

Perfiles de proliferación celular y apoptosis en el modelo murino de regeneración epitelial K6b-E6/E7

José Bonilla-Delgado,* Genaro Rodríguez-Uribe,** Enoc Mariano Cortés-Malagón,**
Mónica Sierra-Martínez,* Gustavo Acosta-Altamirano,* Patricio Gariglio-Vidal**

Resumen

Introducción: los mamíferos poseen una capacidad de regeneración epitelial limitada. El modelo K6b-E6/E7 se ha descrito como útil para el estudio de la regeneración epitelial. El objetivo de este estudio es correlacionar la expresión de los oncogenes E6/E7-VPH16 con los perfiles de proliferación celular y apoptosis en la fase de epitelización y después de ésta. La hipótesis del estudio es que la alteración en la proliferación celular y la apoptosis sólo se refleja durante la epitelización.

Material y métodos: se realizó una herida profunda de 2 mm de diámetro en el centro de la oreja mediante un orador; tras 72 horas y 2 semanas postherida se tomó una biopsia de la zona de epitelización y se analizaron los niveles de proliferación celular (mediante inmunohistoquímica) y de apoptosis (mediante TUNEL) en comparación con ratones no-transgénicos. Estos resultados se correlacionaron con la expresión de E6/E7 mediante RT-PCR *in situ*.

Resultados: la cepa transgénica K6b-E6/E7 tuvo mayor proliferación celular y menor apoptosis en el borde de epitelización en comparación con la cepa silvestre. Este efecto se confinó a los estratos suprabasales del frente de la lesión. A las dos semanas postherida los niveles de proliferación celular y apoptosis fueron semejantes en ambas cepas, lo que concordó con la disminución en la expresión de los oncogenes E6/E7.

Conclusiones: el modelo de regeneración epitelial K6b-E6/E7 es útil para el tratamiento de heridas profundas.

Palabras clave: E6/E7, epitelización, proliferación, apoptosis.

Abstract

Background: mammals have limited epithelial regeneration capacity. The K6b-E6/E7 mice model has been described as useful for the study of epithelial regeneration. The objective of this study is to compare the expression of E6/E7 oncogenes with those of cell proliferation and apoptosis during epithelization. The hypothesis of this study is that alterations in cell proliferation and apoptosis in K6b-E6/E7 mice will only occur during epithelization.

Methods: deep 2 mm punches were performed in the middle of transgenic and control mice's ears. A biopsy was collected from the epithelization zone 72-hours and 2-weeks post-injury. Assays for cell proliferation and apoptosis were carried out by immunohistochemistry and TUNEL techniques, respectively. RT-PCR *in situ* was performed to compare E6/E7 expressions in the areas studied.

Results: transgenic strain K6b-E6/E7 presented more proliferative cells and less apoptotic cells in epithelized zones. This effect was limited to suprabasal stratum only, and correlates with E6/E7 oncogenes expression. Two weeks post-injury, cell proliferation and apoptosis were similar in both samples as the E6/E7 expression went down.

Conclusion: K6b-E6/E7 mouse model is useful for epithelial regeneration. Its mechanisms should be considered for the treatment of deep wounds.

Key words: E6/E7, epithelization, proliferation, apoptosis.

* Laboratorio de Genética y Diagnóstico Molecular. Unidad de Investigación. Hospital Juárez de México.

** Laboratorio de Oncología Molecular. Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Correspondencia:

Dr. en C. Patricio Gariglio Vidal.

Laboratorio de Oncología Molecular (No. 24). Departamento de Genética y Biología Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, 07360 México, D.F.

Tel.: 52 (55) 57473337, Fax: 52 (55) 57473331

Correo electrónico: vidal@cinvestav.mx, jbonilla@cinvestav.mx

Recibido para publicación: 05-01-2012

Aceptado para publicación: 05-07-2012

Introducción

Las lesiones en la piel suelen repararse mediante el proceso de cicatrización; es decir, que se forma una cicatriz en la zona lesionada. Sin embargo, en los anfibios la reparación epitelial lleva a la reconstitución de todos los tipos celulares a través de un proceso de "regeneración epitelial".^{1,2} Como mamíferos, nuestra capacidad para regenerar tejidos es muy limitada y se limita sólo a ciertos órganos, como el hígado.³

Al carecer de regeneración epitelial, los mamíferos reparan tejidos en tres fases de cicatrización: fase inflamatoria, de epitelización y de remodelación de tejido.⁴ Durante la fase inflamatoria se liberan al sitio de la lesión factores de crecimiento y quimiocinas que desencadenan procesos angiogénicos y de deposición de matriz extracelular. En res-

puesta a estos factores, los queratinocitos localizados en el borde de la lesión elevan su tasa de proliferación celular en la capa basal y migran desde el estrato espinoso para formar un borde de epitelización y cubrir así el sitio de la lesión. En general, la regeneración epitelial y la cicatrización se inician de manera muy similar. Ambos procesos se caracterizan por la proliferación y migración de queratinocitos hacia la zona de la herida. Sin embargo, en la regeneración epitelial, la proliferación y migración de los queratinocitos es superior y tiende a formar una estructura distal al sitio de la herida, compuesta de tejido epitelial y mesenquimatoso, conocida como blastema.^{1,5,6}

Hace casi 35 años se afirmó que la reparación epitelial de porciones horadadas en orejas de conejo era un proceso de regeneración epitelial auténtico,⁷ aunque este fenómeno no se haya visto en otro tipo de mamíferos. Actualmente, los modelos MRL⁸ y K6b-E6/E7^{9,10} son los únicos modelos murinos para el estudio de la regeneración epitelial. El grupo de trabajo de este estudio reportó, recientemente, que el modelo K6b-E6/E7 poseía una forma de epitelización semejante a una blastema y la capacidad de reconstituir el cartílago de las zonas lesionadas y los folículos pilosos.⁹

El objetivo de este estudio es caracterizar los niveles de proliferación celular y apoptosis en el modelo de regeneración epitelial K6b-E6/E7 durante y después de la epitelización. Estos niveles se correlacionaron con la expresión inducida de los oncogenes E6/E7. La hipótesis del trabajo es que los niveles de proliferación celular y apoptosis sólo se alterarán cuando hay E6/E7 durante la epitelización. Esta información podría servir de base para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para heridas crónicas humanas de difícil tratamiento.

Material y métodos

Manipulación y uso de ratones transgénicos

Los ratones transgénicos utilizados en este estudio proceden de la línea transgénica Tg (K6b-E6/E7) M8.¹⁰ El fondo genético original de esta cepa (CD1) cambió a FvB/N luego del cruzamiento con ratones FvB/N por más de 15 generaciones. En este estudio se utilizaron ocho ratones macho transgénicos y control (FvB/N) de siete semanas de edad por experimento. Se les realizó una horadación de 2 mm en el centro de la oreja (entre las dos venas principales). Todos los procedimientos reportados en este protocolo han sido previamente aprobados por el Comité de Bioética del Bioterio del CINVESTAV-IPN (UPEAL-CINVESTAV-IPN, México; NOM-062-ZOO-1999) y se basan en las recomendaciones propuestas por la Asociación Americana para el Manejo de Animales de Laboratorio (AALAC). Las orejas fueron re-

movidas, fijadas en PBS 1X-4% paraformaldehído y embebidas en bloques de parafina para hacer cortes de 5 µm de espesor después de 72 horas y dos semanas postherida para obtener los resultados histológicos presentados aquí.

Inmunohistoquímica

Los cortes de las zonas horadadas se desparafinaron mediante dos cambios de xileno, rehidratadas mediante xileno-etanol 1:1 y porcentajes graduales de una mezcla etanol-agua. Enseguida se lavaron con PBS 1X y trataron con recuperación antigénica a 121°C en *buffer* de citratos (10 mM citrato de sodio, pH: 7.2) durante 20 minutos. Enseguida de la recuperación antigénica, las secciones se lavaron en PBS 1X y bloquearon con 100 µL de solución de bloqueo 1A (Invitrogene, U.S.A.) durante 30 minutos y con 100 µL de solución de bloqueo 1B (Invitrogene, U.S.A.) durante 10 minutos. El anticuerpo primario PCNA (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.) se diluyó 1:100 en una solución que contenía suero de albúmina bovina al 1% y se aplicó a los tejidos durante 12 horas a 4°C en cámara húmeda. Las secciones se lavaron tres veces con PBS 1X, y después se incubaron durante 30 minutos con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Invitrogene, U.S.A.). Por último, se utilizó 3, 3'-diaminobencidina como sustrato cromógeno de acuerdo con las instrucciones del fabricante para su posterior contraindicación con hematoxilina (Fisher Scientific, U.S.A.) durante un minuto.

PCR y RT-PCR *in situ*

Los tejidos desparafinizados se rehidrataron, trataron con HCl 0.02 N, permeabilizaron (PBS 1X-0.01% triton X100-0.5 µg/mL proteinasa K) y se bloquearon con anhídrido acético 0.25%-0.1 M trietanolamina-ácido acético 20%. La reacción de PCR se amplificó en un termociclador GeneAmp *in situ* PCR System 1000 (Perkin-Elmer, U.S.A.); cada reacción para la detección del marco de lectura de E6/E7 comprende la siguiente mezcla: 37 µL de H₂O, 5 µL de *Buffer* 10X, 1 µL de primer PU-2R (5'GAGCTGTCGCTTAATTGCTC'3), 1 µL de primer PU-1M (5'TGTCAAAAACCGTTGTGTCC'3), 2.5 µL de PCR-DIG (Invitrogene, U.S.A.), 3 µL de MgCl₂ y 0.5 µL de Taq polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron: 94°C/1 minuto, 61°C/30 s y 72°C/3 minutos durante 15 ciclos de amplificación. Para la detección del amplificado, los tejidos se lavaron con PBS 1X y bloquearon (100 µL Tris 1M, pH:7.4-27 µL NaCl 4M-50 mg BSA-873 µL H₂O) para su posterior incubación con Anti-Digoxigenina-AP 1:200 (Invitrogene, U.S.A.) durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, el exceso de anticuerpo se lavó (34.5 mL H₂O-1.5 mL NaCl 4M-Tris 1M, pH:7.4-

40 μ L Tween 20) para incubar la reacción con el cromógeno BCIP/NB (Invitrogene, U.S.A.) y finalmente montar las laminillas con Permount® (Fisher Scientific, U.S.A.). Los tejidos destinados para RT-PCR *in situ* (a diferencia de los destinados para PCR *in situ*), llevan un paso previo de incubación con DNAasa 0.1 U/ μ L durante dos días a temperatura ambiente, antes de los ciclos de amplificación.

Técnica de TUNEL

Los tejidos desparafinizados se rehidrataron, trataron con HCl 0.02 N y permeabilizaron (PBS 1X-0.1% triton X100-0.5 μ g/mL proteinasa K) durante 15 minutos. Después el tejido se incubó con el kit *in situ* Cell Death Detection Kit AP (Roche, U.S.A.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Al termino de la incubación, las laminillas se montaron con un medio de montaje para fluorescencia Fluoromount-G (Roche, U.S.A.).

Análisis estadístico

Como se mencionó anteriormente, una “n” de 8 réplicas biológicas (ratones) se utilizó por experimento de acuerdo a los resultados previamente reportados.⁹ La señal cromogénica se cuantificó a partir de campos obtenidos mediante un aumento de 40X y por conteo de los pixeles de la señal positiva utilizando el programa Image-Pro Plus 7.0 *software program* (Media Cybernetics, U.S.A.) para el cual se utilizó una prueba estadística de t de Student mediante el programa SPSS 13.0 *software package* (IBM, U.S.A.).

Resultados

El modelo murino K6b-E6/E7 expresa los oncogenes E6/E7 del virus del papiloma humano tipo 16 bajo el control de un promotor de citoqueratina 6b (K6b).^{9,10} Este tipo de promotor permite que los oncogenes E6/E7 no se expresen en la piel a menos que se realice una lesión.⁹ Por consiguiente, el primer paso fue realizar una lesión en la piel mediante un horador; se escogió realizar la lesión en las orejas debido a su fácil manipulación y porque no requieren depilación previa. 72 horas postherida se tomó una biopsia de la zona de epitelización para las dos cepas (control y transgénica) y se genotipificaron los oncogenes E6/E7 mediante PCR *in situ* para demostrar que estaban en la cepa transgénica, pero no en la cepa control (Figura 1).

Una vez demostrado que hay oncogenes E6/E7, la siguiente etapa fue demostrar que los oncogenes se expresan durante la epitelización en el ratón transgénico y no en el de control. Durante el proceso normal de recambio epitelial,

los queratinocitos basales (que expresan el par de citoqueratinas: K5/K14) pierden proteínas de anclaje, que van a la membrana basal, y son desplazados hacia el estrato espinoso donde expresan el par de citoqueratinas K1/K10.¹¹ Sin embargo, cuando la epidermis se lesiona (en respuesta a los niveles de IL-1 liberados en el sitio de la lesión), los queratinocitos basales del borde de la lesión optan por el cambio de citoqueratinas K6/K16 al ascender al estrato espinoso.^{5,12} Como se muestra en la Figura 2, la señal citoplasmática de E6/E7 en el frente de la lesión (en recuadro) es alta durante la epitelización; esta señal es específica y no cruza con mensajeros endógenos para la cepa control.

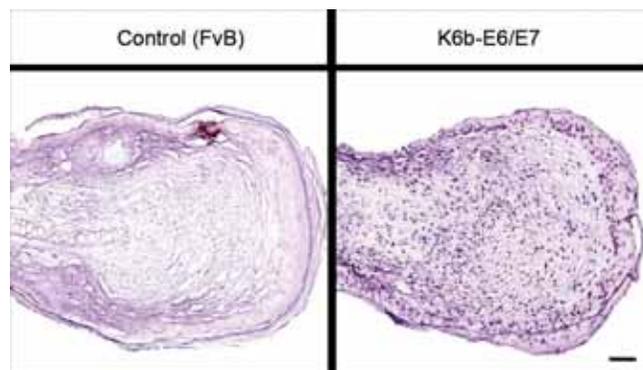


Figura 1. Genotipificación de los oncogenes E6/E7. Técnica de PCR *in situ* para la genotipificación de la cepa transgénica K6b-E6/E7. La señal positiva se muestra como núcleos de color morado. Aumento: 40X; barra de escala= 30 μ m.

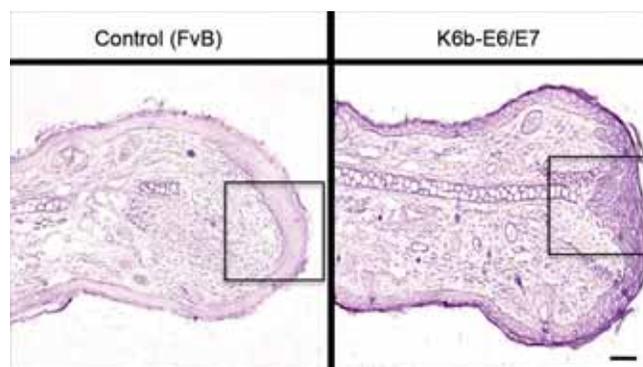


Figura 2. Expresión de los oncogenes E6/E7. Técnica de RT-PCR *in situ* que muestra la señal citoplasmática de E6/E7 (citoplasmas morados). La señal de E6/E7 se confina principalmente a la zona de epitelización (señalado con un recuadro). Aumento: 40X; barra de escala= 30 μ m.

Los efectos clásicos de los oncogenes E6/E7 sobre las células que los contienen son el bloqueo apoptótico p53-dependiente por acción de la oncoproteína E6¹³ y el aumento en los niveles de proliferación celular a través de la inactivación de pRb por oncoproteína E7.¹⁴ La siguiente etapa

consistió en determinar si los oncogenes E6/E7 podrían alterar los niveles de proliferación celular y apoptosis en éste modelo durante la epitelización. Como puede apreciarse en la Figura 3, los niveles de PCNA (marcador de proliferación celular) tienen un incremento notable en los estratos suprabasales (en recuadro) durante la fase de epitelización en el ratón K6b-E6/E7. Para el caso del ratón silvestre, las células proliferantes se limitaron siempre a la capa basal.

Posteriormente se determinaron los perfiles de apoptosis mediante la técnica de TUNEL, como se aprecia en la Figura 4, los niveles de apoptosis disminuyen drásticamente en el frente de la lesión para la cepa transgénica K6b-E6/E7 en contraposición con su versión silvestre. Por último, se cuantificaron y compararon los niveles de proliferación celular, apoptosis y expresión de E6/E7 en ambas cepas durante la epitelización (72 horas post-herida) y después de ésta (2 semanas post-herida). Como puede apreciarse en el Cuadro I, transcurrida la fase de epitelización (2 semanas post-herida), los niveles de proliferación celular y apoptosis para ambas cepas son muy semejantes, lo que sugiere que los efectos de los oncogenes E6/E7 en nuestra cepa transgénica se limitan únicamente a la fase de epitelización (contrario a lo que ocurre en cáncer) y no se conservan o aumentan una vez concluida la expresión de E6/E7.

Discusión

La citoqueratina K6b sólo suele encontrarse expresada en folículos pilosos en fase anágena.¹⁵ Su función primordial es proporcionar filamentos intermedios “cortos” que le permitan a los queratinocitos migrar hacia la papila dérmica (para el caso de folículos pilosos) o hacia el sitio de una

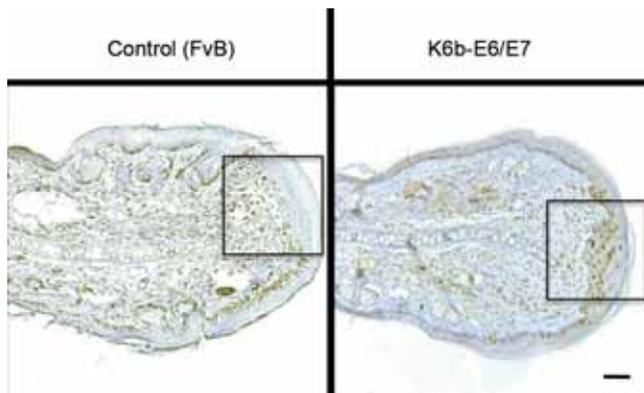


Figura 3. Perfiles de proliferación celular en el modelo K6b-E6/E7. Inmunohistoquímica para la detección del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Se observa un incremento en la señal de PCNA en estratos basales y suprabasales (señalado con un recuadro). Aumento: 40X; barra de escala=30 μ m.

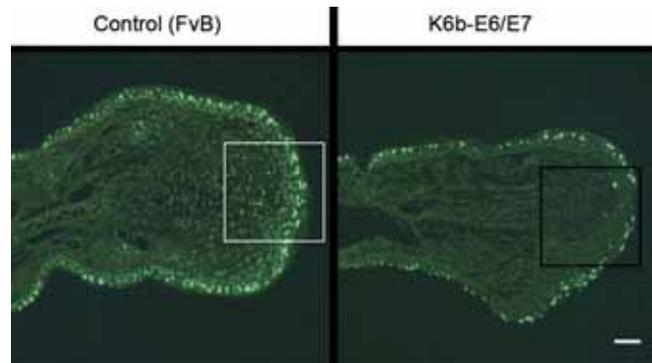


Figura 4. Perfiles de apoptosis en el modelo K6b-E6/E7. Ensayo de TUNEL que muestra una disminución de células apoptóticas para el ratón K6b-E6/E7 (señalado con un recuadro). Aumento: 40X; barra de escala= 30 μ m.

lesión durante la epitelización.^{4,15} En el caso de la epidermis interfolicular, la citoqueratina K6b rara vez se expresa. Sin embargo, se ha reportado que ésta es capaz de expresarse mediante la aplicación exógena de ácido retinoico en estratos suprabasales de piel no lesionada.¹² La vía más común de activación de K6b ocurre durante la fase inflamatoria, en particular, en respuesta a IL-1.¹⁶ El modelo murino de este estudio también presenta un comportamiento interesante en folículos pilosos, donde hay una fase anágena extendida en comparación con la cepa silvestre.¹⁰

El grupo de este estudio había reportado que, tras una herida profunda, la cepa K6b-E6/E7 suele presentar una epitelización más completa y rápida, semejante a la de epidermis de anfibios, en comparación con un ratón silvestre.⁹ El efecto de los oncogenes durante la epitelización y después no se había descrito y constituye el objetivo de este trabajo.

Los oncogenes E6 y E7 procedentes de virus del papiloma humano de alto riesgo deben su potencial oncogénico a su capacidad de inmortalizar queratinocitos primarios en cultivos.^{17,18} Los modelos murinos con promotor de citoqueratina 14 (K14) han mostrado su capacidad de inducir tumores y cáncer en piel.¹⁹ No es el caso de este modelo de ratón transgénico. En el caso de ratones K6b-E6/E7, la expresión de los oncogenes E6/E7 no es constitutiva, sino inducible y se restringe a los estratos suprabasales que se caracterizan por poseer células diferenciadas y carecer células madre somáticas.⁴

Es posible, al menos en teoría, que construcciones semejantes a las utilizadas en el modelo K6b-E6/E7 puedan transfectarse transitoriamente en queratinocitos humanos cultivados y, de esta manera, usarse en ciertas heridas de difícil tratamiento en la clínica (como úlceras diabéticas). El estudio de los mecanismos de este tipo de modelos es importante para humanos y podría ayudar a desarrollar estrategias terapéuticas aplicables en clínica.

Cuadro I. Niveles relativos de E6/E7, PCNA y TUNEL a las 72 horas y dos semanas postherida

	72 h-post herida		2 sem-post herida	
	Control (FvB)	K6b-E6/E7	Control (FvB)	K6b-E6/E7
Expresión de E6/E7	213 ± 69	3148 ± 250	234 ± 102	350 ± 111
p=	1.73E-14		No significativo	
Señal de PCNA	45 ± 19	2285 ± 270	98 ± 29	72 ± 22
p=	1.25E - 12		No significativo	
Señal de TUNEL	736 ± 55	45 ± 23	408 ± 90	499 ± 151
p=	1.24E - 14		0.16	

h = hora; sem = semanas; PCNA = antígeno nuclear de proliferación celular.

Se muestra la señal positiva de cada experimento en valores arbitrarios. Los valores se obtuvieron tal y como se describe en "Material y métodos". Se señalan en negritas los valores de los dos tiempos de la cepa transgénica; observe como a las dos semanas postherida no hay diferencia significativa entre la cepa control y transgénica.

Conclusión

El modelo de regeneración epitelial K6b-E6/E7 es útil para el tratamiento de heridas profundas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Rodolfo Ocadiz Delgado, Enrique Garcia Villa y Elizabeth Alvares Rios por su asistencia técnica y a Gabriela Mora-Macias por su ayuda secretarial.

Referencias

1. Brockes JP, Kumar A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:566-574.
2. Morrison JI, Löff S, He P, Simon A. Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population. *J Cell Biol* 2006;172(3):433-440.
3. Carlson BM. Some principles of regeneration in mammalian systems. *Anat Rec B New Anat* 2005;287B(1):4-13.
4. Martin P. Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* 1997;76(4):75-81.
5. Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res* 2005;304(1):274-286.
6. Echeverri K, Tanaka EM. Ectoderm to Mesoderm Lineage Switching During Axolotl Tail Regeneration. *Science* 2002;298(5600):1993-1996.
7. Goss RJ, Grimes LN. Epidermal downgrowths in regenerating rabbit ear holes. *J Morphol* 1975;146(4):533-542.
8. Clark LD, Clark RK, Heber-Katz E. A New Murine Model for Mammalian Wound Repair and Regeneration. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;88(1):35-45.
9. Valencia C, Bonilla-Delgado J, Oktaba K, Ocadiz-Delgado R, Gariglio P, Covarrubias L. Human Papillomavirus E6/E7 Oncogenes Promote Mouse Ear Regeneration by Increasing the Rate of Wound Re-epithelization and Epidermal Growth. *J Invest Dermatol* 2008;128:2894-2903.
10. Escalante-Alcalde D, Recillas-Targa F, Valencia C, Santa-Olalla J, Chávez P, Marroquín A, et al. Expression of E6 and E7 papillomavirus oncogenes in the outer root sheath of hair follicles extends the growth phase and bypasses resting at telogen. *Cell Growth Differ* 2000;11(10):527-539.
11. Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature* 2007;445:834-842.
12. Navarro JM, Casatorres J, Jorcano JL. Elements Controlling the Expression and Induction of the Skin Hyperproliferation-associated Keratin K6. *J Biol Chem* 1995;270:21362-21367.
13. Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes PJ. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol* 2008;153(3):397-408.
14. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 2009;384(2):335-344.
15. Takahashi K, Paladini RD, Coulombe PA. Cloning and Characterization of Multiple Human Genes and cDNAs Encoding Highly Related Type II Keratin 6 Isoforms. *J Biol Chem* 1995;270:18581-18592.
16. Rothnagel JA, Seki T, Ogo M, Longley MA, Wojcik SM, Bundman DS, et al. The mouse keratin 6 isoforms are differentially expressed in the hair follicle, footpad, tongue and activated epidermis. *Differentiation* 1999;65(2):119-130.
17. Wazer DE, Liu XL, Chu Q, Gao Q, Band V. Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(9):3687-3691.
18. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-350.
19. Song S, Pitot HC, Lambert PF. The Human Papillomavirus Type 16 E6 Gene Alone is Sufficient To Induce Carcinomas in Transgenic Animals. *J Virol* 1999;73(7):5887-5893.