

ARTÍCULO ORIGINAL

Moléculas de adhesión y proteínas onco-génicas de virus de papiloma humano en la progresión de cáncer de cuello uterino

Guerra, Fernando; Rocher, Adriana; Angeleri, Anabela; Díaz, Lili Beatriz; Mendeluk, Gabriela; Quintana, Silvina; Palaoro, Luis.

Hospital de clínicas José de San Martín, Departamento de Bioquímica Clínica, Área Citología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Contacto: Dr. Luis Palaoro. Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Departamento de Bioquímica Clínica, Área Citología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; INFIBIOC - Departamento de Patología del Hospital de Clínicas José de San Martín - Instituto Fares-Taie (Mar del Plata). luispalaoro@yahoo.com.ar

Resumen Introducción: la invasión y metástasis de los carcinomas es regulada por diferentes vías de señalización, algunas de las cuales (Wnt/beta catenina, TGF β -R) regulan la transición epitelio-mesénquima (EMT). En el cáncer de cuello uterino, la proteína E6 de los virus de papiloma humano de alto riesgo (HR-HPV) desestabiliza las uniones adherentes, primer paso en el proceso invasivo. Objetivos: a) Investigar EMT en el cáncer de cuello uterino y b) Estudiar la expresión de beta catenina durante el proceso de transformación neoplásica, con relación a la expresión de E6 de HR-HPV. Materiales y métodos: Se utilizaron piezas quirúrgicas de cuellos uterinos de archivo con diversos cánceres y se practicó inmunohistoquímica con anticuerpos anti Beta Catenina, Vimentina, Alfa-Actina de Músculo liso (α SMA) y E6 de HPV 16/18. Resultados: Beta catenina: patrón periférico (membranoso) en los 2/3 superiores de lesiones de bajo grado (LSIL) (12/12) y citoplasmático en el 1/3 inferior. Negativa en adenocarcinoma (Adenok) (15/15) y carcinoma pavimentoso (CaP) (25/25). Vimentina y α SMA: negativas en todas las lesiones. E6 de HPV 16/18: positiva en las células epiteliales patológicas todas las muestras con HPV 16/18: adenocarcinoma *in situ* (AIS) 6/6, Adenok (11/11), Carcinoma pavimentoso (CaP) (9/9). Conclusiones: la vía Wnt/beta catenina y EMT no están activados en los cánceres de cuello uterino. E6 de HR-HPV desestabiliza las uniones adherentes y desencadena los procesos invasivos. Probablemente, la vía EGFR/PI3K/Akt/mTOR completaría el proceso de malignización; este ítem requiere continuar con los estudios de los procesos de activación de esta ruta.

Palabras clave: moléculas de adhesión, E6, beta catenina, vimentina, alfa-actina de músculo liso, EMT, vía EGFR/PI3K/Akt/mTOR.

Abstract Introduction: The invasion and metastasis of carcinomas are regulated by different signaling pathways, some of which (Wnt/beta catenin, TGF β -R) regulate the epithelial-mesenchymal transition (EMT). In cervical cancer, the E6 protein of the high-risk human papillomavirus (HPV) destabilizes adherent junctions, the first step in the invasive process. Objectives: a) To investigate EMT in cervical cancer and b) to study the expression of beta-catenin during the neoplastic transformation process, in relation to E6 protein expression. Materials and methods: Surgical specimens from various cervical cancers were used and immunohistochemistry was performed with antibodies to Beta catenin, Vimentin, Alpha smooth Muscle Actin (α SMA) and E6 from HPV 16/18. Results: Beta catenin showed a peripheral (membranous) pattern in the upper 2/3 of Low grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL) (12/12) and a cytoplasmic one in the lower 1/3. Negative in adenocarcinoma (Adenok) (15/15) and Squamous carcinoma (25/25). Vimentin and α SMA were negative in all lesions. All pathological epithelial cells were positive for HPV 16/18: adenocarcinoma *in situ* (AIS) 6/6, Adenok (11/11), Squamous carcinoma (9/9). Conclusion: The Wnt / beta catenin pathway and EMT are not activated in cervical cancers. The HPV E6 protein destabilizes adherent joints and triggers invasive processes. Probably, the EGFR / PI3K / Akt / mTOR pathway would complete the malignization process. It is necessary to continue the investigation of this route.

Key words: adhesion molecules, E6, beta catenin, vimentin, smooth muscle alpha-actin, EMT, EGFR / PI3K / Akt / mTOR pathway.

Introducción

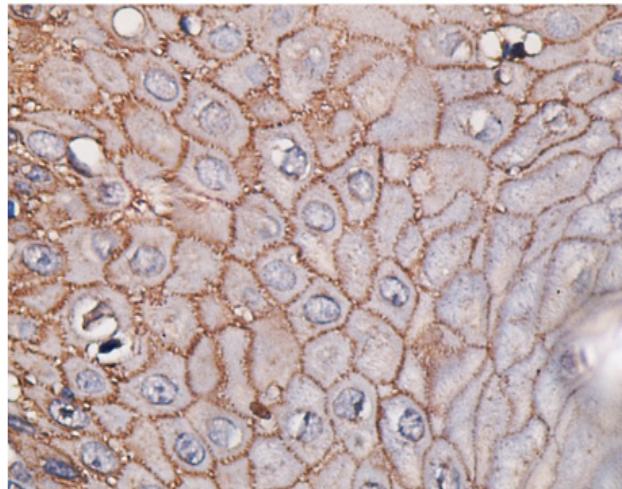
El cáncer de cuello uterino se relaciona con la presencia del virus del Papiloma Humano (HPV) [1]. La evolución desde lesiones de bajo grado (LSIL) a carcinomas depende de varias etapas, como la expresión de oncoproteínas virales (E5/E6/E7), que aumentan el número de receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) e interfieren con las proteínas de genes supresores (p53/pRb) y la integración del ADN viral al ADN celular, además de los cambios epigenéticos no del todo aclarados [2]. Sin embargo, en el proceso invasivo deben activarse diferentes vías de señalización; las vías Wnt/Beta catenina y la del receptor del factor de crecimiento tumoral beta (TGF β -R), entre otras. Estas vías se encuentran activas en procesos de transición epitelio-mesénquima (EMT) y conducen a la invasión y propagación de una variedad de carcinomas [3].

En otros cánceres, entre ellos el carcinoma de cuello uterino, se ha propuesto que podrían intervenir vías diferentes, como EGFR/PI3K/Akt/mTOR [4]. En todos los casos, la desestabilización de las uniones intercelulares es un hecho clave en la liberación de las células neoplásicas para permitir la invasión estromática.

En el caso de Wnt/Beta catenina, la beta catenina, una molécula íntimamente ligada a la Cadherina E en las uniones adherentes, se trasloca al núcleo donde actúa como un poderoso factor de transcripción, conduciendo a la célula a su transformación en tipo mesenquimático y promoviendo los mecanismos de EMT [5]. En el cáncer de cuello uterino, E6 de HPV de alto riesgo (HR-HPV) destruye la proteína MAGI, relacionada con la Cadherina E, desestabilizando la unión célula-célula [6].

El objetivo de este trabajo es a) Investigar si EMT se desarrolla en el cáncer de cuello uterino y b) Estudiar las modificaciones de la expresión de beta catenina durante el proceso de transformación neoplásica, en relación con la expresión de E6 de HR-HPV.

Figura 1. Patrón periférico de Beta catenina en EPE. Inmunomarcación y contraste con Hematoxilina- 400x.



Materiales y métodos

Se utilizaron piezas quirúrgicas de cuellos uterinos de archivo, con una antigüedad entre 7 y 35 años con las siguientes patologías: lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL) [12], carcinoma pavimentoso (CaP) [25], adenocarcinoma in situ (AIS) [6], adenocarcinoma (Adenok) [15]. Se practicó inmunohistoquímica con anticuerpos anti Beta Catenina (1:200), Vimentina (1:150), Alfa-Actina de Músculo liso (α SMA) (1:200) (Cell Marque – Rocklin, California, USA) y E6 de HPV 16/18 (1:150) (Instituto Leloir, C.A.B.A., Argentina).

Los tacos de archivo conservan la antigenicidad de las proteínas ensayadas por muchos años, sólo dos casos en que todos los anticuerpos fallaron en la detección de las proteínas ensayadas fueron eliminados de la casuística. Además, la exposición antigenica (ver más abajo) permite desenmascarar antígenos que de otra forma se perderían.

La tipificación de las muestras para HPV fue realizada con PCR y RealTime-PCR (qPCR).

Tipificación de HPV

Los cortes de 7 μ m de espesor de las piezas quirúrgicas fueron desparafinados en xilol (20 minutos a 56 °C y 20 minutos a temperatura ambiente). Cinco cortes de cada pieza se utilizaron para extraer el ADN, usando el kit *ADN HP PCR Template Preparation* (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Se desarrolló amplificación de ADN por qPCR utilizando Eva Green como colorante fluorescente intercalante (*KAPA HRM FAST*; Biosystems, Woburn, MA) con los siguientes primers: beta actin fw 5'-TGCGTGACATTAAGGAGAAG-3' and beta actin rv 5'-GCTCGTAGCTTCTCCA-3', que amplifican un fragmento de 99 bp de beta actina humana, como control de extracción de ADN y de PCR.

La detección de HPV-16 y 18 fue realizada utilizando un *Rotor Gene Thermocycler* (Qiagen, Hilden, Germany) con primers tipo-específicos para PCR [7].

Figura 2. Patrón periférico-citoplasmático de Beta catenina en EPE. Inmunomarcación y contraste con Hematoxilina- 400x.

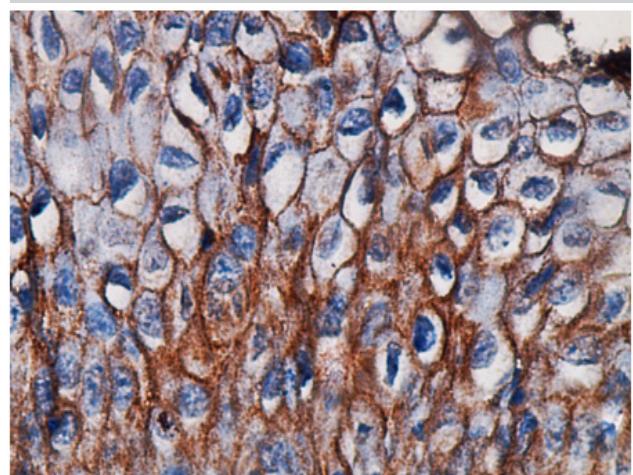
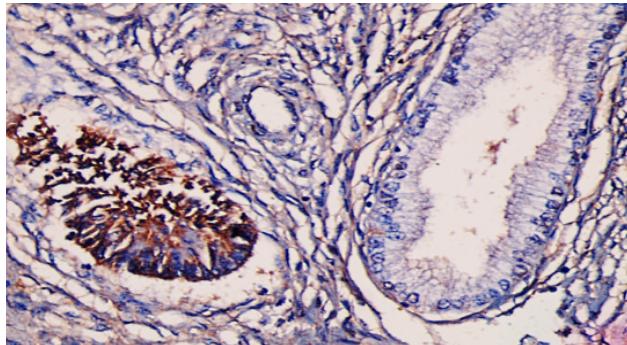


Figura 3. Beta catenina en AIS (izquierda) y en glándulas endocervicales normales (derecha). Inmunomarcación y contraste con Hematoxilina- 400x.



Inmunohistoquímica

Las piezas quirúrgicas fueron fijadas en formol al 5%, deshidratadas en alcohol de concentración creciente, clarificadas en xilol, embebidas en parafina, cortadas con micrótomo en secciones de 2 – 4 μm y montadas en portaobjetos tratados (Superfrost Plus-ESCO; Thermo Scientific-Erie Scientific Co., Portsmouth, NH). Después de ser desparafinadas, fueron hidratadas con alcohol de concentración decreciente, y sometidas a exposición antigenica en buffer citrate pH 6,0; 30 minutos a 96 – 98 °C. Luego se enfriaron en el mismo buffer por 20 minutos y se transfirieron a buffer fosfato pH 7,2 (PBS), donde se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena y de los antígenos inespecíficos. Cada muestra fue incubada overnight con los anticuerpos correspondientes, lavada con PBS, incubada con HRP Streptavidin Label (CytoscanTM HRP detection System; Cell Marque, Rocklin, CA) por 20 minutos, lavada con PBS, incubada con Polyvalent Biotinilated Link (CytoscanTM HRP detection System; Cell Marque) por 20 minutos, lavada con PBS e incubada por 10 minutos con diaminobenzidina y H_2O_2 . El desarrollo de una coloración parda indica la positividad de la reacción.

Figura 5. Desaparición de expresión de Beta catenina en CaP de cuello uterino. Inmunomarcación y contraste con Hematoxilina- 100x.

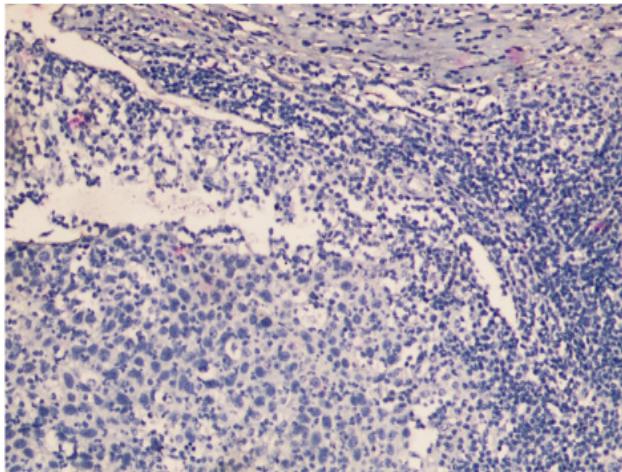
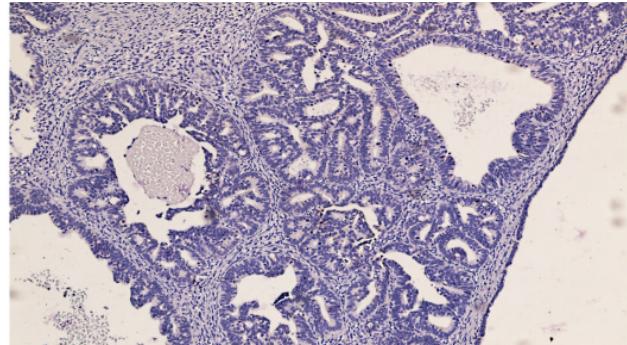


Figura 4. Desaparición de expresión de Beta catenina en Adenok de endocervix. Inmunomarcación y contraste con Hematoxilina- 100x.



Como controles negativos se dispuso de biopsias de tejidos pavimentosos o cilíndricos normales de secciones en parafina de cuello de útero removidos por patologías benignas.

Resultados

Beta catenina: presentó patrón periférico (membranoso) en EPE y en los 2/3 superiores de LSIL (12/12). Patrón citoplasmático en el 1/3 inferior de LSIL (12/12). Negativa en endocervix y positiva en células de reserva endocervicales y en AIS (6/6). Negativa en Adenok (15/15) y CaP (25/25) (Figuras 1-5).

Vimentina y α SMA fueron negativas en las células epiteliales de las diversas patologías de todas las muestras estudiadas (LSIL, CaP, AIS, Adenok). El estroma de los cortes histológicos, como se esperaba, expresó ambos marcadores, aunque con mayor intensidad α SMA (Figura 6).

E6 de HPV 16/18 fue positiva en las células epiteliales de las diversas patologías en todas las muestras con HPV 16/18: AIS (6/6), Adenok (11/11), CaP (9/9) (Figuras 7-8).

Tipificación de HPV: en todas las muestras estudiadas fue detectado HR-HPV. En los casos portadores de HPV 16

Figura 6. α SMA en CaP de cuello uterino. Inmunomarcación y contraste con Hematoxilina- 100x.

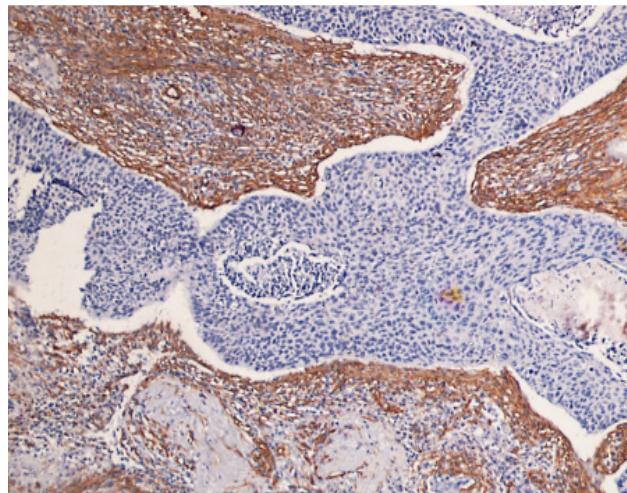
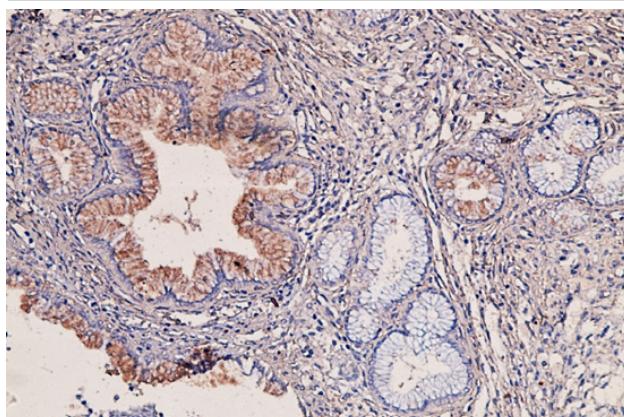


Figura 7. E6 de HPV 16/18 en Adenok de endocervix. Inmunomarcación y contraste con Hematoxilina- 400x.



y 18 se estudió la expresión de la proteína E6, como se describe en el párrafo anterior. [9/25] CaP, [6/6] AIS y [11/15] Adenok expresaron HPV 16/18 (Tabla 1).

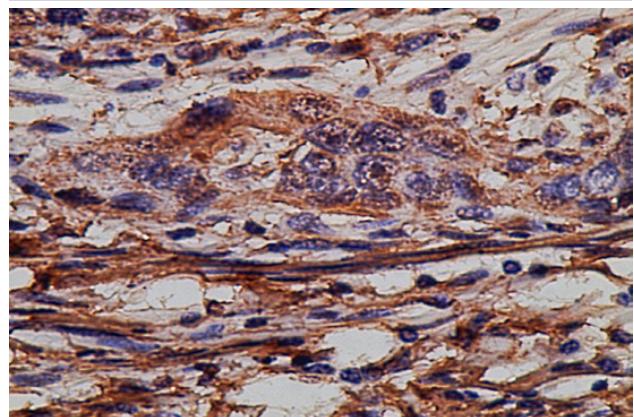
Discusión

Durante el proceso invasivo de un carcinoma, las células neoplásicas deben perder sus uniones intercelulares para permitir que la rígida estructura que caracteriza a los epitelios se debilite, permitiendo el pasaje celular a través de la membrana basal al estroma subyacente. Entre las uniones involucradas en la unión célula-célula se destaca la unión adherente, formada por moléculas de Cadherina E, la que ambas células vecinas expresan. El dominio intracelular de esta molécula se une a beta catenina, que a su vez se relaciona con el citoesqueleto de actina. La desaparición de la Cadherina E trae como consecuencia la destrucción del complejo Cad E/Beta catenina asociado a membrana [8].

En la transición epitelio-mesénquima (EMT), demostrada en varios tipos de carcinomas, son activadas vías de señalización como Wnt/beta catenina o TGF β -R, que activan diferentes factores de transcripción como Snail, Twist, etc., que conducen el bloqueo de la expresión de marcadores epiteliales e inducen la síntesis de moléculas de mesénquima. Las células cambian su citoesqueleto, que pierde su citoqueratina y expresa vimentina, y además expresan moléculas como α SMA, que contribuye a la movilidad celular [9].

Otro cambio importante es la producción de metaloproteasas que destruyen la matriz extracelular, para facilitar el avance de las células neoplásicas a través del estroma [10]. En la ruta Wnt/beta catenina, en ausencia de factores Wnt activantes de los receptores de membrana Frizzled (ruta inhibida), la beta catenina permanece unida a Cadherina E, pero a su vez a un complejo dentro del cual la enzima GSK-3 β se encarga de fosforilarla para que el exceso de esta molécula sea continuamente eliminado en el proteosoma. Cuando la vía de señalización Wnt/beta catenina se activa, el complejo mencionado se desestabiliza y la beta catenina, que deja de ser fosforilada, aumenta su concentración en el citoplasma hasta traslocarse al núcleo, donde uniéndose a

Figura 8. E6 de HPV 16/18 en CaP de cuello uterino. Inmunomarcación y contraste con Hematoxilina- 800x.



otra molécula se convierte en un poderoso factor de transcripción que induce los típicos cambios EMT. Al mismo tiempo, la Cadherina E va disminuyendo su síntesis para que las uniones célula-célula se debiliten, favoreciendo el proceso invasivo [11].

En este trabajo, el tipo de muestras analizadas permiten estudiar el fenómeno EMT, puesto que observamos la invasión del epitelio neoplásico al estroma subyacente.

Ninguno de los casos analizados mostró translocación nuclear de beta catenina, que es el gold estándar de la vía Wnt/beta catenina, por lo que se deduce que esta ruta no está activada en los cánceres de cuello uterino.

De todas maneras, para investigar si existe EMT aunque sea conducida por otra vía, se analizó la expresión de marcadores mesenquimáticos en los tumores: vimentina y α SMA, resultando negativos en todos los casos. Por lo tanto, descartamos el fenómeno EMT en carcinomas de cuello uterino.

Queda un punto importante para analizar, y son los cambios de patrón de beta catenina desde EPE hasta el carcinoma, y la relación de la proteína E6 del HPV sobre la estabilidad de las uniones adherentes. La beta catenina mantiene un patrón periférico (membranoso) en las células del EPE, en tanto que, en las primeras manifestaciones de la transformación de este epitelio, las lesiones de bajo grado o LSIL, se observa un cambio en la distribución de esta molécula, que se expresa en el citoplasma de las células parabasales. Este hallazgo implica la desestabilización de las uniones intercelulares en las partes profundas del epitelio, lo que correlaciona con los cambios morfológicos en el tercio inferior de los epitelios pavimentosos de cuello uterino que caracterizan a los LSILs, descriptos en las biopsias convencionales [12]. A diferencia del proceso EMT, la beta catenina desaparece en las lesiones avanzadas (cáncer pavimentoso y adenocarcinoma), perdiéndose totalmente la expresión citoplasmática; además, nunca es observada en núcleos.

Si no existe EMT en cáncer de cuello uterino ¿cuál será el factor desencadenante de la desestabilización de las uniones adherentes? Este interrogante podría responderse si se tiene en cuenta que los materiales estudiados estaban in-

Tabla 1. Marcadores en tejidos normales, pre-neoplásicos y neoplásicos de cuello uterino.

Marcadores	EPE	Endocervix	LSIL	CaP	AIS	Adenok
Vimentina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
α SMA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
β Catenina	Positiva (Membranoso)	Negativa	Positiva -2/3 superiores: Membranoso -1/3 inferior: Citoplasmático	Negativa	Positiva	Negativa
E6 (HPV 16/18)	Negativa	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva	Positiva

fectados por HR-HPV, donde existe una expresión constante de proteínas onco-génicas virales [E5, E6, E7]. E5 actúa en los primeros pasos de la carcinogénesis, interfiriendo con el recambio de los receptores al factor de Crecimiento Epidermico, y como consecuencia aumenta el número de los mismos en las membranas de las células neoplásicas [13]. Por su parte, E6 destruye a la proteína p53, y E7 hace lo propio con pRb, eliminando el control de los principales genes supresores sobre la mitosis [14]. Pero, además, entre otras acciones, E6 de HPV 16/18 marca a hDlG (human disc large), una proteína supresora de tumores que así es degradada, con lo cual se inestabilizan las uniones de E-Cadherina; la desregulación de estas estructuras conduce a la pérdida de la adhesión de polaridad y a la proliferación descontrolada [15]. También HPV E6 degrada a homólogos de la guanilato quinasa asociada a membranas [MAGUKs]: MAGI-2 and MAGI-3. La degradación de las MAGI perturba las uniones adherentes, donde se encuentran E-Cad y beta catenina [16]. El mecanismo es similar al descripto en apoptosis, donde las caspasas son las que destruyen a las MAGI, con el resultado de la separación de las células [16].

En este trabajo, utilizando anticuerpos anti-E6 de HPV 16/18, se demostró la expresión de esta proteína onco-génica en todos los carcinomas infectados por estos tipos virales, con lo cual se puede postular que la perturbación del patrón de beta catenina, liberándose al citoplasma para desaparecer en las lesiones malignas, sería una consecuencia de la actividad de E6 sobre ciertos componentes de las uniones adherentes. Si a este hecho se agrega el aumento de la expresión de EGFR descripto en carcinomas, y al alto porcentaje de cánceres de cuello uterino con mutaciones del gen PIK3CA [17], se puede plantear que la vía EGFR/PI3K/Akt/mTOR [18] sería la responsable de la progresión (invasión y metástasis) de los carcinomas de cuello uterino.

En los carcinomas de cuello uterino la proteína E6 de HR-HPV desestabiliza las uniones adherentes, siendo este proceso fundamental para desencadenar el desarrollo de los procesos invasivos. No se detecta EMT en los cánceres de cuello uterino, y la vía Wnt/beta catenina no está activada;

probablemente la vía EGFR/PI3K/Akt/mTOR completaría el proceso de malignización; este ítem requiere continuar con los estudios de los procesos de activación de esta ruta. El conocimiento de la vía de señalización activada en cáncer de cuello uterino permitiría ensayar inhibidores para algunos pasos fundamentales de la vía responsable de la invasión, con la posibilidad de convertirse, en un futuro, en drogas para el tratamiento del cáncer.

Referencias bibliográficas

- Doorbar J. Molecular biology of human papilloma-virus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110:525-541.
- Jiménez-Wences H, Peralta-Zaragoza O, Fernández-Tilapa G. Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review). *Oncol Rep*. 2014;31:2467-2476.
- Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signaling* 2014;7:1-16.
- Bumrungthai S, Munjal K, Nandekar S, Cooper K, Ekalaksananan T, Pientong C, Evans MF. Epidermal growth factor receptor pathway mutation and expression profiles in cervical squamous cell carcinoma: therapeutic implications. *J Transl Med*. 2015;13:244-257.
- van Noort M, Clevers H. TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer. *Dev Biol*. 2002;244:1-8.
- Accardi R, Rubino R, Scalise M, Gheit T, Shahzad N, Thomas M, et al. E6 and E7 from human papillomavirus type 16 cooperate to target the PDZ protein Na/H exchange regulatory factor 1. *J Virol*. 2011;85:8208-8216.
- Fontaine V, Mascaux C, Weyn C, Bernis A, Celio N, Lefèvre P, Kaufman L, Garbar C. Evaluation of combined general primer-mediated PCR sequencing and type-specific PCR strategies for determination of human papillomavirus genotypes in cervical cell specimens. *J Clin Microbiol* 2007;45:928-934.
- Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*. 2003;94:575-81.

9. Le Bras GF, Taubenslag KJ, and Andl CD. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell Adh Migr* 2012;6:365-373.
10. Ruff M, Leyme A, Le Cann F, Bonnier D, Le Seyec J, Chesnel F, Fattet L, Rimokh R, Baffet G, Théret N. The Disintegrin and Metalloprotease ADAM12 Is Associated with TGF- β -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition. *PLoS One*. 2015;10:e0139179.
11. Duchartre Y, Kim YM, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;99:141-149.
12. Dallenbach-Hellweg G, von Knebel Doeberitz M, Trunk MJ. Color atlas of histopathology of the cervix uteri. Editor: Gabriele Schröder. 2º Ed. Springer Heidelberg, Germany; 2006.
13. Kim S-H, Juhnn Y-S, Kang S, Park S-W, Sung M-W, Bang Y-J, Song Y-S. Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ ERK1,2 and PI3K/AktCell. *Mol. Life Sci.* 2006;63:930–938.
14. Thomison J, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Human Pathology* 2008;39:154–166.
15. Gardiol D, Kuhne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R, Banks L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*. 1999;18:5487–5496.
16. Kranjec C, Massimi P, Banks L. Restoration of MAGI-1 expression in HPV positive tumour cells induces cell growth arrest and apoptosis. *J Virol*. 2014;88:7155-7169.
17. Henken FE, Banerjee NS, Snijders PJ, Meijer CJ, De Castro AJ, Rosl F, et al. PIK3CA-mediated PI3-kinase signalling is essential for HPV-induced transformation in vitro. *Mol Cancer*. 2011;10:71-77.
18. Zhang L, Wu J, Ling MT, Zhao L, Zhao KN. The role of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in human cancers induced by infection with human papillomaviruses. *Mol Cancer*. 2015;14:87.