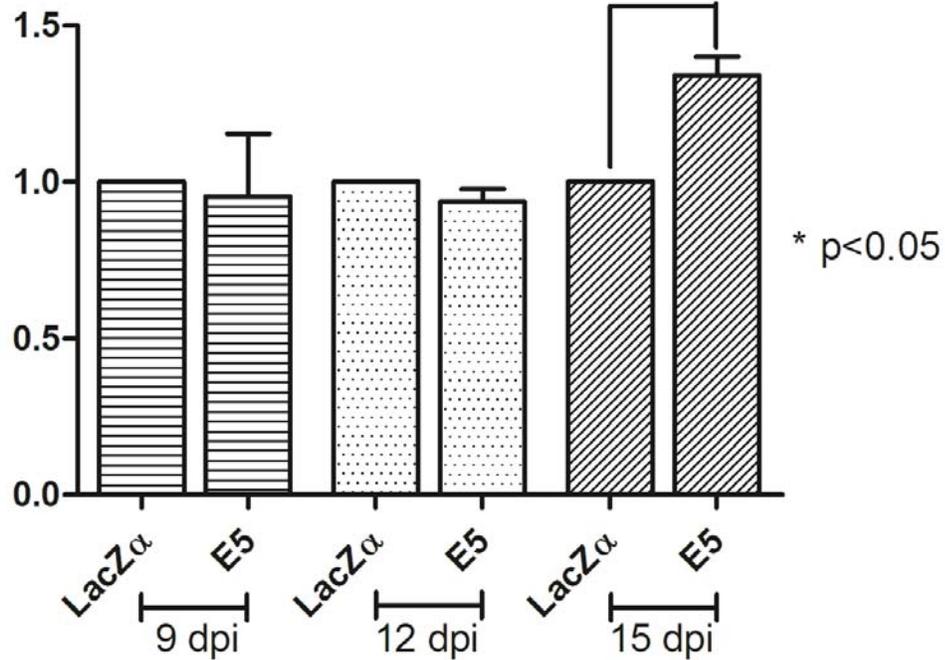


Gráfico 1. Cambios en la concentración relativa de β -catenina.

Las diferencias de la proteína en las células HaCaT-E5 con respecto a HaCaT-LacZ α , sólo se observa cambio significativo a 15 días de la expresión del gen E5. El análisis se realizó con prueba t de student.

La respuesta a por qué β -catenina no es degradada como constitutivamente lo sería una vez de regreso al citoplasma podría ser debido a que E5 pudiera alterar la unión de la ubiquitin ligasa β -TrCP con β -catenina; tal y como se cree que sucede con c-Cbl en la vía de degradación proteosomal del receptor del factor de crecimiento epidermal (Zhang, Srirangam; et al., 2005), provocando la consecuente acumulación errática y gradual de β -catenina en citoplasma a consecuencia de la inhibición en la acción proteosomal. Suponiendo que esta vía fuera la acción que provoca E5 sobre β -catenina, concuerda acertadamente con la razón por la que β -catenina no es eliminada después de que es exportada del núcleo por acción de APC. Esta hipótesis se respalda bien con el aumento cuantificable y estadísticamente significativo de β -catenina en HaCaT-E5 a los 15 dpi (Gráfico 1), además de los resultados de las IFs en las mismas células (Fig. 13). Además, no se ha reportado otro mecanismo adyacente que pueda efectuar la proteína E5 de VPH-16 para evitar la degradación de β -catenina.

Por otro lado, también se ha planteado que E5 puede afectar el transporte de β -catenina hacia la membrana citoplasmática después de su biosíntesis. Es decir, las características hidrofóbicas que E5 posee le permiten tener una gran afinidad por las membranas celulares, provocando la alteración de vesículas transportadoras, como es el caso del complejo principal de histocompatibilidad de clase I ocasionado por E5 de VPH-16 (Leykauf, Salek; et al., 2004). Así mismo, debido a que no se observaron cambios en las uniones intercelulares de las células HaCaT-E5, se propuso que las células podrían poseer un mecanismo que favoreciera la sobreexpresión de β -catenina para compensar la retención citoplasmática de la misma, evitando así alguna alteración en las uniones intercelulares.

Localización y abundancia de la proteína β -catenina en las células $\alpha 6$ -int^{bri}CD71^{dim}

Para determinar la localización de la proteína β -catenina en la subpoblación de células con características de troncalidad $\alpha 6$ -integrina^{bri}CD71^{dim} se estandarizaron las condiciones para IFI en células que fueron separadas por citometría de flujo mediante los marcadores de superficie $\alpha 6$ -integrina y CD71. Esta estandarización se realizó debido a que las células separadas (2000) no podían ser tratadas de igual forma que células en monocapa y esto se reflejaba en unión inespecífica de los anticuerpos observada como señal positiva en el control de isotipo (Fig. 16, A y B).

En primera instancia, se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 594 (rojo) para evitar cualquier cruce de fluorescencia con los fluorocromos PE y PE-Cy5 acoplados a los anticuerpos utilizados para la separación por citometría de flujo, y aún con esta precaución se verificó que así sucediera, mediante la observación en el microscopio de las células separadas por citometría (Fig. 16, C). Así mismo, la tinción para inmunofluorescencia realizada únicamente con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 594) puso en claro que no existía unión inespecífica por parte del mismo (Fig. 16, D). Por otro lado, la inespecificidad observada con el isotipo (Fig. 16, B) no permitió asegurar que en la muestra teñida para β -catenina se estuviera observando con precisión la proteína en cuestión (Fig. 16, A).

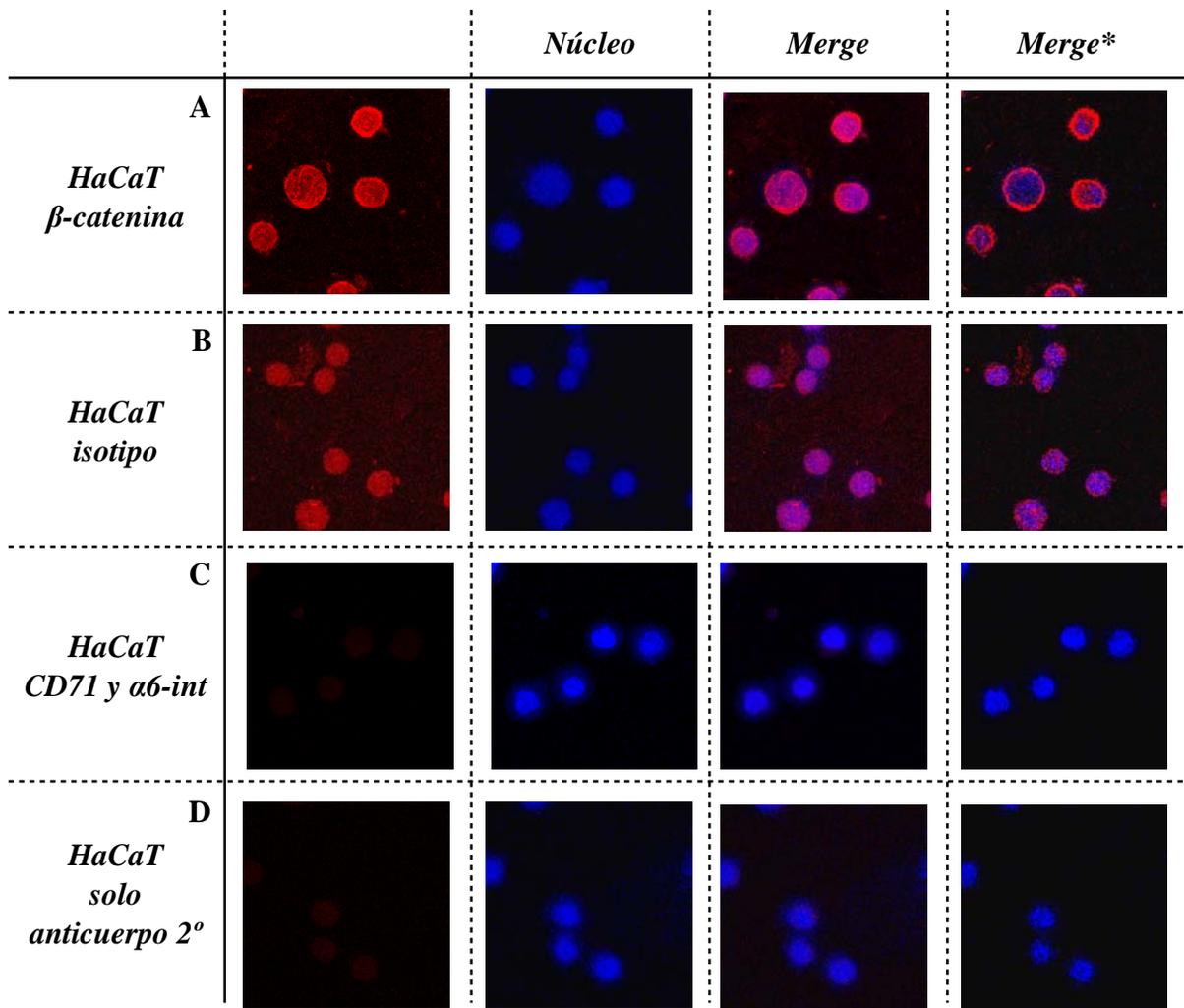


Figura 16. IFI de células HaCaT después de su separación por citometría de flujo.

La dilución 1:50 del anticuerpo anti β -catenina (A) y su equivalente del isotipo (B) no permite discernir con precisión la presencia de β -catenina dada la inespecificidad que se observa con éste último. Los fluorocromos PE y PE-Cy5 acoplados a los anticuerpos anti α 6-integrina y anti-CD71 respectivamente, utilizados en la citometría de flujo no interfieren con el fluorocromo Alexa Fluor 594 acoplado al anticuerpo secundario utilizado para la inmunofluorescencia (C). El anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 594 no se une de manera inespecífica a las células (D). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Merge es la unión de todo los cortes ópticos seriados o proyecciones máximas. Por otro lado, Merge* es un solo corte, elimina la información proveniente de otros planos.

Al pasar las células por el citometría de flujo, las células son sometidas a cierto estrés debido a la aplicación de cargas eléctricas para llevar a cabo su separación, por lo que pueden sufrir modificaciones de ciertas características fisicoquímicas en sus estructuras proteicas. De tal forma que se implementaron cambios en los parámetros de la metodología de IFI con los que se había iniciado. Es decir, en primera instancia se buscaba que las células con características de troncalidad obtenidas de la separación mantuvieran su homogeneidad, de tal forma que la IF se realizaba después de 6 horas de cultivo, y así se permitía su adherencia al cubreobjetos evitando su proliferación. Sin embargo, este periodo de cultivo se modificó hasta considerar 24 horas como la mejor opción, ya que a este tiempo las células se encontraban bien adheridas al cubreobjetos y la distribución de β -catenina era distinguible. Además, el hecho de no trabajar con células en monocapa y contar con solo 2,000 células implicaba que la cantidad de anticuerpo requerida sería menor. Por lo que la metodología utilizada en células en monocapa se modificó. Se tituló el anticuerpo secundario y se eligió una dilución de 1:300. Por otro lado, se tituló del anticuerpo primario anti β -catenina y se eligió 1:300 en suero de cerdo al 5% con incubación a 4°C durante toda la noche. Además se probaron varias condiciones de bloqueo y se seleccionó 5% de suero de cerdo por 2 horas a temperatura ambiente, la cual permitió una mejor identificación de β -catenina. De esta forma se obtuvieron las condiciones óptimas para la IFI de las subpoblaciones $\alpha 6$ -int^{bri}CD71^{dim} (Fig. 17, A) y no $\alpha 6$ -int^{bri}CD71^{dim} (Fig. 17, B) de células HaCaT, sin que se observara fondo alguno con el control de isotipo (Fig. 17, C). Con estas condiciones se pudo observar en ambas subpoblaciones la localización de β -catenina, la cual se mantuvo en su estado basal. Y ya que se trataba de HaCaT *wt*, se localizó en membrana citoplasmática el lugar donde se esperaba encontrar.

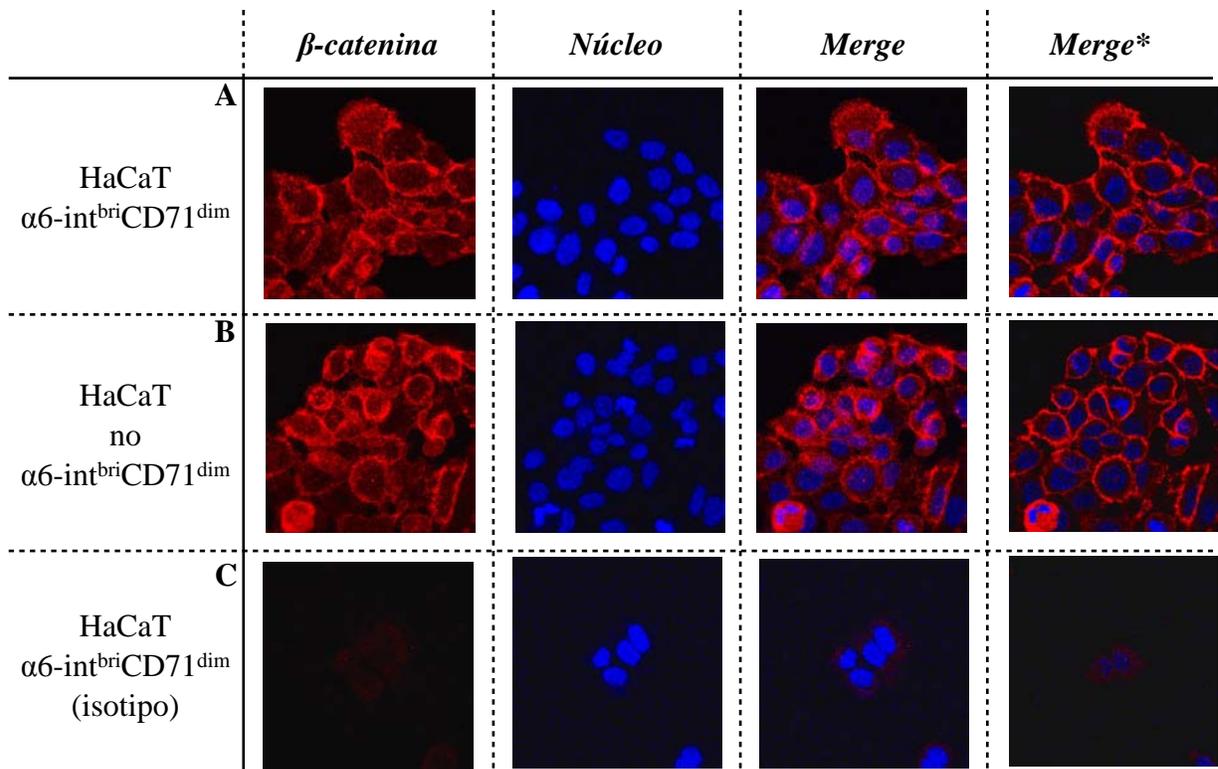


Figura 17. IFI de células HaCaT con características de troncalidad.

24 horas después de su separación, las células fueron teñidas con Alexa Fluor 594 (rojo) para evidenciar la presencia de β -catenina, y el núcleo con DAPI (azul). Se muestran 2 subpoblaciones: troncal (A) y no troncal (B). El isotipo no muestra señal fluorescente lo que indica mejora en la técnica (C). Merge es la unión de todos los cortes ópticos seriados o proyecciones máximas. Por otro lado, Merge* es un solo corte, elimina la información proveniente de otros planos.

Por otro lado, para determinar la abundancia relativa aproximada de β -catenina en la subpoblación troncal y no troncal, y debido a que la cantidad obtenida de células de la separación por citometría es muy baja (sólo 2000 células) y por ende muy difícil para determinarlo por inmunodetección en fase sólida, se realizó una cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de un total de 100 células. Con el fin de determinar si existía, en primera instancia, diferencia entre las subpoblaciones $\alpha 6\text{-int}^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{dim}}$ y no $\alpha 6\text{-int}^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{dim}}$ de células HaCaT. Se midió sólo la periferia que es donde se encuentra la proteína β -catenina en estado basal; determinando que no existe diferencia significativa (Gráfico 2) entre las subpoblaciones, y

aunque es de poca relevancia considerando que ambas provienen de una población de HaCaT *wild type*, es un antecedente importante para futuros ensayos.

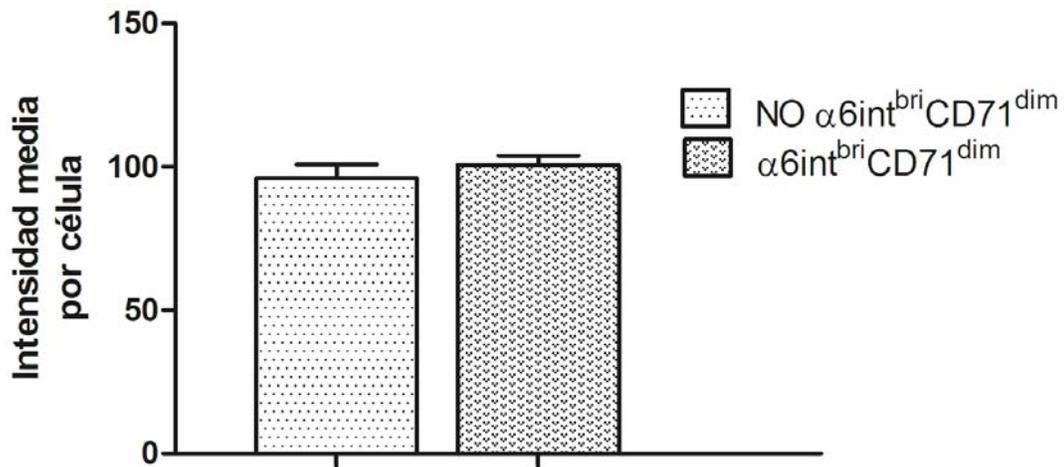


Gráfico 2. Comparación de la intensidad media de fluorescencia.

Se midió la fluorescencia en 100 células de ambas subpoblaciones: no $\alpha 6-int^{bri}CD71^{dim}$ y $\alpha 6-int^{bri}CD71^{dim}$ de las células HaCaT wt. Se determinó que no existía diferencia significativa mediante una prueba *t* de student.

Uno de los objetivos de este trabajo era determinar el estado de β -catenina en la subpoblación $\alpha 6-integrina^{bri}CD71^{dim}$ con el fin de, finalmente, correlacionarlo con los resultados preliminares obtenidos con anterioridad en este mismo equipo de trabajo, en donde se ha estado estudiando el efecto de E5 de VPH-16 sobre células con características de troncalidad $\alpha 6-integrina^{bri}CD71^{dim}$ y se ha observado que esta subpoblación aumenta hasta un 4% a los 12 dpi después de mantenerse en valores normales de 1%. Sin embargo, 3 días después (15 dpi) dicha subpoblación declina y regresa hasta valores normales (Revels, 2015. *Datos no publicados*); por lo que se pensaría en una modulación de tal forma que genes de diferenciación estén activos, y que β -catenina esté de alguna forma involucrada en el proceso.

Sin embargo, la completa ausencia, al menos en población total, de dicha proteína en el núcleo permite pensar que el mecanismo involucra otra vía de señalización; tal y como ocurre en células HCT116, donde la expresión de *MYC* y *CCND1* (ciclina D1) es independiente de β -catenina, contrario a lo que se pensaría pues son genes blanco ya bien identificados del complejo β -catenina/LEF (Chan, Wang; et al., 2002). Valdría la pena determinar la localización de la proteína en subpoblaciones $\alpha 6$ -integrina^{bri}CD71^{dim} y no $\alpha 6$ -integrina^{bri}CD71^{dim} que expresen E5.

CONCLUSIONES

Al analizar a diferentes tiempos de expresión del gen *E5* y *LacZα* la localización de la proteína β -catenina se pudo observar diferencias sólo en aquellos queratinocitos con presencia del gen viral a mayor tiempo de expresión, aunque no provocó su acumulación nuclear como se esperaba, sí promovió una concentración mayor en el citoplasma celular, reflejándose también como aumento en la abundancia relativa de la proteína, siendo una cantidad mayor de la misma con significancia estadística; de tal forma que con estos datos se pudo concluir con certidumbre que E5 es capaz de modificar la ubicación y cantidad basal de β -catenina en células HaCaT. Así mismo, estos resultados permiten asegurar que la proteína β -catenina no es la causa, como factor de transcripción proliferativo, del aumento de la subpoblación $\alpha 6$ -integrina^{bri}CD71^{dim} como había sido observado en resultados preliminares de este mismo equipo de trabajo, pues no se encontró correlación alguna.

Por otro lado, al localizar con certeza a β -catenina en la subpoblación $\alpha 6$ -integrina^{bri}CD71^{dim} de células HaCaT, se permitirá realizar ensayos más profundos para entender y correlacionar el fenotipo de las células infectadas con la persistencia e invasividad que caracteriza el cáncer cérvico-uterino por infección de VPH-16.

PERSPECTIVAS

Este trabajo abre la senda para subsecuentes proyectos en los cuales pueden determinarse aún muchos factores. En primera instancia, analizar si β -catenina está o no fosforilada al acumularse en citoplasma. De tal caso que lo estuviera, encontrar la causa por la que no es degradada por el proteosoma y hallar qué mecanismo de inhibición es el que ejerce E5. Por otro lado, demostrar si hubiese nula actividad transcripcional de β -catenina con genes reporteros, y en dado caso confirmar experimentalmente que APC tiene como actividad constitutiva de exporte al citoplasma de β -catenina.

Además, determinar el estado de la catenina en la subpoblación $\alpha 6$ -int^{bri}CD71^{dim} de células que expresan E5. Así como, determinar si β -catenina tiene relación con el descenso de dicha subpoblación a 15 días después de la introducción del gen.

Un aspecto recalable que puede agregarse a un futuro proyecto es cuantificar y corroborar la actividad de p53 en aquellas células que expresen sólo E5 y aunado, altas cantidades de β -catenina; además, corroborar si la apoptosis está aumentada (por efecto de p53), ya que como se mencionó anteriormente β -catenina, se propone, pueda causar un aumento de la muerte celular programada. Y si se obtuviera alguna relación, provocar la inactividad total de p53 y corroborar la presencia de β -catenina en núcleo. Si se piensa en una forma integrativa de E5 y E6 del VPH: la tumorigénesis puede deberse, además de otros mecanismos, a la actividad descontrolada de β -catenina por efecto de E5, evitando la apoptosis por acción de E6.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbo, L.; Vincek, V.; Dickinson, G.; Shrestha, N.; Doblecki, S. y Haslett, P.A. (2007). Selective defect in plasmacytoid dendritic cell function in a patient with AIDS-associated atypical genital herpes simplex vegetans treated with imiquimod. *Clin Infect Dis*, 44(3), e25-27. doi: 10.1086/510426
- Abu-Baker, A.; Laganiere, J.; Gaudet, R.; Rochefort, D.; Brais, B.; Neri, C.; Dion, P.A. y Rouleau, G.A. (2013). Lithium chloride attenuates cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy by perturbing Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Death Dis*, 4, e821. doi: 10.1038/cddis.2013.342
- Alberts, B.; Wilson, J.H. y Hunt, T. (2008). *Molecular biology of the cell* (5th ed.). New York: Garland Science.
- Albuquerque, C.; Breukel, C.; van der Luijt, R.; Fidalgo, P.; Lage, P.; Slors, F.J.; Leitao, C.N.; Fodde, R. y Smits, R. (2002). The 'just-right' signaling model: APC somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the beta-catenin signaling cascade. *Hum Mol Genet*, 11(13), 1549-1560. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045208>
- Arbyn, M.; Castellsague, X.; de Sanjose, S.; Bruni, L.; Saraiya, M.; Bray, F. y Ferlay, J. (2011). Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol*, 22(12), 2675-2686. doi: 10.1093/annonc/mdr015
- Ault, K.A. (2006). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2006 Suppl, 40470. doi: 10.1155/IDOG/2006/40470
- Blanpain, C.; Lowry, W.E.; Geoghegan, A.; Polak, L. y Fuchs, E. (2004). Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*, 118(5), 635-648. doi: 10.1016/j.cell.2004.08.012
- Blaustein, A. y Kurman, R.J. (2002). *Blaustein's pathology of the female genital tract* (5th ed.). New York: Springer.
- Boukamp, P.; Petrussevska, R.T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A. y Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*, 106(3), 761-771. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2450098>
- Bulut, G.; Fallen, S.; Beauchamp, E.M.; Drebing, L.E.; Sun, J.; Berry, D.L.; Kallakury, B.; Crum, C.P.; Toretsky, J.A.; Schlegel, R. y Uren, A. (2011). Beta-catenin accelerates human papilloma virus type-16 mediated cervical carcinogenesis in transgenic mice. *PLoS One*, 6(11), e27243. doi: 10.1371/journal.pone.0027243

-
- Cadigan, K.M. (2008). Wnt-beta-catenin signaling. *Curr Biol*, 18(20), R943-947. doi: 10.1016/j.cub.2008.08.017
- Chan, T.A.; Wang, Z.; Dang, L.H.; Vogelstein, B. y Kinzler, K.W. (2002). Targeted inactivation of CTNNB1 reveals unexpected effects of beta-catenin mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12), 8265-8270. doi: 10.1073/pnas.082240999
- Cong, F.; Zhang, J.; Pao, W.; Zhou, P. y Varmus, H. (2003). A protein knockdown strategy to study the function of beta-catenin in tumorigenesis. *BMC Mol Biol*, 4, 10. doi: 10.1186/1471-2199-4-10
- Cronje, H.S. (2005). Screening for cervical cancer in the developing world. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 19(4), 517-529. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2005.02.005
- Doorbar, J.; Quint, W.; Banks, L.; Bravo, I.G.; Stoler, M.; Broker, T.R. y Stanley, M.A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F55-70. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083
- Eleftheriou, A.; Yoshida, M. y Henderson, B.R. (2001). Nuclear export of human beta-catenin can occur independent of CRM1 and the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Biol Chem*, 276(28), 25883-25888. doi: 10.1074/jbc.M102656200
- Fagotto, F. (2013). Looking beyond the Wnt pathway for the deep nature of beta-catenin. *EMBO Rep*, 14(5), 422-433. doi: 10.1038/embor.2013.45
- Fathke, C.; Wilson, L.; Shah, K.; Kim, B.; Hocking, A.; Moon, R. y Isik, F. (2006). Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing. *BMC Cell Biol*, 7, 4. doi: 10.1186/1471-2121-7-4
- Gottardi, C.J.; Wong, E. y Gumbiner, B.M. (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol*, 153(5), 1049-1060. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11381089>
- Graham, S.V. (2010). Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol*, 5(10), 1493-1506. doi: 10.2217/fmb.10.107
- Greco, D.; Kivi, N.; Qian, K.; Leivonen, S.K.; Auvinen, P. y Auvinen, E. (2011). Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PLoS One*, 6(7), e21646. doi: 10.1371/journal.pone.0021646
- Green, D.W.; Roh, H.; Pippin, J.A. y Drebin, J.A. (2001). Beta-catenin antisense treatment decreases beta-catenin expression and tumor growth rate in colon carcinoma xenografts. *J Surg Res*, 101(1), 16-20. doi: 10.1006/jsre.2001.6241

-
- Ha, N.C.; Tono-zuka, T.; Stamos, J.L.; Choi, H.J. y Weis, W.I. (2004). Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation. *Mol Cell*, 15(4), 511-521. doi: 10.1016/j.molcel.2004.08.010
- Henderson, B.R. (2000). Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol*, 2(9), 653-660. doi: 10.1038/35023605
- Henderson, B.R.; Galea, M.; Schuechner, S. y Leung, L. (2002). Lymphoid enhancer factor-1 blocks adenomatous polyposis coli-mediated nuclear export and degradation of beta-catenin. Regulation by histone deacetylase 1. *J Biol Chem*, 277(27), 24258-24264. doi: 10.1074/jbc.M110602200
- Hu, L.; Plafker, K.; Vorozhko, V.; Zuna, R.E.; Hanigan, M.H.; Gorbsky, G.J.; Plafker, S.M.; Angeletti, P.C. y Ceresa, B.P. (2009). Human papillomavirus 16 E5 induces bi-nucleated cell formation by cell-cell fusion. *Virology*, 384(1), 125-134. doi: 10.1016/j.virol.2008.10.011
- IARC. (Septiembre 2015). Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 (IARC, GLOBOCAN 2012). World Health Organization. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
- Jamieson, C.; Sharma, M. y Henderson, B.R. (2014). Targeting the beta-catenin nuclear transport pathway in cancer. *Semin Cancer Biol*, 27, 20-29. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.04.012
- Jean, C.; Bogdanowicz, P.; Haure, M.J.; Castex-Rizzi, N.; Fournie, J.J. y Laurent, G. (2011). UVA-activated synthesis of metalloproteinases 1, 3 and 9 is prevented by a broad-spectrum sunscreen. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 27(6), 318-324. doi: 10.1111/j.1600-0781.2011.00627.x
- Jusman, Y.; Ng, S.C. y Abu Osman, N.A. (2014). Intelligent Screening Systems for Cervical Cancer. *ScientificWorldJournal*, 2014, 810368. doi: 10.1155/2014/810368
- Kabsch, K. y Alonso, A. (2002). The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol*, 76(23), 12162-12172. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414956>
- Kaur, P. y Li, A. (2000). Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J Invest Dermatol*, 114(3), 413-420. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00884.x
- Kivi, N.; Greco, D.; Auvinen, P. y Auvinen, E. (2008). Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene*, 27(18), 2532-2541. doi: 10.1038/sj.onc.1210916

-
- Kose, F.M. y Naki, M.M. (2014). Cervical premalignant lesions and their management. *J Turk Ger Gynecol Assoc*, 15(2), 109-121. doi: 10.5152/jtgga.2014.29795
- Leto, M.; Santos Junior, G.F.; Porro, A.M. y Tomimori, J. (2011). Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol*, 86(2), 306-317. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21603814>
- Leykauf, K.; Salek, M.; Schluter, H.; Lehmann, W.D. y Alonso, A. (2004). Identification of membrane proteins differentially expressed in human papillomavirus type 16 E5-transfected human keratinocytes by nano-electrospray ionization mass spectrometry. *J Gen Virol*, 85(Pt 6), 1427-1431. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15166425>
- Li, A.; Simmons, P.J. y Kaur, P. (1998). Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(7), 3902-3907. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9520465>
- Lopez, J.; Valdez-Morales, F.J.; Benitez-Bribiesca, L.; Cerbon, M. y Carranca, A.G. (2013). Normal and cancer stem cells of the human female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol*, 11, 53. doi: 10.1186/1477-7827-11-53
- Maufort, J.P.; Williams, S.M.; Pitot, H.C. y Lambert, P.F. (2007). Human papillomavirus 16 E5 oncogene contributes to two stages of skin carcinogenesis. *Cancer Res*, 67(13), 6106-6112. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0921
- Moody, C.A. y Laimins, L.A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, 10(8), 550-560. doi: 10.1038/nrc2886
- Morales, R.; Parada, R.; Giuliano, A.R.; Cruz, A.; Castellsague, X.; Salmeron, J. y Lazcano-Ponce, E. (2012). HPV in female partners increases risk of incident HPV infection acquisition in heterosexual men in rural central Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21(11), 1956-1965. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0470
- Nollet, F.; Berx, G.; Molemans, F. y van Roy, F. (1996). Genomic organization of the human beta-catenin gene (CTNNB1). *Genomics*, 32(3), 413-424. doi: 10.1006/geno.1996.0136
- Oelze, I.; Kartenbeck, J.; Crusius, K. y Alonso, A. (1995). Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. *J Virol*, 69(7), 4489-4494. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7769709>
- Ortega-Cervantes, L.; Rojas-Garcia, A.E.; Robledo-Marenco Mde, L.; Barron-Vivanco, B.S.; Giron-Perez, M.I.; Vallejo-Ruiz, V.; Lopez-Flores, J.F.; Carrillo-Cortez, A.; Cantu-De Leon, D.; Rodriguez-Trejo, A. y Medina-Diaz, I.M. (2013). Morbidity of breast cancer and cervico-uterine cancer in women from the occidental region of Mexico. *Rev Invest Clin*, 65(3), 221-227. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23877809>

-
- Pasquariello, N.; Oddi, S.; Malaponti, M. y Maccarrone, M. (2009). Regulation of gene transcription and keratinocyte differentiation by anandamide. *Vitam Horm*, 81, 441-467. doi: 10.1016/S0083-6729(09)81017-0
- Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 14(15), 1837-1851. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10921899>
- Polakis, P. (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(5). doi: 10.1101/cshperspect.a008052
- Rampias, T.; Sasaki, C. y Psyrris, A. (2014). Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncol*, 50(5), 356-363. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.07.011
- Rodriguez-Sastre, M.A.; Gonzalez-Maya, L.; Delgado, R.; Lizano, M.; Tsubaki, G.; Mohar, A. y Garcia-Carranca, A. (2005). Abnormal distribution of E-cadherin and beta-catenin in different histologic types of cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, 97(2), 330-336. doi: 10.1016/j.ygyno.2004.12.062
- Rosenbluh, J.; Wang, X. y Hahn, W.C. (2014). Genomic insights into WNT/beta-catenin signaling. *Trends Pharmacol Sci*, 35(2), 103-109. doi: 10.1016/j.tips.2013.11.007
- Satoh, S.; Daigo, Y.; Furukawa, Y.; Kato, T.; Miwa, N.; Nishiwaki, T.; Kawasoe, T.; Ishiguro, H.; Fujita, M.; Tokino, T.; Sasaki, Y.; Imaoka, S.; Murata, M.; Shimano, T.; Yamaoka, Y. y Nakamura, Y. (2000). AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet*, 24(3), 245-250. doi: 10.1038/73448
- Seeling, J.M.; Miller, J.R.; Gil, R.; Moon, R.T.; White, R. y Virshup, D.M. (1999). Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science*, 283(5410), 2089-2091. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092233>
- Sobrado, P.; Jedlicki, A.; Bustos, V.H.; Allende, C.C. y Allende, J.E. (2005). Basic region of residues 228-231 of protein kinase CK1alpha is involved in its interaction with axin: binding to axin does not affect the kinase activity. *J Cell Biochem*, 94(2), 217-224. doi: 10.1002/jcb.20350
- Stamos, J.L. y Weis, W.I. (2013). The beta-catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(1), a007898. doi: 10.1101/cshperspect.a007898
- Su, Y.; Fu, C.; Ishikawa, S.; Stella, A.; Kojima, M.; Shitoh, K.; Schreiber, E.M.; Day, B.W. y Liu, B. (2008). APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCF-beta-TrCP ubiquitin ligase. *Mol Cell*, 32(5), 652-661. doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.023

-
- Taelman, V.F.; Dobrowolski, R.; Plouhinec, J.L.; Fuentealba, L.C.; Vorwald, P.P.; Gumper, I.; Sabatini, D.D. y De Robertis, E.M. (2010). Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell*, 143(7), 1136-1148. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.034
- Tornesello, M.L.; Buonaguro, L.; Giorgi-Rossi, P. y Buonaguro, F.M. (2013). Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int*, 2013, 519619. doi: 10.1155/2013/519619
- Torres Lobaton, A.; Bustamante Iglesias, J.I.; Torres Rojo, A.; Oliva Posada, J.C.; Morales Palomares, M.A. y Roman Bassaure, E. (2013). [Cervical cancer. Epidemiological profile in 1,217 patients. Seguro popular]. *Ginecol Obstet Mex*, 81(2), 71-76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23596728>
- Tribius, S. y Hoffmann, M. (2013). Human papilloma virus infection in head and neck cancer. *Dtsch Arztebl Int*, 110(11), 184-190, 190e181. doi: 10.3238/arztebl.2013.0184
- Wang, K.; Wu, X.; Wang, J. y Huang, J. (2013). Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine. *Int J Nanomedicine*, 8, 899-908. doi: 10.2147/IJN.S38641
- Ying, J.; Li, H.; Yu, J.; Ng, K.M.; Poon, F.F.; Wong, S.C.; Chan, A.T.; Sung, J.J. y Tao, Q. (2008). WNT5A exhibits tumor-suppressive activity through antagonizing the Wnt/beta-catenin signaling, and is frequently methylated in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 14(1), 55-61. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1644
- Zhang, B.; Li, P.; Wang, E.; Brahmi, Z.; Dunn, K.W.; Blum, J.S. y Roman, A. (2003). The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology*, 310(1), 100-108. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12788634>
- Zhang, B.; Srirangam, A.; Potter, D.A. y Roman, A. (2005). HPV16 E5 protein disrupts the c-Cbl-EGFR interaction and EGFR ubiquitination in human foreskin keratinocytes. *Oncogene*, 24(15), 2585-2588. doi: 10.1038/sj.onc.1208453

ANEXO

Material y reactivos

Cultivo celular

- Línea celular de queratinocitos humanos, HaCaT.
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High glucose, D5648-1L, de Sigma-Aldrich, adicionado con 44mM NaHCO₃ y 10 mM de HEPES; pH 7.2. Suplementado con 50 U/mL de penicilina y 5000 µg/mL de estreptomicina, 2mM de L-glutamato y 1 mM de piruvato.
- Suero fetal bovino (SFB).
- Puromicina.
- PBS, buffer salino de fosfatos: NaCl 0.8 %, KCl 0.02 %, Na₂HPO₄ 0.144 % y KH₂PO₄ 0.024 %; pH 7.4.

Inmunodetección en fase sólida

- Buffer RIPA-Bolen: 150 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 0.1 % SDS, 1% Tritón x-100, 1% desoxicolato, 5 mM EDTA, disuelto en PBS; pH 7.2.
- Inhibidor de proteasas Complete®, Roche.
- Bio-Rad, DC Protein Assay Kit (Método de Lowry), catalogo: 500-0114.
- Azul de coomassie, solución: metanol 50%, ácido acético 10%, agua bidestilada 40% y pizca azul de coomasie.
- Solución desteñidora: metanol 5%, ác.acético 7%, agua bidestilada 88%.
- Buffer de carga Laemmli 2x: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, glicerol, SDS 10 %, Azul de bromo-fenol 0.5%, β-mercaptoetanol 0.05%.
- Rojo de Ponceau: 1 % de rojo de ponceau, 15 % de ácido sulfosalicílico, 15 % de ácido tricloroacético.
- Poliacrilamida Separador al 8%: Acrilamida-Bis al 30%, RGB (Tris Base 1.5 M, SDS 0.4%; pH 8.8) 4x, Persulfato de sodio al 10 %, TEMED.
- Poliacrilamida Concentrador al 5%: Acrilamida 30%, SGB (Tris base 0.5 M, SDS 0.4%; pH 6.8) 4x, Persulfato de sodio al 10 %, TEMED.
- Buffer de corrida 1x (RB -running buffer-): Tris base 0.3%, Glicina 1.44% y SDS 0.1%.

-
- Buffer de transferencia, pH 8.3: Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %.
 - Membrana de nitrocelulosa, Cat. #162-0097, Bio-Rad.
 - Leche en polvo baja en grasa.
 - Anticuerpo monoclonal primario contra actina, obtenido de ascitis de ratón.
 - Anticuerpo policlonal primario de conejo contra β -catenina (H-102): sc-7199, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
 - Anticuerpo secundario policlonal contra IgG de conejo acoplado a horseradish peroxidase.
 - Anticuerpo secundario policlonal contra IgG de ratón acoplado a horseradish peroxidase.
 - ECL (enhanced chemiluminescence) Luminol, H₂O₂, Amersham Pharmacia Biotech.
 - Solución de revelado, Kodak GBX, ref. 190-0943.
 - Solución fijadora, Kodak GBX, cat. 190-1875.

Inmunofluorescencia en células totales

- Azul de tripano, en solución al 4 % en agua destilada y estéril.
- Anticuerpo policlonal de ratón contra α 6-integrina acoplado a PE: 551143, BD Pharmingen.
- Anticuerpo policlonal de rata contra CD71 acoplado a PE-Cy5: 555736, BD Pharmingen.
- Paraformaldehido (PFA) solución al 4 % en PBS, Cat. #30525-89-4, Sigma Chemical Co.
- Triton X-100, solución al 0.25 % en PBS, 9002-93-1, Sigma Chemical Co.
- Suero de cerdo.
- Anticuerpo policlonal primario de conejo contra β -catenina (H-102): sc-7199, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Anticuerpo policlonal primario normal de conejo: sc-2027, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Anticuerpo policlonal secundario contra IgG de conejo acoplado a FITC.
- Tween 20 (polisorbato 20), Cat. #96917, Reserch Organics Inc.
- IP, Yoduro de propidio solución 1 μ g/mL.

Inmunofluorescencia, estandarización para subpoblación de células HaCaT

- PBS⁺, PBS adicionado con 2 % de SFB y 1% HEPES.
- Solución de bloqueo: PBS adicionado con 2 % de SFB y 2 % de albúmina sérica bovina.

-
- Solución de marcaje.
 - Anticuerpo policlonal secundario contra IgG de conejo acoplado a Alexa 594.
 - DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), solución en PBS 1:10 000.

Material consumible y equipo

- Incubadora, Panasonic, modelo: MCO-20AIC-PA.
- Campana de seguridad biológica, NuAire Tipo II A2, modelo NU-425.
- Cajas de cultivo de 60 y 100 cm, Corning.
- Tubos de fondo conico de 15 y 50 mL, Corning.
- Microscopio óptico invertido, America Optical Corporation.
- Cámara de Neubauer mejorada, Marienfeld Superior; catalog. #0640010.
- Citómetro de flujo MoFlo de Beckman Coulter.
- Microscopio confocal Leica DM 6000 CS, con hardware: Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) 4.0.0.11706. Así mismo LAS AF Lite.
- ImageJ 1.48v. National Institutes of Health (NIH) de EE.UU..
- Micropipetas de 2, 20, 200 y 1000 μ L, Gilson.
- Puntas para micropipeta, Axygen.
- Tubos de microfuga de 0.6 y 1.5 ml, Axygen.
- Agitador magnético y parrilla, Cole Parmer, modelo 4658.
- Agitador orbital, VWR, modelo DS 500.
- Termómetro LAUKA04025, modelo 350.
- Lector de placas Benchmark, Bio-Rad, cat. 170-6850.
- Medidor de pH, modelo PHI 44, Beckman.
- Hielo seco y hielo húmedo.
- CO₂