



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Inhibición de las vías TGF- β y Wnt/ β -catenina por medio de un
nuevo inhibidor de HDAC en la catarata del ratón transgénico
K14E6”**

TESIS

Que presenta

M. en C. GENARO RODRÍGUEZ URIBE

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GÉNÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de la Tesis:

**DR. PATRICIO GARIGLIO VIDAL
DR. JOSE BONILLA DELGADO**

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2018

Asesores

Dra. Rosa María Bermudez Cruz

Investigadora

Departamento de Genética y Biología Molecular

CINVESTAV, Unidad Zacatenco

Dr. Luis Kameyama Kawabe

Investigador

Departamento de Genética y Biología Molecular

CINVESTAV, Unidad Zacatenco

Dra. Teresa Mancilla Percino

Investigadora

Departamento de Química

CINVESTAV, Unidad Zacatenco

Dr. Adan Moreno Eutimio

Investigador

Laboratorio de Inmunología

Hospital Juárez de México, SSA

El presente proyecto fue realizado en el laboratorio 24 y 25 a cargo del Dr. Patricio Gariglio Vidal, del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) y en el laboratorio de Genética del Hospital Juárez de México de la Secretaría de Salud a cargo del Dr. Jose Bonilla Delgado, del Hospital Juárez de México de la Secretaría de Salud. Las isoindolinas se sintetizaron, purificaron y caracterizaron en el laboratorio 10 del Departamento de Química del CINVESTAV por la Dra. Teresa Mancilla Percino.

Este trabajo fue llevado a cabo con el apoyo económico y beca crédito No. 322599 ambos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT).

Agradecimientos

A mi familia, especialmente a mi padre David Rodríguez Sevilla y mi madre Reyna Guadalupe Uribe García por el apoyo que me han dado.

Al Dr. Patricio Gariglio Vidal y al Dr. José Bonilla Delgado por la dirección de este proyecto desde su inició hasta la publicación.

A la Dra. Teresa Mancilla Porcino por acercarme un poco a la Química y por su apoyo en la síntesis de las isoindolinas aquí utilizadas.

A la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, el Dr. Luis Kameyama Kawabe y Dr. Adán Moreno Eutimio por sus acertadas observaciones y sabios consejos.

Al Dr. Nicolás Serafín Higuera por su enseñanza y paciencia con respecto a las técnicas y procedimientos necesarios en el presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, generación, personal de apoyo y personas de otros departamentos e instituciones que colaboraron para hacer realidad el trabajo que aquí se presenta.

A los investigadores anteriormente no mencionados del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV por formarme como Doctor en Ciencias en la especialidad de Genética y Biología Molecular.

A la Dra. Nadia Morán García por su compañía y cariño a lo largo de este arduo camino.

Por eso y mucho más les estoy eternamente agradecido.

Genaro Rodríguez Uribe

“ Nunca se alcanza la verdad total, ni nunca se está totalmente alejado de ella.”

Aristóteles (384 a 322 a.C.)

Abreviaturas

EA	Epitelio anterior
ASC	Catarata capsular anterior
cDNA	DNA complementario
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
COL1A1	Colágeno 1A1
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EMT	Transición epitelio mesénquima
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GSK3b	Glucógeno cinasa sintasa 3b
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Histonas desacetilasas
HE	Hematoxilina-Eosina
IGF	Factor de crecimiento parecido a la insulina
iHDAC	Inhibidores de HDAC
IL-1	Interleucina-1
K14	Promotor de la queratina 14
CC	Cápsula del cristalino
NC	Núcleo del cristalino
EMT	Transición Epitelio Mesénquima
F	Fibras del cristalino
FN1	Fibronectina 1
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MEC	Matriz extra celular
MTA1	Proteína asociada a metástasis 1
MMP	Metaloproteinasa de matriz
NT	No transgénico
NuRD	Complejo de remodelación y desacetilación del nucleosoma
ORF	Marco de lectura abierto
OCP	Opacidad capsular posterior
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PN	Post natal
Rb	Retinoblastoma
D.E.	Desviación estándar
SAHA	Ácido hidroxámico suberoilánilida
TCF	Factor de células T
TGF- β	Factor de crecimiento de fibroblastos β
TGF- β R	Receptor de TGF- β
TSA	Tricostatina A
TTL	<i>Linker</i> de terminación de la traducción
ZT	Zona de transición
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
VPH	Virus del Papiloma Humano
ZO-1	Zónula Ocludens 1

Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos usados para procedimientos de genotipificación, RT-PCR y RT-qPCR.....	14
---	----

Índice de Figuras

Figura 1. Formación de Opacidad Capsular Posterior (OCP) secundario a la remoción quirúrgica.....	05
Figura 2. Expresión transgénica del oncogén E6 del virus de papiloma humano desarrolla catarata.....	20
Figura 3. La catarata muestra una localización anormal de células nucleadas proliferativas en el ratón transgénico K14E6.....	21
Figura 4. Vía de señalización TGF- β es activada en la catarata del ratón transgénico K14E6.....	23
Figura 5. La oncoproteína E6 induce la expresión de marcadores de EMT.....	25
Figura 6. La oncoproteína E6 muestra un incremento en la producción y actividad de las metaloproteinasas.....	26
Figura 7. Incremento de β -catenina en el cristalino del ratón transgénico K14E6.....	28
Figura 8. El receptor nuclear MTA1 incrementa su expresión en el cristalino del ratón K14E6.....	29
Figura 9. Evaluación por <i>docking molecular</i> de la isoindolinas 2-substituidas en el sitio catalítico de HDAC.....	30
Figura 10. Incremento de la proteína Smad7 de manera dosis dependiente por isoindolinas 2b iHDAC.....	33
Figura 11. Supresión de genes responsivos a TGF- β por isoindolina 2b en la catarata del ratón K14E6.....	34
Figura 12. Reducción del número de células nucleares proliferativas por isoindolinas 2b en la catarata del ratón K14E6.....	36

Índice

Asesores.....	ii
Agradecimientos.....	iv
Abreviaturas.....	vi
Índice de Tablas.....	viii
Índice de Figuras.....	viii
Índice.....	ix
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Justificación.....	9
Hipótesis.....	10
Objetivo General.....	10
Objetivos Específicos.....	10
Material y Métodos.....	11
Generación del ratón transgénico K14E6.....	11
Procedimiento de tejido ocular y análisis histopatológico.....	11
Genotipificación y expresión de mRNA del transgén E6.....	12
PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	12
RT-PCR <i>in situ</i>	13
Inmunohistoquímica.....	15
Inmunofluorescencia.....	15
Western blot.....	16
Zimograma.....	16
Ensayo de <i>docking molecular</i>	16
Selección de isoindolinas y protocolo de tratamiento.....	17
Análisis y cuantificación de imágenes digitales.....	18
Análisis estadístico.....	18
Resultados.....	19

Validación del modelo del ratón transgénico en el cristalino.....	19
Cambios histológicos en el cristalino de ratones transgénico.....	19
La vía de señalización TGF- β en la catarata del ratón transgénico.....	22
Expresión de los marcadores de EMT en la catarata del ratón K14E6.....	24
Incremento en la expresión y actividad de MMPs en catarata del ratón transgénico.....	24
Incremento de los niveles nucleares de la proteína β -catenina en la catarata del ratón transgénico K14E6.....	27
Incremento de MTA1 en la catarata K14E6.....	28
Selección de isoindolinas 2-sustituidas como inhibidor de HDAC.....	30
Isoindolina 2b aumentan el nivel de la proteína Smad7 y suprimen la expresión de genes responsivos de TGF- β	32
Discusión	37
Conclusión	41
Perspectivas	41
Bibliografía	42
Anexo I. Primera página de publicación del trabajo en revista indexada.....	50
Anexo II. Solicitud de patente ante el IMPI.....	51

Resumen

La catarata es una opacidad del cristalino que conduce a la ceguera. En México, se considera un problema de salud pública, ya que afecta a un millón seiscientos mil personas sumándose cada año de cincuenta mil a sesenta mil casos nuevos. El tratamiento actual es la remoción de la catarata de forma quirúrgica. Sin embargo, cinco años posteriores a la intervención quirúrgica, un 30 a 40% presentan una complicación llamada Opacidad Capsular Posterior (OCP). Esta es ocasionada por una transdiferenciación de las células epiteliales (residuales a la cirugía) a células mesenquimales capaces de producir material extracelular que genera la opacidad del cristalino. Este fenómeno es denominado transición epitelio-mesénquima (EMT). La vía TGF- β y la activación de β -catenina están involucradas en la inducción de la EMT en el ojo de pacientes post-operados. Este proceso de fibrosis, también es importante en otros procesos patológicos como la fibrosis hepática, pulmonar y renal. El ratón transgénico K14E6 ha sido utilizado como modelo para el estudio de cáncer cervicouterino, la expresión del oncogén E6 en el ojo genera la formación de catarata posterior al nacimiento. Por lo que este trabajo tiene como objetivo determinar los cambios catarogénicos generados por EMT que ocurren en el cristalino de ratones K14E6 asociados a la activación de las vías TGF- β y Wnt/ β -catenina.

Las cataratas del ratón K14E6 fueron analizadas por histología y los componentes de las vías TGF- β y Wnt/ β -catenina fueron evaluados por Western blot, RT-qPCR, RT-PCR *in situ*, IHC e IF. Las Metaloproteinasas asociadas a EMT fueron también analizadas usando zimograma. La estabilización endógena de la proteína Smad7 fue evaluada con el uso de un inhibidor de HDAC. Los ratones K14E6 presentaron cataratas binoculares, una pérdida de la organización del tejido, licuefacción cortical y un incremento en el número de células nucleadas hiperproliferativas con características parecidas a mesénquima en el cristalino en el 100% de los animales. Los cambios en la morfología de las células del cristalino fueron debidos a una reorganización de los filamentos de actina, a la activación de las vías TGF- β y Wnt/ β -catenina, así como a la acumulación de la oncoproteína MTA1. Finalmente, la estabilización de la proteína Smad7 mediante la administración de inhibidores de HDAC disminuyó la proliferación celular, así como los niveles de la proteína MTA1. En conclusión, la oncoproteína E6 de VPH16 induce EMT en la catarata de los ratones transgénicos. El mecanismo molecular puede involucrar a las vías TGF- β y Wnt/ β -catenina, sugiriendo que el ratón transgénico K14E6 puede ser un modelo útil para el estudio o el tratamiento de las cataratas inducidas por EMT.

Abstract

The cataract is the opacity of the crystalline lens that leads to blindness. In Mexico it is considered a public health problem, since it affects one million six hundred thousand persons and adding from 50 to 60 thousand new cases every year. The current treatment is the removal of the cataract surgically. However, 30 to 40% of patients have a complication called Posterior Capsular Opacity (OCP). This is caused by a transdifferentiation of the epithelial cells (residuary to surgery) to mesenchymal cells, which produce extracellular material that generates the opacity of the crystalline lens. This phenomenon is called epithelium-mesenchymal transition (EMT). The TGF- β pathway and activation of β -catenin are involved in the induction of EMT in the eye of post-operated patients. This process of fibrosis is also important in other pathological processes such as hepatic, pulmonary and renal fibrosis. The K14E6 transgenic mouse has been used as a model for the study of cervical cancer, the expression of the E6 oncogene in the eye generates cataract formation after birth. The aim of this study was to determine the cataractous changes associated with EMT occurring in the K14E6 mice lenses related with TGF- β and Wnt/ β -catenin signaling activation.

Cataracts of K14E6 mice were analyzed histologically; components of TGF- β and Wnt/ β -catenin signaling were evaluated by Western blot, RT-qPCR, *in situ* RT-PCR, IHC, or IF technics. Metalloproteinases involved in EMT were also assayed using zymography. The endogenous stabilization of Smad7 protein was also assessed using an HDAC inhibitor. The K14E6 mice, which displayed binocular cataracts in 100% of the animals, exhibited loss of tissue organization, cortical liquefaction, and an increase in the number of hyperproliferative-nucleated cells with mesenchymal-like characteristics in the lenses. Changes in lenses' cell morphology were due to actin filaments re-organization, activation of TGF- β and Wnt/ β -catenin pathways, as well as the accumulation of MTA1 protein. Finally, the stabilization of the Smad7 protein by the administration of new isoindolines decreased cell proliferation, as well as the levels of the MTA1 protein. In conclusion, the HPV16 E6 oncoprotein induces EMT in transgenic mice cataracts. The molecular mechanism may involve TGF- β and Wnt/ β -catenin pathways, suggesting that the K14E6 transgenic mouse could be a useful model for the study or treatment of EMT-induced cataract

Introducción

El cristalino es una lente biconvexa que se encuentra situada por detrás del iris y por delante del humor vítreo. Permanece suspendido en su posición gracias a un sistema de fibrillas que se extienden desde el cuerpo ciliar hasta la parte más periférica del cristalino, denominada ecuador (Figura 1A).

La función del cristalino es la refracción ocular, formando parte (junto con la córnea, el humor acuoso y vítreo) del dioptrio ocular. Tiene un poder refractivo de +20 dioptrías. El proceso por el cual el ojo puede mantener nítida la imagen de un objeto cuando este se desplaza desde un punto remoto a otro próximo es gracias a un aumento en la curvatura del cristalino, debido a la contracción del músculo ciliar que relaja la zónula y permite que el cristalino se abombe (Kanski 1996).

El cristalino es un tejido transparente comprendido por fibras, las cuales son derivadas de la diferenciación de una capa polarizada de células epiteliales simples que están debajo de la superficie anterior del cristalino. El proceso de diferenciación es acompañado por cambios en la arquitectura intracelular de las fibras del cristalino. Estas incluyen elongación celular, la síntesis de un grupo de proteínas llamadas cristalina y la pérdida de los organelos de unión a membrana incluyendo el núcleo. A pesar de estos cambios, las fibras diferenciadas del cristalino mantienen una buena organización del citoesqueleto lenticular conformado por microfilamentos de actina, microtúbulos y dos redes diferentes de filamentos intermedios, una red compuesta por vimentina y la otra basada en copolímeros de filamentos específicos del cristalino.

El cristalino esta formado por los siguiente cuatro componentes: la cápsula, una membrana fina y elástica que rodea al cristalino; el epitelio, situado detrás de la cápsula anterior, comprende una monocapa de células que al acercarse al ecuador se transforman en fibras del cristalino; y la corteza o córtex, formado por capas concéntricas de fibras del cristalino y el núcleo, parte central del cristalino formada durante la etapa embrionaria por las fibras primarias del cristalino.

El término catarata se refiere a la opacidad del cristalino y es la causa más común de discapacidad visual en humanos (Reddy et al. 2004) (Figura 1B). Su prevalencia es del 50% en la población entre 65 y 70 años y el 70% en mayores de 70 años. Aunque acompaña al proceso de envejecimiento, la catarata también puede estar relacionada con otras causas oculares o sistémicas y puede presentar un grado de densidad variable. Constituye la principal causa de ceguera prevenible en el mundo. El tratamiento de elección es el quirúrgico mediante el implante de una lente intraocular. Durante la cirugía de catarata, el cristalino es removido de la capsula siendo remplazado por una lente de material sintético. Sin embargo, células adherentes del epitelio que persistente en la mayoría de los casos tienden a tener un fenómeno llamado Transición Epitelio Mesénquima (EMT) (Figura 1C). Este proceso le confiere a la célula epitelial la capacidad de migrar a la capsula posterior y de sintetizar material extracelular que conduce a la complicación más común llamada Opacidad de la Cápsula Posterior (OCP) (Figura 1D), la cual requiere una nueva intervención aumentando los costos de tratamiento. Esto sigue sucediendo aún cuando la cirugía de catarata ha mejorado en sus procedimientos y materiales quirúrgicos (Wormstone 2002).

Cada vez es más claro el papel de la EMT durante el proceso de fibrosis posterior al daño de diversos tejidos (depósitos de colágeno, elastina, tenacina y otras moléculas de matriz). Existe mucha evidencia de la asociación entre EMT y enfermedad renal progresiva (Iwano *et al.* 2002), la fibrosis pulmonar (Chilosi *et al.* 2003) y se encuentra asociado a la fibrosis hepática. De manera normal, los fibroblastos no son abundantes en el riñón como los son en pulmón, nódulos linfáticos o el bazo. Cuando la fibrogénesis comienza, cerca del 36% de los nuevos fibroblastos provienen de la transformación por EMT, 15% de la medula ósea y el resto secundario a la proliferación celular (Iwano *et al.* 2002). Estos hallazgos refuerzan la noción de que la fibrogénesis es un evento epitelial local. El daño renal está asociado a un incremento de células inflamatorias, las cuales pueden iniciar EMT usando factores como TGF- β , EGF y EGF-2 (Strutz *et al.* 2002). Mediante la influencia de estos factores de crecimiento, los fibroblastos residentes y el epitelio tubular realizan un incremento de los factores de crecimiento y quimioatrayentes

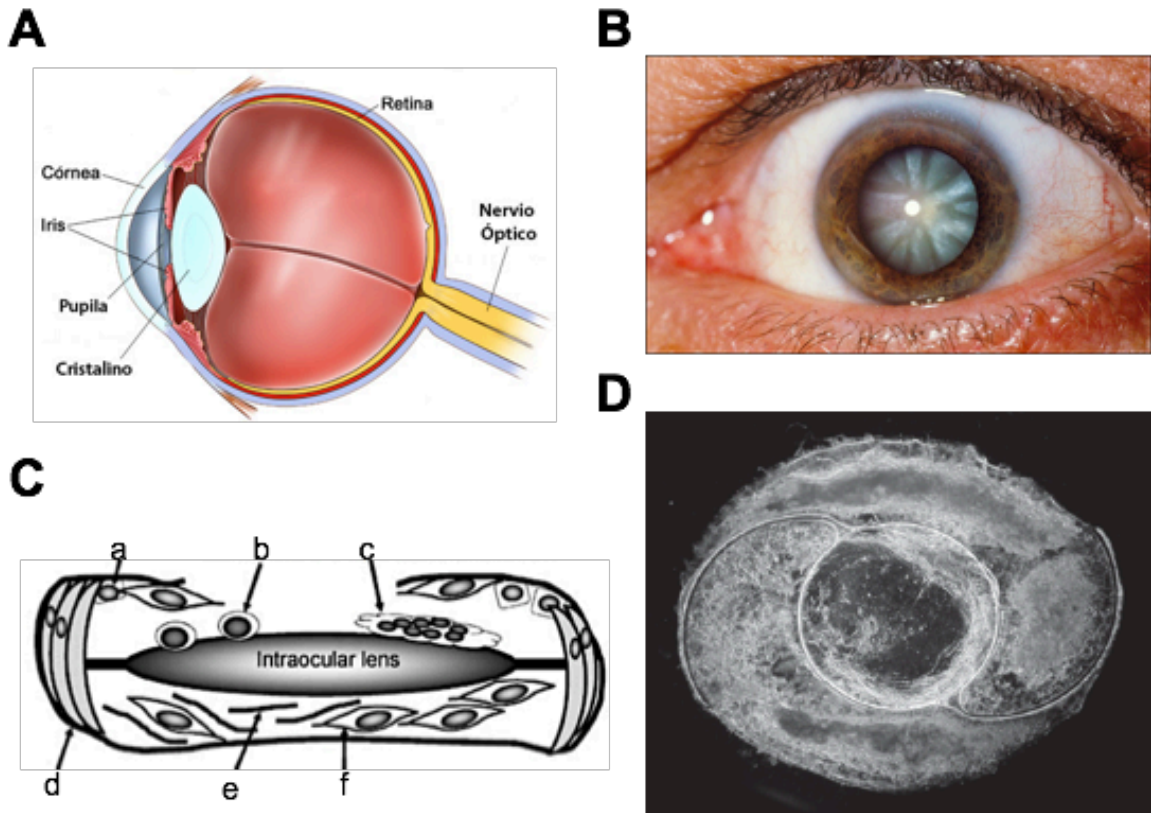


Figura 1. Formación de Opacidad Capsular Posterior (OCP) secundario a la remoción quirúrgica. (A) Representación esquemática de la posición del cristalino dentro del ojo humano. **(B)** Fotografía clínica de una catarata. **(C)** Esquema de la EMT como causante de OCP. En donde: a) célula epitelial residual, b) macrófagos, c) células gigantes multinucleadas, d) cápsula del cristalino, e) depósito de matriz extracelular y f) miofibroblastos derivados de EMT. **(D)** Fotografía de implante intraocular extraído de un paciente con OCP, mostrando una fibrosis alrededor del implante.

(Zeisberg *et al.* 2002). Este reclutamiento inicial de células epiteliales por EMT puede ser inhibido por el bloqueo de las MMP9 mediante la interrupción de el activador de plasminógeno (tPA, un activador de MMP9) (Yang *et al.* 2002).

Se ha reportado que la vía TGF- β induce a las células epiteliales a una morfología aberrante y a cambios moleculares que mimetizan algunas formas de OCP (Saika 2006); por ejemplo, se ha encontrado que la inyección intravítrea de TGF- β 2 recombinante induce la catarata en ratas (Hales *et al.* 1999). Además, el cultivo de células epiteliales explantadas, en presencia de TGF- β 1, desarrolla cambios catarogénicos caracterizados por acumulación de colágeno y fibras en la matriz extracelular (MEC), cambios en la morfología de las células epiteliales, las cuales transforman su fenotipo epitelial a un fenotipo ahusado, debido a la EMT (Liu *et al.* 1994). Durante la EMT, los cambios de las células epiteliales, en su morfología y su transcriptoma, se asemejan a las células mesenquimales. Durante la formación de catarata, los miofibroblastos derivados del epitelio del cristalino son capaces de secretar componentes fibrosos de la MEC, así como enzimas de degradación de matriz (Saika 2006).

La vía de señalización de TGF- β comienza después de la unión del ligando a sus receptores, el complejo ensamblado de ligando-receptor fosforila a las proteínas de la familia Smad, induciendo la formación del complejo p-Smad2/3-Smad4, que se moviliza al núcleo para regular la transcripción de sus genes blanco. De manera importante para la EMT, TGF- β ha mostrado una activación de la proteína cinasa activado por mitógeno (MAPK), fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), Rho GTPasa y la Wnt/ β -catenina. Este último es de crucial importancia para la EMT normal y células cancerosas (Donaldson, Kistler y Mathias 2001; Moustakas y Heldin 2007; Chong *et al.* 2009).

En la vía de Wnt/ β -catenina, la ausencia del ligando de Wnt genera que β -catenina forme un complejo de degradación con cinasas y proteínas de andamiaje, posteriormente β -catenina es fosforilada en los residuos de serina y treonina, induciendo su subsecuente ubiquitinación por β -TrCP y degradación por proteosoma. La activación de la vía canónica Wnt induce la fosforilación de la

proteína Dishevelled permitiendo su interacción con Axina 2 y evitando la formación del complejo de degradación de β -catenina. La acumulación y la translocación de β -catenina al núcleo celular, eventualmente conduce a la activación de genes responsivos de Wnt, los cuales regulan la polaridad celular, proliferación y diferenciación celular (MacDonald, Tamai y He 2009; Saito-Diaz *et al.* 2013).

TGF- β 1 también estimula la transcripción de la proteína asociada a metástasis 1 (MTA1) (Pakala *et al.* 2011). MTA1 es un miembro del complejo de remodelación y desacetilación del nucleosoma (NuRD), con una actividad desacetilasa para el fenotipo EMT inducido por TGF- β 1 (Pakala *et al.* 2011); su expresión también está involucrada en la regulación de E-cadherina a la baja y participa en muchas funciones celulares relevantes para el fenotipo EMT incluyendo sobrevivencia, independencia de anclaje, migración e invasión (Mahoney *et al.* 2002).

El ratón transgénico K14E6 expresa a la oncoproteína E6 de VPH16 y esta está bajo el control del promotor de la queratina 14 (K14) (Song, Pitot y Lambert 1999). Presenta la catarata en el epitelio del cristalino, por una vía independiente de p53 (Nguyen, Potter y Griep 2002). El cristalino consiste en una sola capa de células epiteliales cuboidales que cubren la capa anterior de una masa de fibras con diferenciación terminal. La diferenciación de las fibras inicia en la zona de transición (ZT) donde las células epiteliales abandonan el ciclo celular, se alargan, migran al centro del cristalino y sintetizan una gran cantidad de proteínas cristalinas (Donaldson, Kistler y Mathias 2001; Eldred, Dawes y Wormstone 2011). El lente del ratón transgénico muestra por el día 10 post natal un incremento en el número de células nucleadas en la ZT y en la región posterior del cristalino, debido a una falla en el ciclo celular que finalmente culmina en un epitelio con múltiples capas vacuoladas, demostrando una disrupción de la adhesión celular. La expresión de E6 también conduce a apoptosis independiente de p53, principalmente en el comportamiento de fibras (Nguyen, Potter y Griep 2002).

El objetivo de este trabajo fue determinar los cambios catarogénicos que ocurren en el cristalino del ratón K14E6 asociados con EMT. Los datos que soportan estos cambios hacia EMT fue el incremento en el número de células con morfología parecida a mesénquima y la activación de las vías TGF- β y Wnt/ β -catenina en las cataratas de los ratones K14E6 observadas en este estudio. Además, los genes blanco involucrados en EMT fueron también regulados a la alza y las proteínas involucradas en la remodelación de la MEC como las MMPs estuvieron activas. Finalmente, la estabilización endógena de Smad7 a través de la inhibición de HDAC por una nueva isoindolina sugiere que la vía TGF- β puede ser relevante en la EMT en las cataratas de los ratones transgénicos K14E6. Nuestras observaciones revelan que el ratón transgénico K14E6 puede ser de utilidad como modelo de EMT y OCP, así como en estudios de prevención. Dado que en fibrosis hepática, pulmonar y renal el proceso de EMT juega un papel central, al igual que la catarata, es posible que el estudio tanto de sus mecanismos como las estrategias terapéuticas sean parcialmente compartidas entre estas enfermedades.

Justificación

La catarata es un padecimiento considerado como un problema de salud pública a nivel mundial; las autoridades estiman que existen un millón 600 mil personas que la padecen. Los datos del Programa Nacional de Cirugía de Cataratas de la Secretaría de Salud informan que la catarata es la responsable de 45% de la ceguera en el país, y cada año se suman entre 50 y 60 mil casos nuevos. Es tal la magnitud del problema, que la Administración del ex presidente Vicente Fox creó el Consejo Nacional para la Prevención y Tratamiento de Enfermedades Visuales, cuya primera acción sería un programa de cirugía de catarata. Incluso, este procedimiento es considerado por el Gobierno Federal como una enfermedad catastrófica, por lo que está incluido en el Fondo de Gastos Catastróficos del Seguro Popular.

El tratamiento quirúrgico es útil para restablecer la visión, sin embargo, la Opacidad Capsular Posterior (OCP) es una complicación que se presenta en el 45% de los pacientes 5 años posteriores a la cirugía. Esta catarata es generada por las células epiteliales residuales que quedan adheridas a la cápsula del cristalino, las cuales sufren EMT adquiriendo la capacidad de generar MEC y generar la opacidad del cristalino. El tratamiento mediante capsulotomía láser incrementa considerablemente los costos (Billotte y Berdeaux 2004; Saika 2004), por lo que recientemente se ha dado un mayor enfoque a la investigación de la catarata dirigida a identificar la forma de bloquear los efectos de TGF- β y conservar el fenotipo normal de las células epiteliales del cristalino (Saika *et al.* 2001). El empleo de un sistema modelo de catarata *in vivo* es central para idear una estrategia molecular que disminuya y/o prevenga complicaciones de la cirugía de catarata. Además, la inhibición de la EMT podría ser de utilidad para el tratamiento de otros padecimientos como la fibrosis pulmonar y renal.

Hipótesis

Los cambios catarogénicos en la catarata del ratón K14E6 pudieran estar asociados al encendido de las vías TGF- β y Wnt/ β catenina que inducen EMT. La inhibición selectiva de la HDAC1 por las isoindolinas pudiera aumentar el nivel de la proteína Smad7, inhibidor natural de la vía TGF- β , por lo que disminuiría la expresión de los genes responsivos de la EMT en la catarata del ratón K14E6.

Objetivo General

Determinar los cambios catarogénicos que ocurren en el cristalino del ratón K14E6 asociados con EMT.

Objetivos Específicos

- I. Caracterización de la catarata del ratón K14E6 de dos meses de edad identificando la expresión de la oncoproteína E6 mediante inmunohistoquímica, y su mRNA mediante RT-PCR, así como la identificación de cambios histológicos en la proliferación celular y estructura del citoesqueléto mediante tinción de Hematoxilina-Eosina, inmunohistoquímica de PCNA e inmunofluorescencia de Faloidina.
- II. Medir los componentes de las vías de señalización TGF- β y Wnt/ β -catenina de importancia para EMT mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y mRNA en la catarata del ojo del ratón transgénico K14E6 de 2 meses de edad.
- III. Seleccionar la isoindolina más afín y más específica para la inhibición de la HDAC1 mediante docking.
- IV. Comparar el efecto de la isoindolina seleccionada en la expresión de Smad7 y los componentes de las vías TGF- β y Wnt- β catenina en los ratones K14E6 y NT de tres semanas de edad, con las técnicas anteriormente mencionadas.

Material y Métodos

Generación del ratón transgénico K14E6

La generación y caracterización del ratón transgénico K14E6 que expresa la oncoproteína E6 de VPH 16 bajo el control del promotor de la queratina 14 ha sido descrito previamente (Song, Pitot y Lambert 1999; Song *et al.* 2000). El vector que contiene el transgén codifica la secuencia de VPH 16 que incluye los marcos de lectura de E6 y E7 (nucleótidos 79-883) con un *linker* de terminación de la traducción (TTL) dentro del marco de lectura de E7, causando así una terminación prematura de la traducción de la secuencia de E7. El ratón transgénico K14E6, contiene como fondo genético a la cepa FVB/N; el transgén se encuentra en estado homocigoto, y se mantiene en endogamia; fueron alojados en instalaciones aséptica con barreras libres de patógenos y todos los experimentos y procedimientos fueron aprobados por la unidad de investigación del comité de cuidados de animales de laboratorio (UPEAL-CINVESTAV, México; NOM-062-ZOO-1999). Para este estudio, se utilizaron ratones K14E6 machos de dos meses de edad y a la cepa no transgénica (NT) FvB/N como control. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado e incluyeron al menos nueve ratones en cada grupo experimental.

Procedimiento de tejido ocular y análisis histopatológico

Los órganos oculares enteros fueron desecados, colocados en cassettes para su inclusión en parafina (Fisher Scientific®) y fijados en paraformaldehído toda la noche a 4 °C. Los ojos fueron lavados en PBS 1X y deshidratados a través de un gradiente de alcohol y xileno. Finalmente, los ojos embebidos en parafina fueron orientados para cortes de 5 µm de longitud. Los ojos fueron cortados de manera secuencial para su posterior tinción y procesamiento con hematoxilina-eosina, RT-PCR *in situ*, inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. Los cristalinos disecados fueron obtenidos para la posterior purificación de RNA y de proteína utilizados en las subsecuentes técnicas de RT-PCR o Western blot. Los cristalinos de ratones

NT fueron considerados como control para comparar las alteraciones histológicas en el ratón K14E6.

Genotipificación y expresión de mRNA del transgén E6

Para la identificación de los alelos E6 y su expresión, la PCR de fase líquida fue realizada usando cebadores específicos para E6 (Figura 2). El DNA genómico fue aislado como se describe en la literatura (Feil et al. 1996) y se llevo a cabo la amplificación de los alelos de E6 usando 40 ciclos, con los siguientes pasos: desnaturalización de 30 s a 95 °C, alineación de un minuto a 60 °C y elongación de 30 s a 72 °C. En todos los experimentos de genotipificación, la amplificación de una secuencia conocida (gen p21/WAFF1) fue incluida para asegurar la integridad del DNA genómico de las muestras. Para el análisis de la expresión de mRNA de E6, el RNA total fue aislado del cristalino en el ratón transgénico K14E6 y NT usando el protocolo de TRIzol (Invitrogen®). Se sintetizó DNA complementario (cDNA) a partir de 500 nanogramos del RNA siguiendo las especificaciones de manufactura (Invitrogen®) y el cDNA fue amplificado a través de una PCR de tres pasos incluyendo 10 s de desnaturalización a 95°C, 10 s de alineamiento dependiente de cebador a 60°C y 10 s de elongación dependiente de templado a 72 °C. El mRNA de GAPDH se utilizó como control endógeno.

PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

La cuantificación relativa de los mRNAs investigados (COL1A1, FN1, Snail, MMP2, MMP9, Wnt1, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a y MTA1) para RT-qPCR fue realizada usando un sistema de PCR tiempo real 7300 (Applied Biosystem®), como fue descrito previamente (Ocadiz-Delgado *et al.* 2012; Serafín-Higuera *et al.* 2012). Se diseñaron oligonucleótidos utilizados como cebadores para la extensión de exones (Tabla1) y las secuencias fueron obtenidas de la base de datos de GenBank. Las reacciones de PCR óptimas de todos los genes investigados fueron establecidos usando Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2X) (Fermentas®), de acuerdo a las instrucciones de manufactura. Las PCRs fueron procesadas a través

de 40 ciclos de una reacción de PCR de tres pasos, incluyendo 30 s de desnaturalización de 94 °C, 60 segundos de fase de alineación (60 °C) y 30 s de elongación dependiente de templado a 72 °C. La amplificación de cada templado fue realizado por triplicados en cada corrida de PCR. Los datos obtenidos en el ensayo de RT-qPCR fueron analizado con la ecuación descrita por Livak y Schmittgen (Livak y Schmittgen 2001) usando como cantidad del gen blanco = $2^{-\Delta\Delta CT}$. La diferencia de la expresión de los genes investigados fue calculada con la relación normalizada con mRNA de GAPDH.

RT-PCR *in situ*

Para la amplificación del mRNA de E-cadherina, se realizó RT-PCR *in situ* como previamente fue descrita (Nuovo 2001). Brevemente, los cortes desparafinados y deshidratados se colocaron sobre laminillas electrocargadas libres de DNasa/RNasa y fueron incubadas con Proteinasa K. Después de la digestión de Proteinasa K, los tejidos oculares obtenidos de los ratones NT y K14E6 fueron tratados con 1U de DNasa I y RNase-free (Roche®) por muestra durante 48 h a temperatura ambiente (2 x 24 h). Después de lavar a fondo con agua tratada con DEPC, la transcripción reversa fue realizada usando la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen®), seguido de las especificaciones de manufactura. Las laminillas fueron incubadas a 42 °C por 1 h en una cámara húmeda sellada. Después de un lavado riguroso con agua tratada con DEPC, la solución óptima para PCR (Master Mix) que contiene digoxigenina-11-(2'-deoxy-uridina-5')-trifosfato (DIG-11-dUTP; Roche ®), fue añadida. Los controles negativos fueron hechos sin cebadores o Taq DNA polimerasa. La amplificación de PCR *in situ* (18 ciclos) fue realizada usando el sistema de Perkin Elmer®. Los productos de reacción de PCR *in situ* fueron detectados por un método de inmunomarcado usando anticuerpo primario de anti-Digoxigenina (fragmento Fab; Roche®) conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma®) por 2 h a temperatura ambiente. La detección de la fosfatasa alcalina fue realizada usando por 10-30 min el kit NBT/BCIP (Zymed®). Después de la detección, las laminillas fueron enjuagadas con agua destilada por 5 min, contrateñidas siete min con Fast Green (Sigma®), lavadas, deshidratadas y

secadas al aire para posteriormente añadirles el medio de montaje histológico Permout (Fisher Scientific®).

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos usados para procedimientos de genotipificación, RT-PCR y RT-qPCR. *

Símbolo del gen	Forward	Reverse
E6/E7 (gen)	TTTTATGCACCAAAAGAGAACT	TACCTGCAGGATCAGCCATG
E6/E7 (mRNA)	TTTTATGCACCAAAAGAGAACT	CAGCATATGGATTCCCATCTC
p21/WAF1	TTCAGAGCCCAGGCACCATG	GGGACCCAGGGCTCAGGTAGA
COL1A1	ATGTTTCTAGCTTTGTGGACCTC	AGTTTGAAGCACAGCACTCG
FN1	TGCCTCGGGAATGGAAAG	ATGGTAGGTCTTCCCATCGCTATA
MMP2	TCAAGGACCGTTTTATTTGGC	GCGTCAATCTTTTCTGGGAGC
MMP9	TCCAGCGTGCCGGAAG	CCACGACCATACAGATACTGGATG
Wnt1	CAGGGTTCATAGCGATCCAT	CAAAGAGGGAGGGAGGTAGG
Wnt4	CTGGAGAAGTGTGGCTGTGA	GGACGTCCACAAAGGACTGT
Wnt5a	CTGGCAGGACTTTCTCAAGG	GTCTCTCGGCTGCCTATTTG
MTA1	AGCCCAACCCAAACCAG	GGCAATGCGTGTCAACT
E-cadherina **	CAGTTCCGAGGTCTACACCTT	TGAATCGGGAGTCTTCCGAAAA
GAPDH	GGTGAAGTCGGTGTGAACG	CTCGCTCCTGGAAGATGGTG

* Condición de amplificación para PCR, RT-PCR y RT-qPCR donde: 95°C, 30 s; 60°C, 60 s; 72°C, 30 s; 40 ciclos.

** Condición de amplificación para RT-PCR *in situ* donde: 90°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 30 s; 20 ciclos.

Inmunohistoquímica

Los cortes del tejido obtenidos de los ojos embebidos en parafina de los ratones de dos meses de edad fueron desparafinados y rehidratados como se describió previamente (Sambrook J 1989). La detección de proteína fue realizada usando sistema de detección Mouse-Rabbit PolyDetector HRP/DAB (Bio SB®) de acuerdo con las especificaciones de manufactura. Los cortes de tejidos fueron incubados 12-16 h a 4 °C con un anticuerpo primario contra la oncoproteína E6, PCNA, TGF- β RI, TGF- β RII, TGF- β 1, TGF- β 2, MTA1, Vimentina (Santa Cruz Biotechnology®, Cat No: SC-1583, SC-25280, SC-101574, SC-17791, SC-130348, SC-374658, SC-373765 y SC-66002, respectivamente), p-Ser465/467-Smad2, β -catenina activa o Smad7 (Millipore®), Cat No: AB3849, 05-665 y ST1625, respectivamente), siguiendo las recomendaciones de los protocolos de manufactura. Seguido de tres lavados en PBS 1X, los cortes fueron incubados con el cromógeno PolyDetector DAB (0.3 mg/ml DAB; Bio SB®), contrateñidos con hematoxilina y montados en reactivo Permount (Fisher Scientific®). Tejidos sin anticuerpo primario fueron incluidos con tinción negativa como controles (no mostrados).

Inmunofluorescencia

La detección de inmunofluorescencia de E-cadherina, β -catenina total y Faloidina (Invitrogen®, Cat No: 71-1400, 71-7800 y A12381, respectivamente) fue realizada en cortes de ojos embebido en parafina como previamente fue descrito (González-Mariscal, Garay y Quiros 2011). Como anticuerpo secundario, se emplearon anticuerpo acoplados a Fluor Alexa 594 o acoplados a Fluor Alexa 488 (Invitrogen®). Los núcleos fueron teñidos con azul de yoduro TO-PRO-3 (Invitrogen®). Los ensayos omitiendo al anticuerpo primario fueron incluidos como control negativo (no mostrados).

Western blot

Los cristalinos fueron lisados con buffer RIPA y el extracto de proteínas fue desnaturalizado 5 minutos a 100 °C. Treinta µg de las proteínas lisadas totales se corrieron en SDS-PAGE y transferidos a nitrocelulosa o membranas PVDF como fue indicado anteriormente (García-Zepeda *et al.* 2013). Las membranas se bloquearon por 1 h en PBS 1X con 5% de leche seca libre de grasa, después incubadas con anticuerpo primario diluido 1:500, lavado tres veces con PBS 1X, incubados con peroxidasa de rábano picante conjugada con el anticuerpo secundario respectivo y la reacción de anti-anticuerpo fue detectada usando SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific®) de acuerdo con las recomendaciones de manufactura.

Zimograma

La actividad de MMP9 y MMP2 en el ratón fue medida mediante zimograma. El cristalino lisado fue mezclado con buffer sin agentes reductores en una proporción 3:1 (2.5% SDS, 1% sacarosa y 4 g/mL de rojo fenol) y fue corrida en geles de acrilamida al 8% copolimerizada con gelatina a 1 mg/mL. Los geles fueron lavados tres veces en Triton™ X-100 al 2.5% y después incubados en Assay Buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, 5 mM CaCl₂) a temperatura de 37 °C por 48 h. Los geles son mezclados y teñidos con Azul Coomassie brillante G-250 en ácido acético al 10% y metanol al 30%. La actividad proteolítica fue detectada como bandas claras contra la tinción de fondo de un sustrato no digerido. La densitometría fue realizada usando el software Fiji (ImageJ ver2.0).

Ensayo de *docking molecular*

Una serie de 14 isoindolinas 2-sustituidas derivadas de α -aminoácidos fueron sintetizadas (Mancilla-Percino *et al.* 2001) y patentadas junto con un grupo más extenso de compuestos por el grupo de Mancilla-Percino *et al.* (número de registro de patente: Mx/a/2014/002124). Estos compuestos fueron analizados *in silico* por

docking molecular para evaluar si el compuesto podría actuar como inhibidor de HDACs. Brevemente, las formulas estructurales fueron dibujadas con el programa Isis/Draw y convertidas en su formato de tres dimensiones usando el paquete WebLab Viewer and Molekel Visualization. Primero, se realizó una optimización de la geometría de las isoindolinas (minimización de energía) con el programa Gaussian 98 versión A.3. Posteriormente, la estructura de la proteína HDAC8 de *Homo sapiens* (PDB: 1T64) usando el algoritmo B3LYP 6-31G, el *docking molecular* fue realizada con el programa AutoDock 4.2, el algoritmo permite la completa flexibilidad de los ligandos pequeños. La preparación de la estructura de los ligandos y proteínas, así como la definición del sitio de unión, fue realizada bajo la base GRID. El reconocimiento de HDACs e isoindolinas fue realizada con el algoritmo genético híbrido Lamarckiano. Los parámetros para el docking molecular fueron: población: 100 y evaluaciones: 10,000,000. Todas las proteínas fueron visualizadas a través del programa “Visual Molecular Dynamics”.

Selección de Isoindolinas y protocolo de tratamiento

Basados en los resultados de *docking molecular*, se selecciono la isoindolina derivada de L-leucina la cual exhibió un valor de ΔG para el complejo HDAC1-isoindolina 2b en el sitio catalítico. Los ratones K14E6 fueron inyectados con isoindolina 2b vía intraperitoneal en dos dosis: 10 $\mu\text{M}/\text{Kg}$ y 100 $\mu\text{M}/\text{Kg}$ cada 12 h durante tres días. Después del tratamiento, el ojo fue resecaado para la evaluación histológica con la tinción de hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica para las proteínas Smad7, PCNA y MTA1. El control negativo fue considerado el ratón K14E6 tratado con vehículo (solución inyectable) y el control positivo al grupo tratado con TSA (dosis: 0.01 $\mu\text{M}/\text{Kg}$). Todos los compuestos fueron bien tolerados a las dosis indicadas y no hubo efecto tóxico reportado durante el tratamiento con isoindolina 2b. Importantemente, la misma dosis de TSA e isoindolina 2b fue incapaz de compararse, debido a la toxicidad de TSA.

Análisis y cuantificación de imágenes digitales

Todas las imágenes digitales fueron analizadas usando el programa Image-ProPlus Analysis (Versión 4.5.0.19, Media Cybernetics®) descrito (Ocadiz-Delgado et al. 2012). La señal de GAPDH fue utilizada para normalizar la cuantificación de RT-PCR.

Análisis estadístico

Los resultados fueron presentados mediante media \pm desviación estándar (D.E.). Para el análisis estadístico entre los dos grupos se utilizó la prueba de *t-student*. Diferencias de (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; y (***) $p < 0.001$ fueron consideradas como estadísticamente significativas.

Resultados

Validación del modelo de ratón transgénico en el cristalino

Se observó la formación de catarata en el cristalino de ratones transgénicos K14E6 de 2 meses de edad (Figura 2A). El ratón presenta el oncogén E6 flanqueado por el promotor de la citoqueratina 14 (K14), una secuencia de poliadenilación de K14 (K14 polyA) y un *linker* de terminación de la traducción (TTL) insertado dentro de la región 3' del oncogén E7, así que la traducción de E7 es interrumpida (Figura 2B). El transgén E6 de VPH16 fue detectado por PCR empleando DNA de la cola del ratón transgénico (Figura 2C). Para verificar la expresión del oncogén K14E6, los cristalinios de los ratones no transgénicos (NT) y transgénicos (K14E6) de dos meses de edad fueron disecados y se extrajo el RNA. Como era de esperarse, se observó la expresión de mRNA de E6 en el cristalino del ratón transgénico (Figura 2D). Además, la determinación por inmunohistoquímica realizó para detectar a la oncoproteína E6. Encontramos señal positiva únicamente en el cristalino del ratón K14E6 (Figura 2E).

Cambios histológicos en el cristalino de ratones transgénicos

La arquitectura de un cristalino normal está formada por una capa de células epiteliales que cubren la superficie anterior (Figura 3A). En la zona de transición (ZT), las células epiteliales se diferencian en fibras, las cuales forman la mayor cantidad en el cristalino. Durante la diferenciación, las fibras cambian su patrón de expresión y pierden su organización (Donaldson, Kistler y Mathias 2001). Esta estructura puede observarse en el cristalino de ratón NT (Figura 2B); sin embargo, los cortes del ojo de los ratones K14E6 de dos meses de edad mostraron pérdida de la organización de tejido, incremento en el número de células nucleadas, licuefacción cortical y reabsorción cortical (Figura 3B). La hiperproliferación de la catarata mostró un incremento en células positivas para PCNA, sugiriendo un incremento en la proliferación (Figura 3C). Además, el examen histológico de la

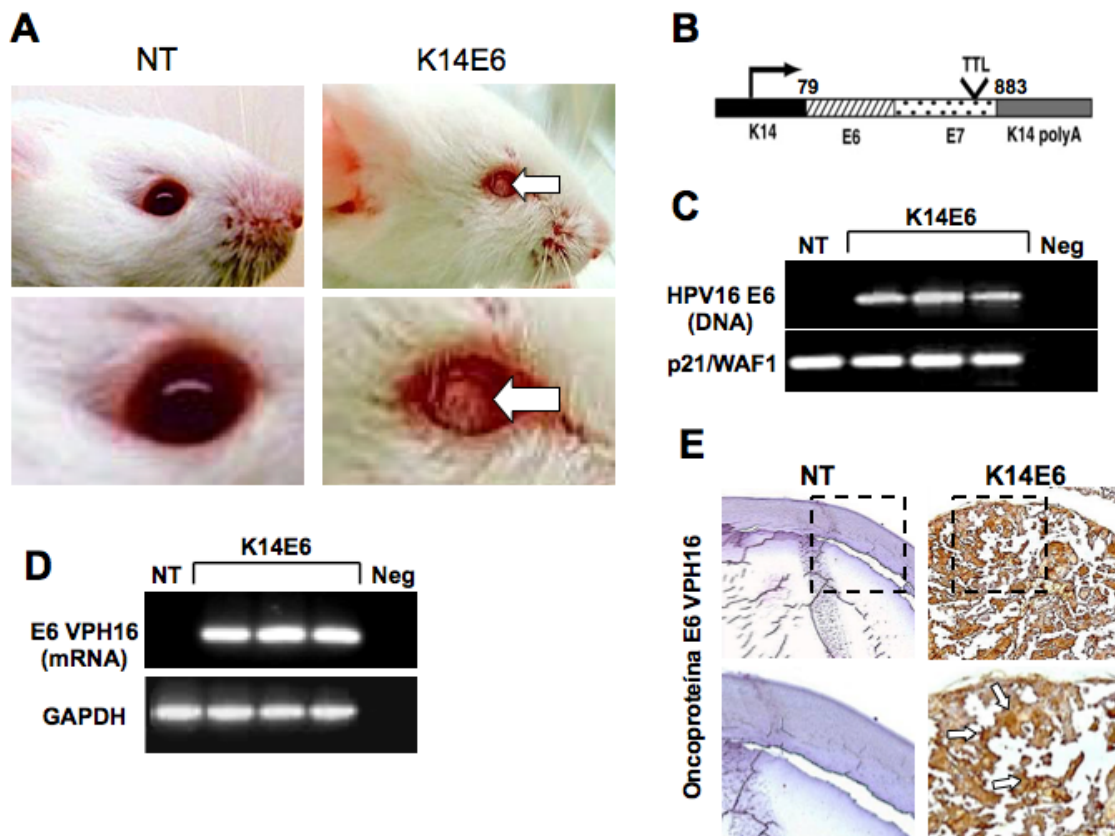


Figura 2. Expresión transgénica del oncogén E6 del Virus de Papiloma Humano desarrolla catarata. (A) Imágenes representativas de ojos del ratón NT y transgénico K14E6 que desarrolla catarata (flechas blancas) en comparación con el ratón NT. (B) Mapa genético de la construcción del transgén K14E6. Los ratones expresan al oncogén E6 que contiene la secuencia de DNA que se traslapa a los ORFs E6 y E7 de VPH16 abarcando los nucleótidos 79-883 bajo el control de el promotor de queratina 14 humana (K14). El ratón transgénico tiene un *linker* terminador de la traducción (TTL) en el 3' del gen E7 evitando la traducción de E7. (C) Se observa la expresión del oncogén viral en el ratón transgénico K14E6. Amplificación de una secuencia de DNA control p21/WAF1 en el ratón NT y K14E6 fue para validar la integridad de las muestras de DNA genómico. Control negativo (Neg): reacción de PCR sin DNA. (D) Determinación de la expresión del transcrito de E6 de VPH16 en el cristalino del ratón por RT-PCR punto final. Control de expresión (mRNA de GAPDH). Control negativo (Neg): Reacción de PCR sin cDNA. (E) Expresión de la oncoproteína E6 por inmunohistoquímica. Flechas Blancas indican zonas de expresión alta de E6. Magnificación: Figura 2E (10X, recuadro 20X).

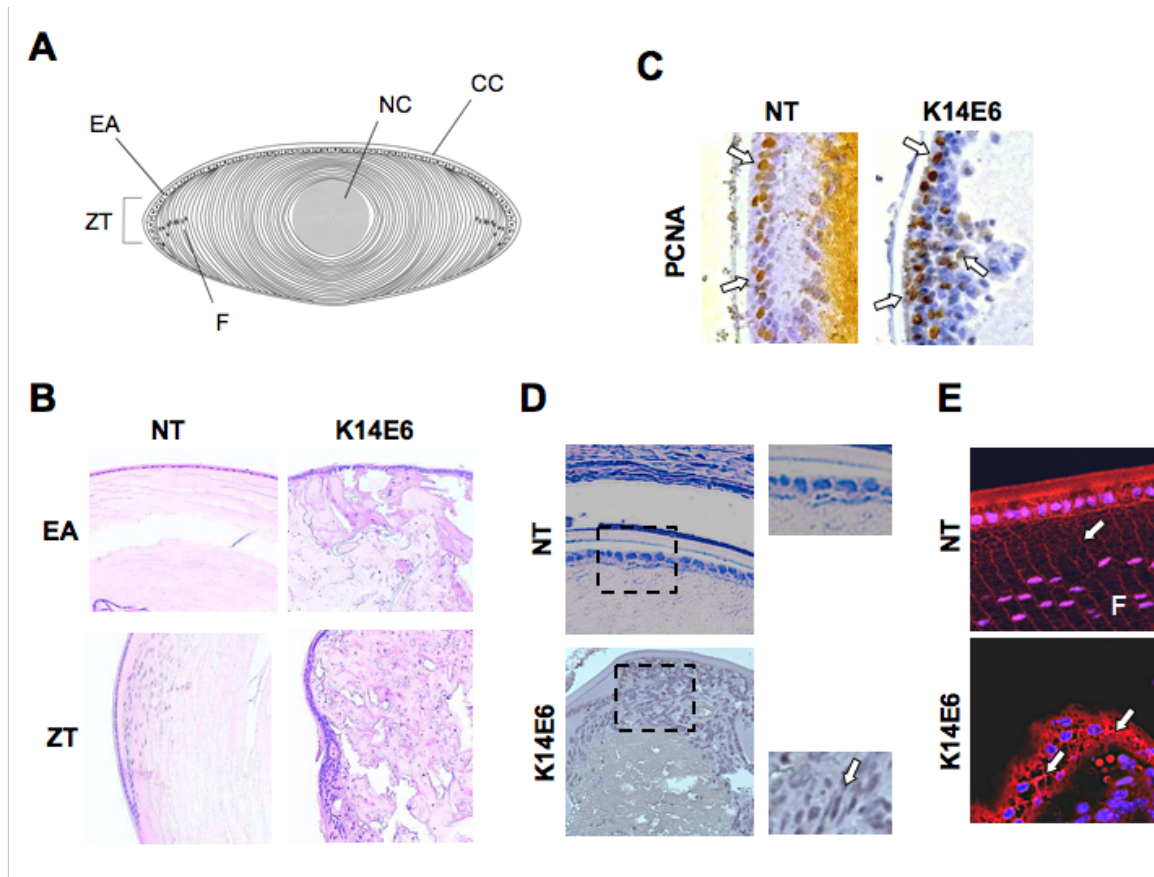


Figura 3. La catarata muestra una localización anormal de células nucleadas proliferativas en el ratón transgénico K14E6. (A) Diagrama esquemático del cristalino de mamíferos. CC: cápsula del cristalino, EA: epitelio anterior, ZT: zona de transición, F: fibras del cristalino y NC: núcleo del cristalino. **(B)** Tinción de Hematoxilina-Eosina de ratones de dos meses de edad K14E6 y NT, el cristalino mostró la organización del EA y la ZT. El ratón K14E6 mostró una disrupción total del EA, una licuefacción cortical extensa y reabsorción. **(C)** Detección por inmunohistoquímica de PCNA como marcador de proliferación celular. La señal nuclear de PCNA (flechas blancas) fue principalmente en la capa basal y se limitaba a la parte anterior del epitelio en el ratón NT, mientras que el ratón transgénico K14E6 exhibe una tinción de PCNA de múltiples capas en el EA. **(D)** La morfología de las células del EA muestra un epitelio simple cúbico en el ratón NT, mientras que el ratón transgénico K14E6 exhibía un fenotipo parecido a mesénquima (flechas blancas). **(E)** Tinción de Faloidina (señal roja) muestra fibras de estrés localizadas en contacto célula-célula en diferentes células en el ratón NT, mientras que en el epitelio anterior de K14E6 muestra una desorganización de el patrón de tinción. Magnificación: Figura 3B (10X), Figura 3C (40X), Figura 3D (10x, recuadro 40X) y Figura 3E (40X).

catarata mostró células con características parecidas a células mesenquimales (células con características fusiformes) (Figura 3D). Cambios en la morfología de la célula pueden ser debidas a una reorganización de los filamentos de actina. Por lo que realizamos la tinción con Faloidina que detecta las fibras de estrés de actina en las células del cristalino del ratón K14E6, lo cual se puede observar en la Figura 3E. Las fibras de estrés en las células epiteliales del ratón NT son localizadas en el contacto célula-célula en determinadas células, mientras que las células epiteliales del ratón K14E6 muestran un patrón desorganizado en todo el epitelio anterior (Figura 3E).

La vía de señalización TGF- β en la catarata del ratón transgénico

Se ha reportado que la vía de TGF- β se encuentra involucrada en la etiología de la catarata y es considerada una de las más importantes y mejor estudiadas en la EMT. Así que consideramos importante el análisis de la expresión de los componentes de la vía de TGF- β en la catarata del ratón transgénico K14E6. En dicho análisis no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de TGF- β RI, TGF- β 1 y TGF- β 2 en el cristalino transgénico de dos meses de edad comparado con el ratón NT (Figura 4A). Sin embargo, fue detectado un alto nivel de TGF- β RII y p-Smad2 específicamente en los cristalinicos de los ratones transgénicos, indicando una activación de la vía TGF- β (Figura 4A). Además, el análisis de los genes responsivos de TGF- β por RT-qPCR mostró un incremento de la expresión de Colágeno 1A1 (COL1A1), Fibronectina (FN1), Snail1, Metaloproteinasas de matriz 2 (MMP2) y 9 (MMP9) (Figura 4B), en la catarata del ratón transgénico comparado con los cristalinicos de los ratones no transgénicos. Así, estos resultados sugieren que la vía TGF- β es activada en la catarata del ratón K14E6.

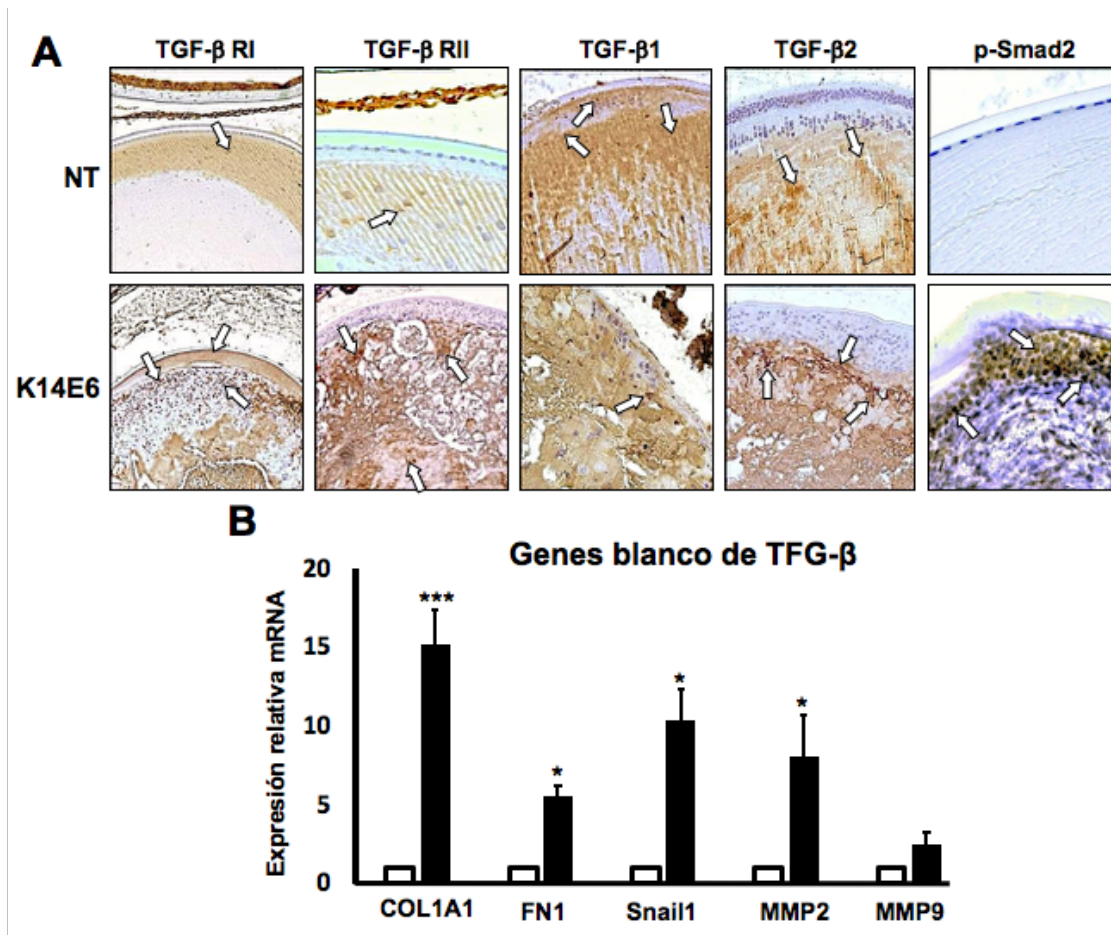


Figura 4. Vía de señalización TGF- β es activada en la catarata del ratón transgénico K14E6. (A) Detección por inmunohistoquímica del receptor de TGF- β , ligandos de TGF- β y p-Smad2 en el cristalino de ratón de dos meses de edad NT y K14E6. Las flechas indican una señal positiva de cada uno de los antígenos. (B) El nivel de expresión de algunos transcritos blancos de TGF- β fue evaluado por RT-PCR. El nivel de mRNA correspondiente en el ratón NT fue dado como valor 1.0. Los experimentos fueron realizados por triplicado y nueve ratones fueron usados por cada grupo experimental de cada réplica. Colágeno 1A1 (COL1A1), Fibronectina (FN1), Snail1, Metaloproteinas 2 (MMP2), Metaloproteinas 9 (MMP9). Los valores de significación estadística fueron calculados como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Diferencia estadísticamente significativa: * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$. Magnificación: Figura 3A (10X).

Expresión de marcadores de EMT en la catarata del ratón K14E6

Una baja regulación de E-cadherina y una alta regulación de Vimentina son considerados como una marca de EMT (Guarino 2007; Younes et al. 2011), por lo que estudiamos la expresión de estas proteínas en el cristalino de los ratones no transgénicos y transgénicos de 2 meses de edad. Aunque detectamos una ligera reducción de mRNA de E-cadherina *in situ* (Figura 5A), los niveles de proteínas totales no se ven afectados (Figuras 5B). Además, Vimentina, una proteína presente en células mesenquimales, es sobreexpresada en la catarata del ratón transgénico (Figura 5B). La localización celular de E-cadherina difiere notablemente entre las cepas de ratones; E-cadherina es localizada en la membrana de las células del epitelio y en las fibras de células del ratón NT, mientras que, en el ratón K14E6 se observa una distribución citoplasmática y la pérdida de la expresión en la región localizada en el tejido cercano al núcleo del cristalino (ver cepa K14E6, Figura 5C, flechas blancas). Esta evidencia sugiera que la EMT ocurre en la catarata del ratón transgénico.

Incremento en la expresión y actividad de MMPs en catarata del ratón transgénico

Puesto que la expresión de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son parte del proceso de EMT (Nathu *et al.* 2009), realizamos la determinación del nivel de la proteína MMP2, ya que previamente mostramos que la expresión de MMP2 está incrementada en la catarata del ratón transgénico (Figura 4B). En la Figura 6A se observa, que la MMP2 aumenta sus niveles de expresión en extractos proteicos totales de cristalinos evaluados por western blot. Para evaluar este punto, realizamos un ensayo de Zimograma (Figura 6B y C) que mide la actividad en el extracto total del cristalino, así como humor acuoso (Schmalfeldt et al. 2001). Nuestros resultados mostraron un incremento en la actividad no solamente de la MMP2 sino también de MMP9 en muestras de ratones transgénicos comparados con los ratones NT (Figuras 6B y C).

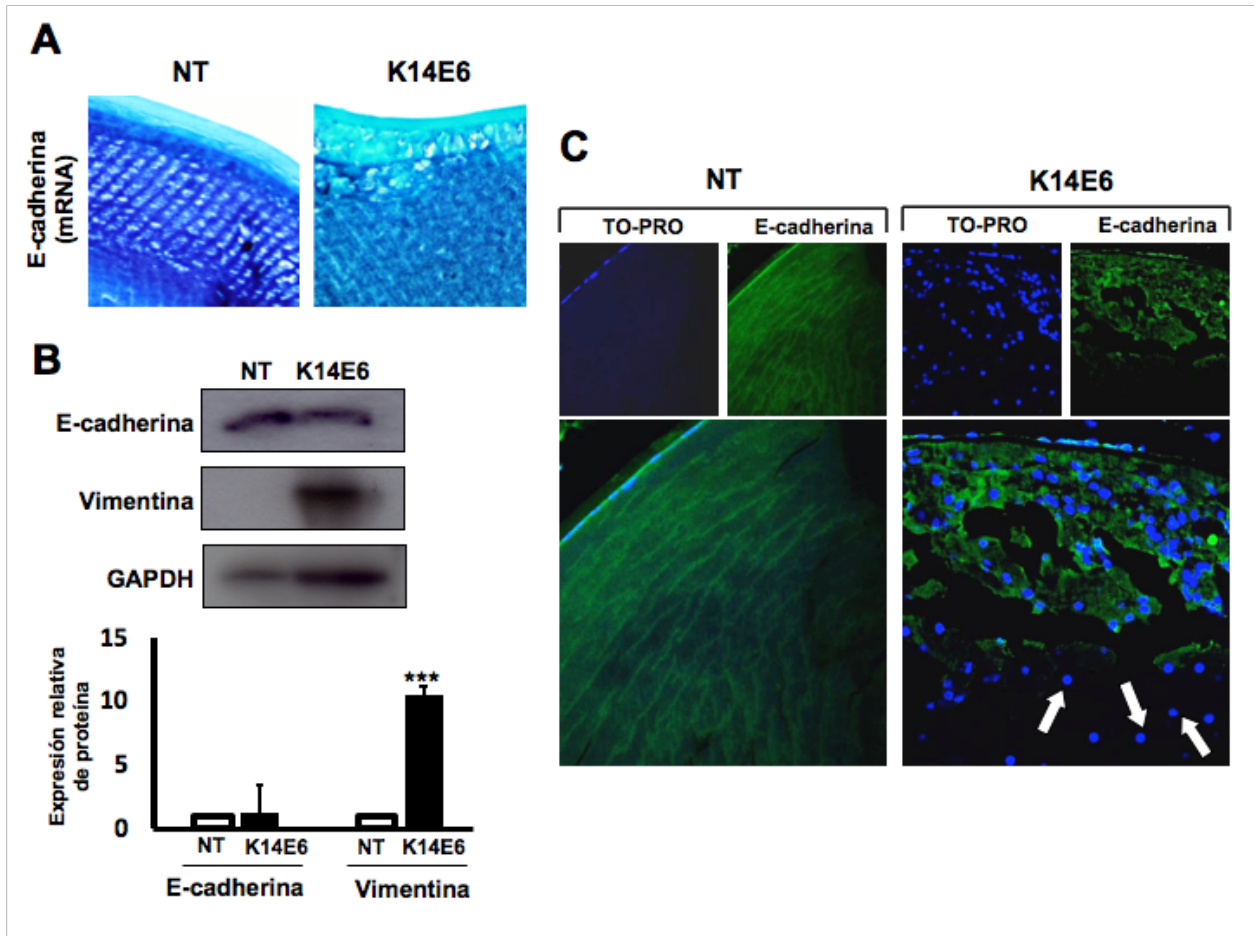


Figura 5. La oncoproteína E6 induce la expresión de marcadores de EMT. (A) Imagen representativa de la detección de mRNA de E-cadherina por RT-PCR *in situ* en cristalinos de ratones NT y K14E6 de dos meses de edad (ver Materiales y Métodos). **(B)** Expresión de la proteína de E-cadherina y Vimentina normalizada con GAPDH por Western blot. **(C)** Detección por inmunofluorescencia de E-cadherina en cristalino de ratones NT y K14E6 de dos meses de edad. Señal verde: E-cadherina. Señal azul: TO-PRO (células nucleadas). Las flechas blancas muestran una pérdida de la señal de E-cadherina cerca del núcleo del cristalino. Diferencia estadísticamente significativa: *** $p < 0.001$. Magnificación: Figura 5C (40X).

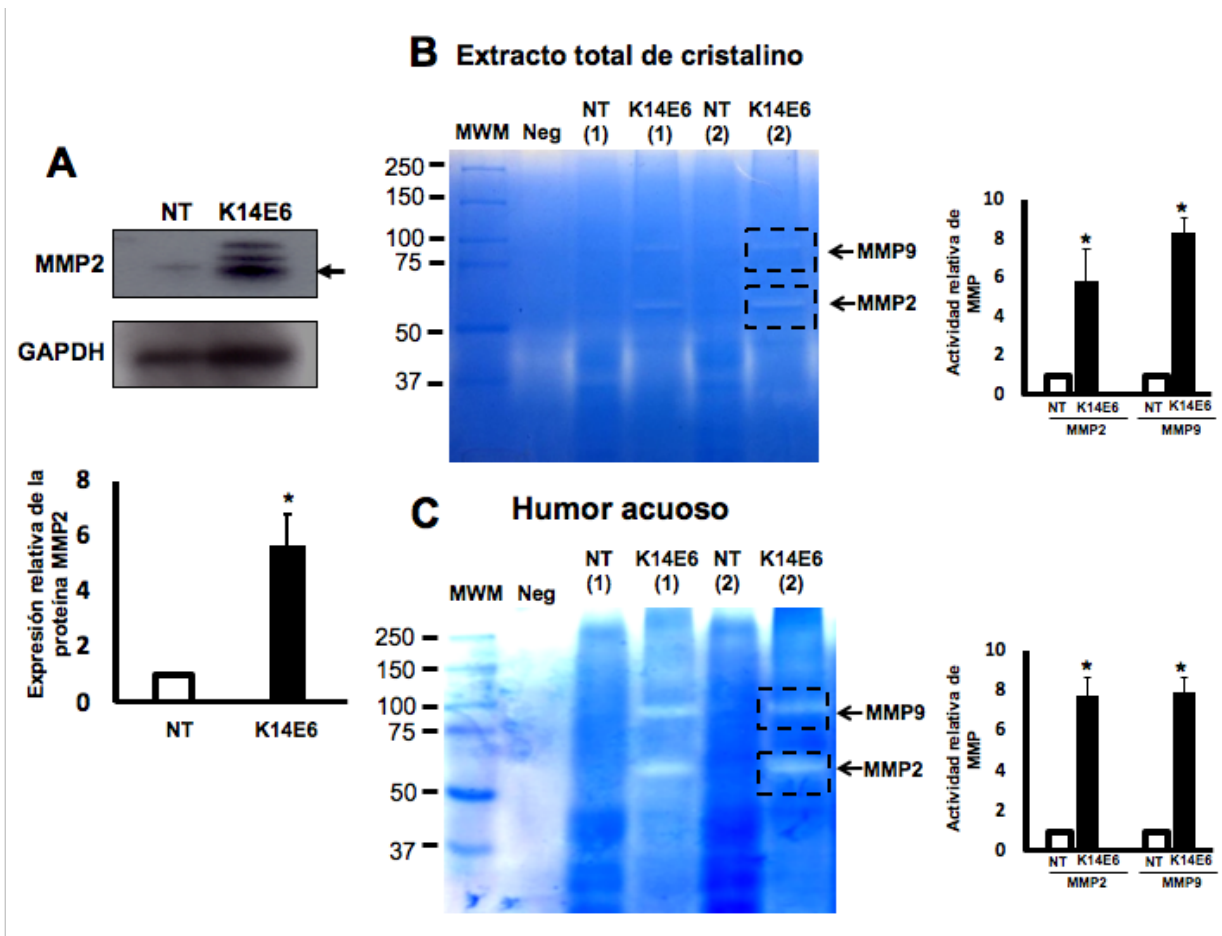


Figura 6. La oncoproteína E6 mostró un incremento en la producción y actividad de las metaloproteinasas. (A) Análisis de Western blot de MMP2 en extracto total de cristalino de ratones NT y K14E6. **(B)** Análisis funcional por Zimograma de las proteínas MMP9 y MMP2 en extracto total de cristalino o **(C)** humor acuoso, en el cristalino de los ratones NT y K14E6. La degradación del gel fue visualizada por electroforesis de acrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) al 8% (PAGE) y tinción de azul de Coomassie como se describe en Materiales y Métodos. Diferencia estadísticamente significativa: * $p < 0.05$. Marcador de peso Molecular (MWM), Control Negativo (Neg) (no incluye muestra). Los experimentos fueron realizados por triplicados y un conjunto de nueve ratones de cada cepa fue considerado como una replica biológica en cada ensayo de Zimograma.

Incremento de los niveles nucleares de la proteína β -catenina en la catarata del ratón transgénico K14E6

Como previamente se ha reportado, la vía Wnt está involucrada en la EMT inducida por TGF- β durante el desarrollo de placas fibróticas en el cristalino (Chong *et al.* 2009). Debido a que la translocación nuclear de β -catenina es requerida por la activación de la vía Wnt (Archbold *et al.* 2012), analizamos la localización celular de β -catenina en el cristalino del ratón NT y transgénico K14E6 mediante inmunofluorescencia (Figura 7A) e inmunohistoquímica (Figura 7B). Como se indica en la Figura 7A y B, la proteína β -catenina exhibe una localización citoplasmática en el ratón K14E6. Adicionalmente, el mRNA de los ligandos de Wnt fue analizado por RT-qPCR, Wnt4 y Wnt5a son sobre expresados en la catarata del ratón K14E6, mientras que Wnt1, 3a, 7a y 8a son expresados a la baja. Interesantemente, de los tres ligandos anteriores, Wnt7a fue el que mostró una disminución en su expresión más significativa en comparación con ratones NT (Figura 7C) (ver en Discusión). En resumen, estos resultados sugieren una posible inducción de la vía Wnt en la catarata del ratón K14E6.

Incremento de MTA1 en la catarata K14E6

La familia de miembros independientes del complejo NuRD es capaz de reclutar la actividad de HDAC sobre los genes blanco (Xue *et al.* 1998). En particular, la Proteína Asociada a Metástasis 1 (MTA1) fue identificada como un miembro del complejo NuRD (Zhang, Stephens y Kumar 2006), y su asociación con EMT durante invasión en distintos tipos graves de cáncer (Pakala *et al.* 2011; Tuncay Cagatay *et al.* 2013). Como MTA1 es regulada al alta por la vía TGF- β (Pakala *et al.* 2011), nos preguntamos si el genotipo parecido a células mesenquimales observado con las células epiteliales del cristalino era debido a un incremento en la expresión del gen MTA1. Como muestra la Figura 8, el RNA de MTA1 (Figura 8A) y la proteína (Figura 8A y B) incrementan sus niveles de expresión en las células de epitelio anterior y en la zona de transición en la catarata del ratón K14E6.

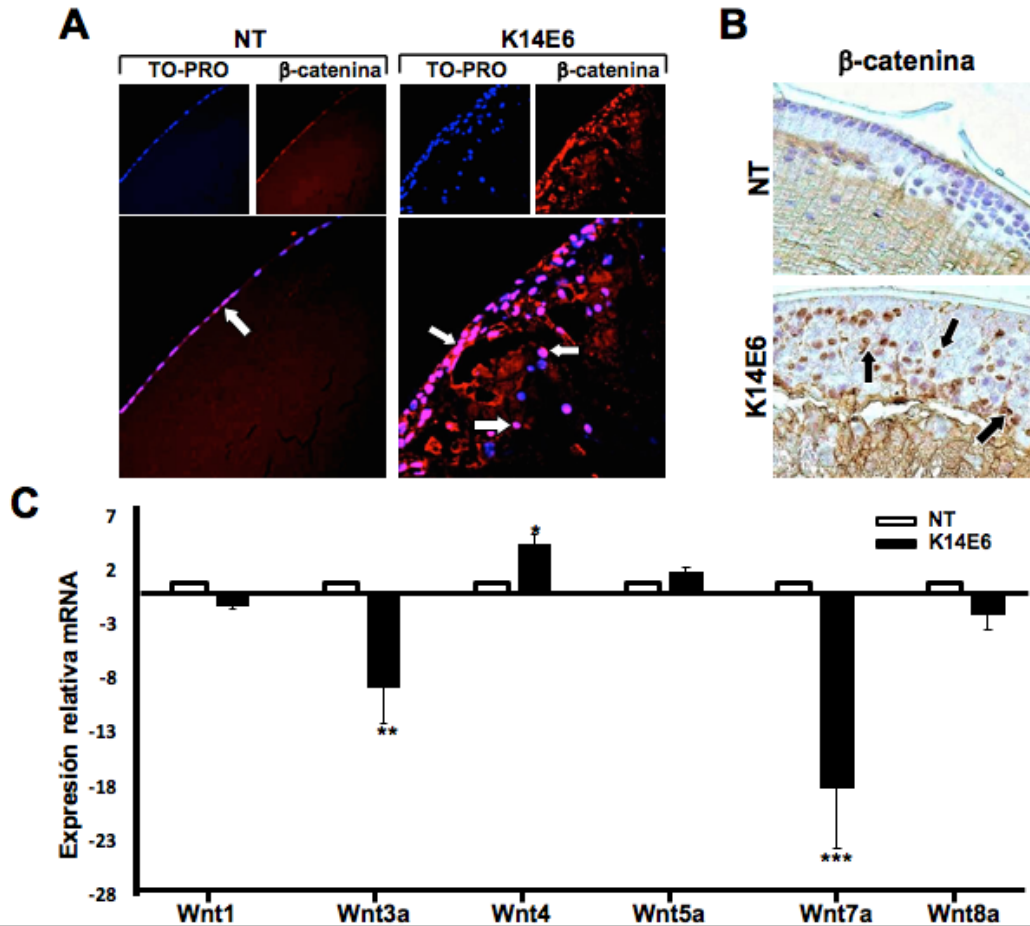


Figura 7. Incremento de β -catenina en el cristalino del ratón transgénico K14E6. (A) Detección de inmunofluorescencia de β -catenina (señal roja) en el cristalino de ratones NT y K14E6 de dos meses de edad. Señal de unión (señal púrpura) muestra señal nuclear de β -catenina en el epitelio anterior (flechas blancas). (B) Detección de inmunohistoquímica de la proteína β -catenina es indicada como señal nuclear café (flechas negras). (C) Expresión de mRNA de los ligandos Wnt importantes para EMT evaluado por RT-qPCR. El ligando Wnt4 es el más sobreexpresado y el ligando Wnt7a es el más subexpresado en el cristalino del ratón K14E6. Los experimentos fueron realizados por triplicados (tres ratones por réplica biológica). Diferencia estadísticamente significativa: * $p < 0.005$, ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.001$. Magnificación: Figura 6A y B (40X).

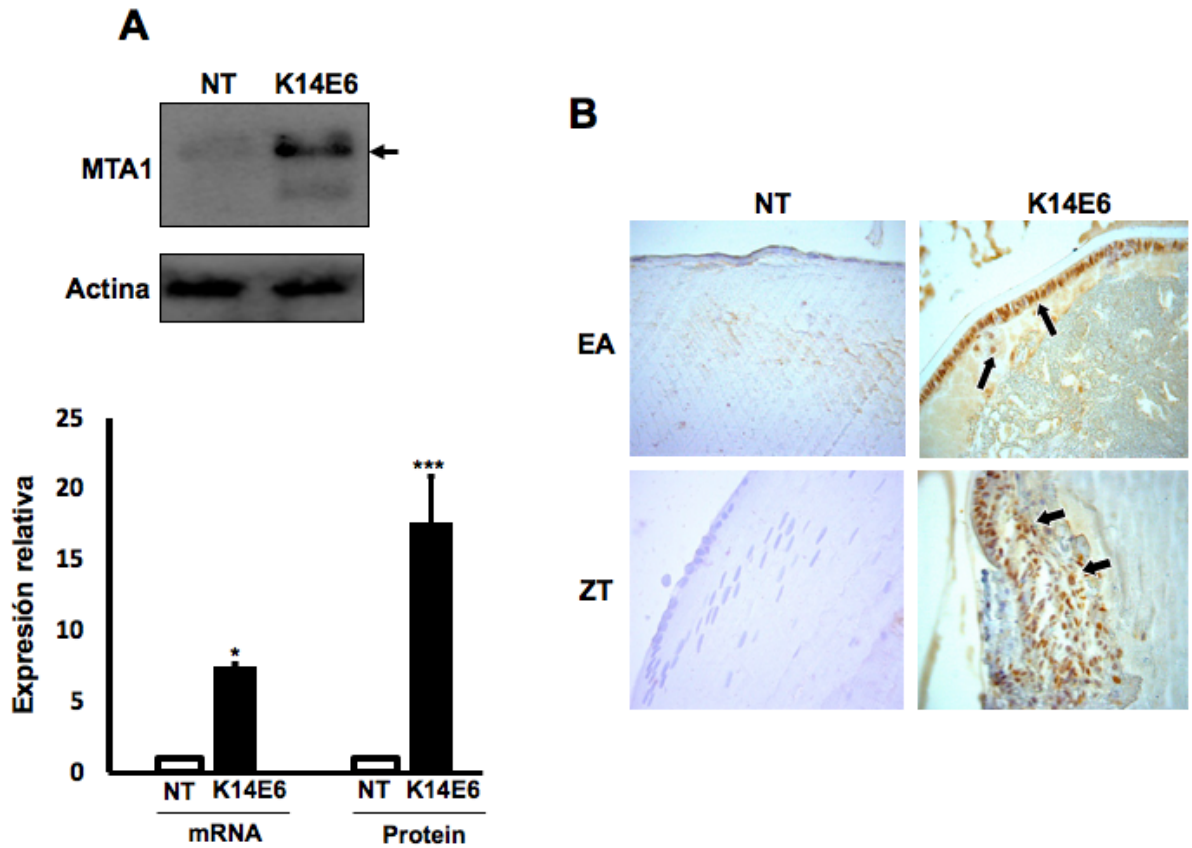


Figura 8. El receptor nuclear MTA1 incrementa su expresión en el cristalino del ratón K14E6. (A) Expresión de mRNA y proteína de MTA1 evaluando por RT-qPCR o Western blot, respectivamente. **(B)** Detección de inmunohistoquímica de la proteína MTA1 en el cristalino de ratones NT y K14E6. Como se observa, la señal nuclear de MTA1 en EA y ZT fue alta en el cristalino del ratón transgénico K14E6 (flechas negras), al comparar con el cristalino de NT. Diferencia estadísticamente significativa: * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$. Magnificación: Figura 8B (40X).

Selección de isoindolinas 2-sustituidas como inhibidora de HDAC

Las HDACs tienen un papel importante en la EMT y en cáncer. Además, muchos compuestos han sido sintetizados como inhibidores de HDAC. Los grupos clásicos de inhibidores de HDAC (iHDACs) incluyen compuestos con cadena corta de ácidos grasos (como el ácido valproico), ácido hidroxámico (como la Tricostatina A o TSA), péptidos tetracíclicos o bezamidas, entre otros (Song *et al.* 2000).

En años recientes, el grupo de la Dra. Mancilla Percino *et al.* sintetizó 14 compuestos derivados de α -aminoácidos (número de registro de patente: Mx/a/2014/002124) (Mancilla-Percino *et al.* 2001) (Figura 9A). Cada isoindolina 2-sustituida derivado de α -aminoácidos cuentan con un grupo isoindonil y un grupo éster (serie 1) o un grupo carboxilo (serie 2). Después, examinamos mediante *docking molecular* la unión de los 14 compuestos en el sitio catalítico de las HDACs. Como se muestra en la Figura 9B, el docking indicó que los diez compuestos seleccionados muestran una actividad espontánea para los sitios activos de HDAC1 y 3 (Clase I HDACs) y HDAC 4 y 7 (Clase II HDACs).

Como los valores de ΔG indican, las diez isoindolinas seleccionadas mostraron una afinidad preferencial para el sitio catalítico de HDAC 1 y 7 (ver Figura 8B) al comparar con HDAC 3 y 4. Debido a que las HDACs también participan en la homeostasis (Glozak *et al.* 2005), nos interesamos en la selectividad de HDAC1 y 7, ya que la inhibición de todas las clases de HDAC, como la TSA, incrementan su efecto tóxico. Dado que la isoindolina 2b es más selectiva para la enzima HDAC1 (ΔG de -7 Kcal/mol) que HDAC7 (ΔG de -6 Kcal/mol) (ver línea verde en Figura 8B), nosotros elegimos a la isoindolina 2b como iHDAC selectivo para la enzima HDAC1. La Figura 9C muestra una representación esquemática de las interacciones no covalentes de las isoindolinas contra la TSA en el sitio catalítico de la HDAC1.

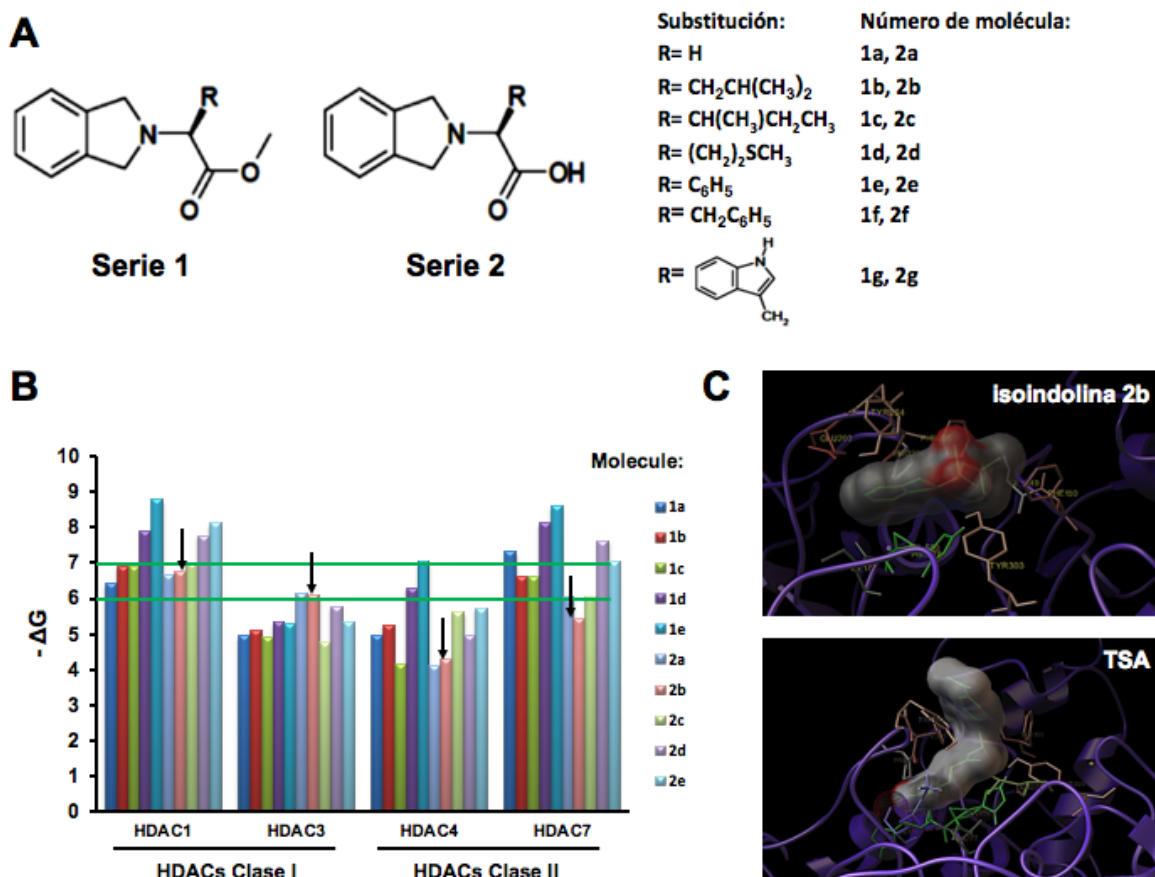


Figura 9. Evaluación por *docking molecular* de las isoindolinas 2-substituidas en el sitio catalítico de HDAC. (A) Estructura de 14 isoindolinas 2-substituidas con el grupo éster (Serie 1), o con el grupo carboxilo (Serie 2). **(B)** Valores de ΔG (Kcal/mol) al interactuar diez isoindolinas 2-sustituidas con el sitio catalítico de HDAC1, 3, 4 y 7 mostrando afinidad. Las líneas verdes indican la unión selectiva de isoindolinas 2b de los sitios catalíticos de HDAC1 vs HDAC7. **(C)** Representación esquemática de interacciones no covalentes de isoindolinas 2b contra la TSA para el sitio catalítico de la HDAC1.

Isoindolina 2b aumenta el nivel de la proteína Smad7 y suprimen la expresión de genes responsivos de TGF- β

La expresión de la proteína Smad7, un inhibidor endógeno de la vía TGF- β , ha sido reportada con regulación postraduccional por la actividad HAT/HDAC (Gronroos *et al.* 2002; Glozak *et al.* 2005; Simonsson *et al.* 2005). La activación directa de la proteína Smad7 por p300 en los aminoácidos K64 y K70 promueve la estabilidad (Gronroos *et al.* 2002), mientras que su desacetilación de estos residuos por la enzima HDAC1 induce la degradación por proteosoma (Simonsson *et al.* 2005). Como los ensayos de *docking molecular* sugieren una inhibición de HDAC1 por la isoindolina 2b (Figura 9), nuestra siguiente pregunta fue si el tratamiento de la isoindolina 2b puede estabilizar a la proteína Smad7 y así inhibir la vía de TGF- β .

En ratones transgénico K14E6 de tres semanas de edad evaluamos el efecto de la inhibición de HDAC en la expresión de Smad7 en el cristalino, para ello utilizamos una dosis no tóxica de TSA como control y dos dosis de isoindolina 2b inyectadas por vía intraperitoneal (ver sección "Materiales y Métodos"). La isoindolina 2b no mostró tener efecto tóxico a las dosis empleadas. Como se muestra en la Figura 10, al utilizar dosis no tóxicas de iHDACs hay un incremento de la expresión de Smad7 en el cristalino del ratón K14E6 de manera dosis dependiente (Figura 10). Así que nosotros seleccionamos la dosis 100 $\mu\text{mol/Kg}$ de la isoindolina 2b para evaluar el argumento de que la proteína Smad7 disminuye los genes responsivos de TGF- β en el cristalino de K14E6. Como en la Figura 11A indica, hay una regulación a la baja del mRNA de MTA1, MMP2, MMP2, MMP9, FN1 y COL1A1 en el grupo tratado de K14E6 comparado con el no tratado. En particular, también disminuye el mRNA (Figura 10A) y la proteína (Figura 11B) de MTA1 en la catarata del ratón K14E6.

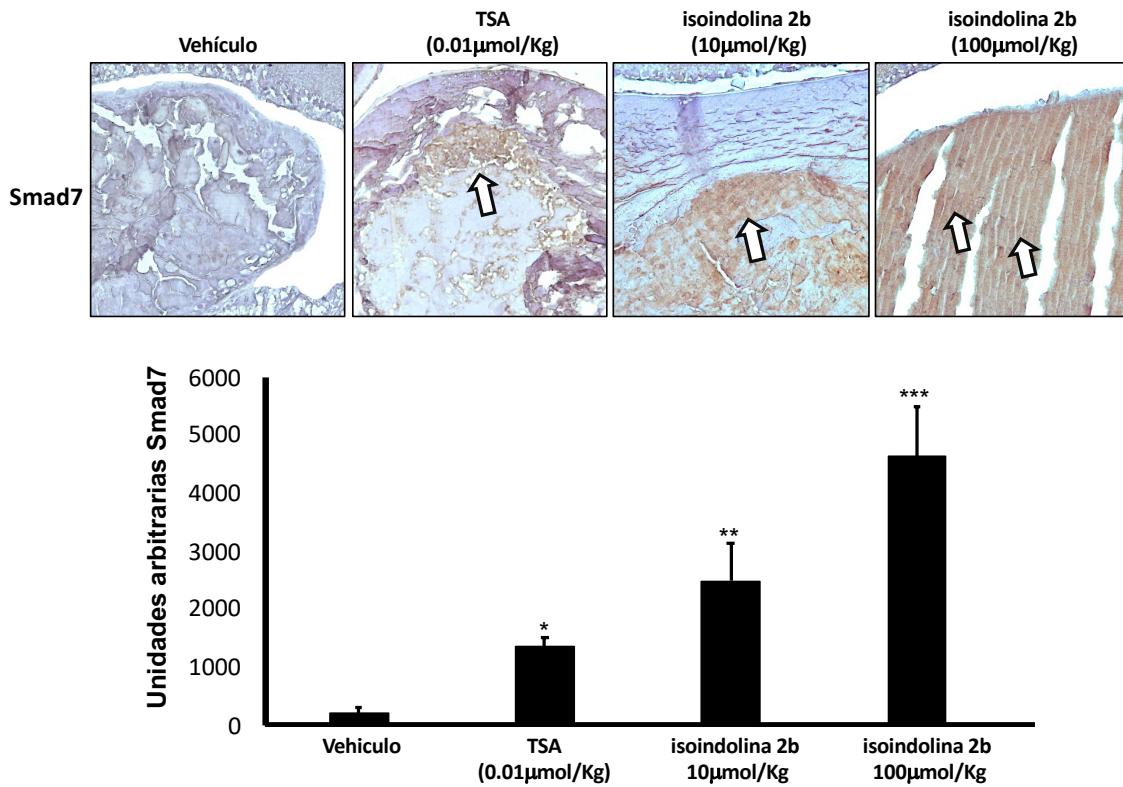


Figura 10. Incremento de la proteína Smad7 de manera dosis dependiente por isoindolinas 2b iHDAC. Detección por inmunohistoquímica de la proteína Smad7 (flechas blancas), en el cristalino de los ratones transgénicos K14E6 de tres semanas de edad tratados con dos distintas dosis no tóxicas de isoindolina 2b iHDAC y una dosis no tóxica de TSA como control. Diferencia estadísticamente significativa: * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$. Magnificación: 10X.

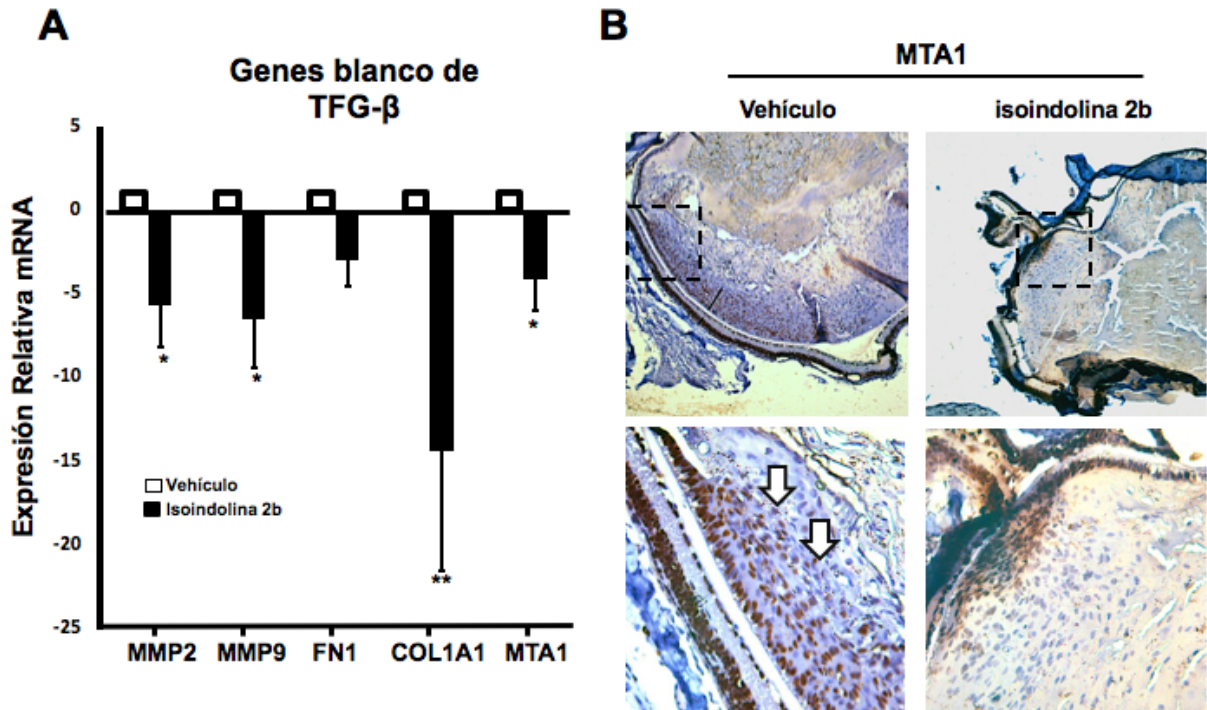


Figura 11. Supresión de genes responsivos a TGF-β por isoindolina 2b en la catarata del ratón K14E6. (A) Detección de mRNA de genes responsivos a TGF-β como MMP2, MMP9, FN1, COL1A1 y MTA1 evaluada por RT-PCR en el cristalino de ratón K14E6 de tres semanas de edad (Tratado contra control). (B) Detección por inmunohistoquímica de la proteína MTA1 (flechas negras) en el cristalino del ratón transgénico K14E6. Dosis de tratamiento con isoindolina: 100μmol/Kg. Diferencia estadísticamente significativa: * p<0.05 y ** p<0.01. Magnificación: Figura 10B (10X, recuadro 40X).

Finalmente, analizamos la histología del ojo del ratón después del tratamiento con una dosis intraperitoneal de isoindolina 2b (dosis 100 $\mu\text{mol/Kg}$). Como en la Figura 12 se muestra, el número de células nucleares en el cristalino de ratones tratados es menor comparado con su control, evidenciando que lesiones catarogénicas del ratón K14E6 son dependientes de TGF- β .

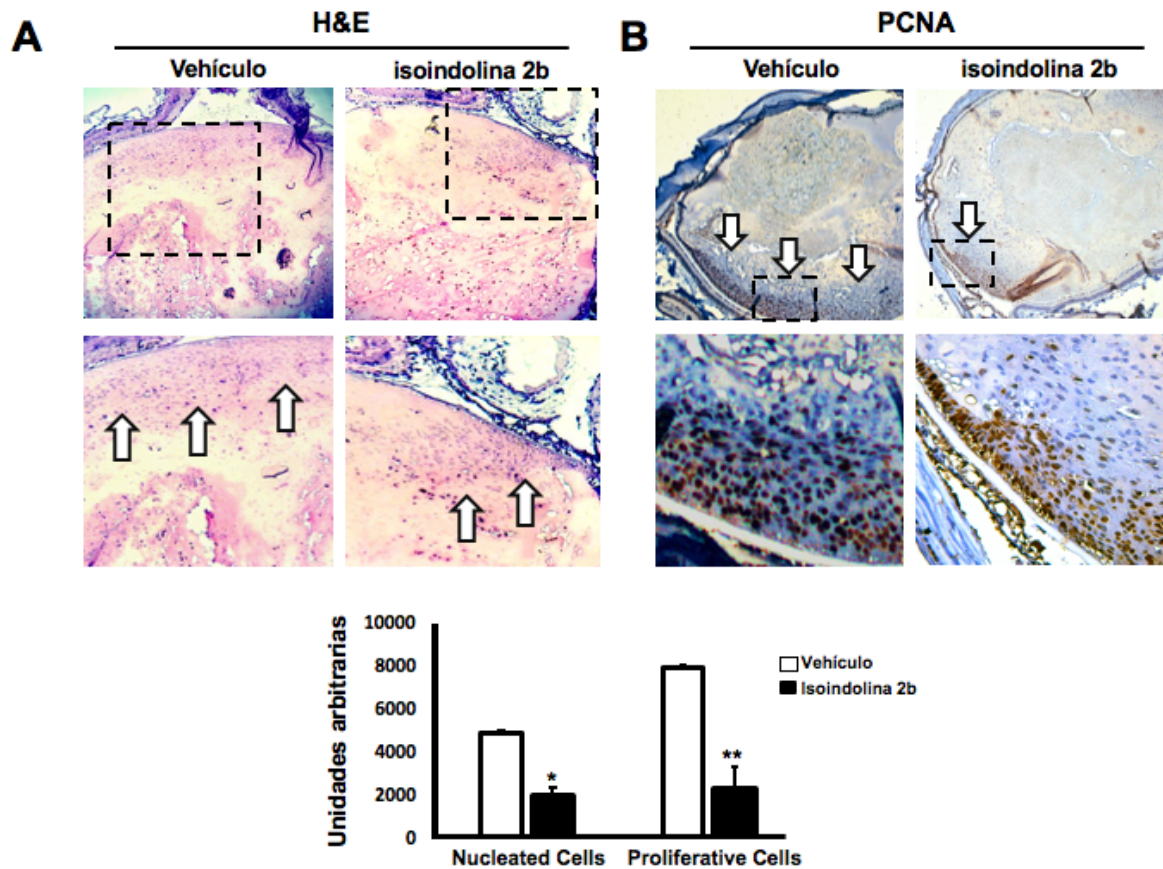


Figura 12. Reducción del número de células nucleares proliferativas por isoindolinas 2b en la catarata del ratón K14E6. (A) Tinción de Hematoxilina-Eosina de cristalinos de ratones K14E6 de tres semanas de edad tratados contra control, se observa una reducción en la proliferación de las células nucleadas que se acercan al núcleo del cristalino. **(B)** Detección por inmunohistoquímica de PCNA donde se observa una reducción en la proliferación de células inmaduras (flechas negras). Dosis de isoindolinas: 100 $\mu\text{mol/Kg}$. Diferencia estadísticamente significativa: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. Magnificación: (10X, recuadro 40X).

Discusión

En este estudio, hemos propuesto que la presencia de la oncoproteína E6 induce la EMT en las células del cristalino del ratón transgénico; los resultados mostraron células con características parecidas a las mesenquimales con activación de las vías de señalización TGF- β y Wnt, relacionadas a EMT.

La expresión de la oncoproteína E6 de VPH 16 a través del epitelio del cristalino en ratones K14E6 fue demostrada en ratones transgénicos K14E6 de 10 días de edad por Chong *et al.* (Chong *et al.* 2009). Ellos reportaron que la expresión de la oncoproteína E6 en el cristalino resultaba en una alteración de la organización estructural, la cual incluye una licuefacción y reabsorción. Hallazgos histológicos observados en este estudio también muestran hiperproliferación, con un incremento en el número de células nucleadas en el compartimento de fibras en cristalinos de ratones transgénicos de dos meses de edad. Por lo que, sugerimos que el genotipo derivado de E6 en el cristalino es edad independiente.

Esta bien documentado que la EMT es un proceso esencial en el desarrollo de cataratas humanas (Eldred, Dawes y Wormstone 2011) y OCP (Wormstone 2002). En este proceso las células con morfología parecida a fibroblastos migran hacia la cápsula posterior del cristalino para depositar una cantidad de MEC en modelos experimentales y clínicos (Marcantonio y Vrensen 1999). Además, se ha documentado que la reorganización de los filamentos de actina inducida por TGF- β durante la interacción célula-MEC en las células epiteliales vía activación Rho-GTPasa (Maddala *et al.* 2003), juega un papel crucial en la proliferación, migración, elongación y sobrevivencia de las células epiteliales del cristalino (Wertheimer *et al.* 2014). También observamos la reorganización de actina en la región nuclear de los cristalinos de los ratones transgénicos K14E6 (Figura 2). Todo lo anterior, sugiere que el proceso EMT esta involucrado en el desarrollo de la catarata inducida por E6.

Para obtener una comprensión adicional de la EMT involucrada en la catarata inducida por E6, analizamos vías implicadas en EMT. Por ejemplo, la activación de la vía TGF- β es un marcador distintivo de algunas formas de catarata generadas por EMT (Saika *et al.* 2002). Además, TGF- β 2 induce el desarrollo de catarata en los cristalinos de ratas (Hales *et al.* 1999). Particularmente, nosotros observamos un incremento en la señal nuclear de p-Smad2 en la catarata del ratón transgénico, sugiriendo que la vía TGF- β es activada en la catarata del ratón K14E6. Debido a que las fibras quiescentes del ratón NT expresan muy poco a los receptores y ligandos de TGF- β (Ver Figura 2), la detección de p-Smad2 es un criterio adecuado para la evaluación de la activación de la vía TGF- β en la catarata K14E6.

Se ha reportado a la E-cadherina como un marcador de células epiteliales, proteína de unión a membrana, y a la Vimentina como un marcador de células mesenquimales, filamento intermedio tipo III, estas proteínas han sido utilizados para describir la EMT (Kalluri y Weinberg 2009). La regulación a la baja de E-cadherina en EMT inducida por TGF- β se ha demostrado en cultivo de células epiteliales de cristalino y explantes de células epiteliales de cristalino. Nuestras observaciones han demostrado una expresión reducida y desorganizada de la proteína E-cadherina en algunas áreas del núcleo del cristalino (ver Figura 5C). Varios represores transcripcionales de E-cadherina han sido identificados, incluyendo Snail, miembro de la superfamilia de factores de transcripción de dedos de zinc (Cano *et al.* 2000). Snail es considerado un efector de la EMT inducida por TGF- β y se ha demostrado su activación por la vía TGF- β a través de p-Smad2/3/Smad4 en células epiteliales de cristalino (Cho *et al.* 2007); consistente con este reporte, nosotros también observamos un incremento de la expresión del mRNA de Snail en la catarata del ratón K14E6. Además, Vimentina es una proteína inducida por Snail (Wu y Zhou 2010) y la generación de un ratón transgénico en donde se insertaba varias copias del gen de Vimentina, aumentando su expresión, demostró inhibir la diferenciación de las fibras conduciendo a la formación de catarata (Capetanaki, Smith y Heath 1989). De acuerdo con esto, nosotros observamos que la expresión de Vimentina también incrementaba en la catarata del ratón transgénico K14E6 contribuyendo a su formación (ver Figura 5B).

Otra característica de las células mesenquimales es su capacidad de producir MEC. Este es un proceso dinámico que implica la expresión de proteínas que participan en la formación (Fibronectina y Colágeno) y degradación de estructuras celulares (MMP2 y MMP9) (Lin *et al.* 2011). Las metaloproteínas de matriz (MMPs) son una familia de enzimas de degradación de matriz dependiente del zinc envueltas en múltiples enfermedades incluyendo fibrosis de tejido, con un papel emergente en una variedad de fenotipos de catarata, particularmente en la catarata subcapsular anterior (ASC) y OCP (Tamiya *et al.* 2000; Li, Wang y Wang 2008). La MMP2 es capaz de degradar los componentes de la MEC como colágeno tipo IV, exponiendo sitios de unión que pueden promover la migración celular (Cheng *et al.* 2006). Adicionalmente, la MMP9 puede jugar un papel río arriba de MMP2 en la ASC inducida por TGF- β (Mohan *et al.* 2002; Nathu *et al.* 2009). Interesantemente nuestros resultados muestran un incremento en la expresión de MMP2 e incremento en la actividad de MMP2 y MMP9 en extractos totales de proteínas y humor acuoso en cataratas de ratones K14E6.

La vía Wnt es otra vía reportada en EMT inducida por TGF- β , la cual es también activada durante los cambios fibróticos en células del cristalino (Chong *et al.* 2009). La señal nuclear de β -catenina es evidente después de la exposición del cristalino explantados a TGF- β 2 (Chong *et al.* 2009) y nuestros resultados también muestran un incremento de la señal nuclear de β -catenina en la catarata K14E6 (Figura 7), la cual es consistente con lo ya observado (Chong *et al.* 2009). Además, fue previamente reportado que la señalización de Wnt es también inducida por el oncogén E6 de VPH16 en la piel del ratón transgénico K14E6 (Bonilla-Delgado *et al.* 2012). En este trabajo también analizamos los ligandos de Wnt expresados en la catarata inducida en K14E6, encontrando que ellos estabilizan β -catenina. Observamos incremento en la expresión de mRNA de Wnt4 y Wnt5a como inductores de la vía Wnt, pero no de otros inductores clásicos como Wnt1, Wnt3a o Wnt8. Consistente con esta observación, se reporta que los ligandos de Wnt también están expresados en las placas subcapsulares anteriores de los ratones transgénicos que sobreexpresan TGF- β 1 en el cristalino (Chong *et al.* 2009),

corroborando también la posibilidad que la señalización de Wnt está involucrada en la formación de catarata del ratón K14E6.

Un grupo emergente de modificadores de la cromatina y co-reguladores son los miembros de la familia de proteína asociado a metástasis (MTA). Esta familia es comprendida por tres proteínas diferentes (MTA1, MTA2 y MTA3), las cuales son parte integral del complejo NuRD (Remodelador de Nucleosoma y Desacetilación de histonas) y son esenciales para la función regulatoria de la transcripción vía desacetilación de histonas y remodelación de la cromatina. Se ha descrito que la familia de proteínas MTA tiene un papel importante en la regulación de EMT (Tuncay Cagatay *et al.* 2013). En particular MTA1 induce la EMT en células epiteliales mamarias (Yan *et al.* 2012) y también se ha reportado la regulación transcripcional hacia la alta de TGF- β 1 en epitelio mamario estimulado (Pakala *et al.* 2011). En la catarata del ratón K14E6 también se expresa a la alta MTA1 (mRNA y proteína), un efecto probablemente regulado de forma dependiente de TGF- β (Figura 4 y 8).

Finalmente, la estabilización de la proteína Smad7 (Figura 9), a través de un inhibidor selectivo del sitio catalítico de HDAC1 *in vivo* (Figura 8), claramente demuestra una inhibición de genes responsivos a TGF- β , que quizá conduzca a una reducción en la proliferación de células nucleadas localizadas en el núcleo del cristalino de ratones K14E6 tratados con iHDAC (Figura 11). La proteína Smad7 es controlada de forma endógena por modificaciones covalentes directas por HAT (Gronroos *et al.* 2002) y HDAC (Simonsson *et al.* 2005). La acetilación de lisina 64 y 70 por p300, protege contra la degradación proteosoma mediada por ligasa de ubiquitina Smurf1 (Gronroos *et al.* 2002). La estabilización de Smad7 depende en la competencia entre acetilación y desacetilación, como la HDAC1 desacetila las lisinas 64 y 67 (Simonsson *et al.* 2005). Es posible que la inhibición a través de la isoindolina 2b ofrezca a corto plazo algunas interesantes pistas para prevenir la formación de la catarata en el ratón K14E6.

Todos estos resultados sugieren que el desarrollo de la catarata del ratón K14E6 depende de TGF- β . Así como TGF- β es crucial para la EMT y OCP, nosotros proponemos al ratón K14E6 como un modelo adicional en el estudio de lesiones catarogénicas dependientes de TGF- β .

Conclusión

La oncoproteína E6 de VPH16 induce EMT en la catarata del ratón transgénico, la cual es una señal de OCP. El mecanismo molecular puede involucrar a las vías TGF- β y Wnt/ β -catenina, sugiriendo que el ratón transgénico K14E6 podría ser útil como un modelo para el estudio o tratamiento de cataratas inducidas por EMT. Dado que el proceso de EMT está involucrado en fibrosis renal, pulmonar y hepática, es posible que los mecanismos involucrados en estas enfermedades sean semejantes, lo cual sugiere formas parcialmente comunes de terapia de estas enfermedades.

Perspectiva

- Aplicación de la isoindolina 2b en otros modelos de catarata para validar el tratamiento.
- Utilización de otras isoindolinas para identificar selectividad de HDACs.
- Aplicación de la isoindolina 2b en otras enfermedades oculares donde la EMT tiene implicación como la degeneración retiniana y corneal.
- Explorar el uso del fármaco en otras enfermedades como la fibrosis renal, pulmonar y hepática para la aplicación terapéutica de las isoindolinas en otras enfermedades
- Ver posible uso de isoindolinas en el tratamiento de cáncer cervicouterino y explorar su efecto en el proceso de metástasis.

Bibliografía

Archbold, H. C., Y. X. Yang, L. Chen, and K. M. Cadigan. 2012. 'How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/beta-catenin pathway', *Acta Physiol (Oxf)*, 204: 74-109.

Billotte, C., and G. Berdeaux. 2004. 'Adverse clinical consequences of neodymium:YAG laser treatment of posterior capsule opacification', *J Cataract Refract Surg*, 30: 2064-71.

Bonilla-Delgado, J., G. Bulut, X. Liu, E. M. Cortes-Malagon, R. Schlegel, C. Flores-Maldonado, R. G. Contreras, S. H. Chung, P. F. Lambert, A. Uren, and P. Gariglio. 2012. 'The E6 oncoprotein from HPV16 enhances the canonical Wnt/beta-catenin pathway in skin epidermis in vivo', *Mol Cancer Res*, 10: 250-8.

Cano, A., M. A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M. J. Blanco, M. G. del Barrio, F. Portillo, and M. A. Nieto. 2000. 'The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression', *Nat Cell Biol*, 2: 76-83.

Capetanaki, Y., S. Smith, and J. P. Heath. 1989. 'Overexpression of the vimentin gene in transgenic mice inhibits normal lens cell differentiation', *J Cell Biol*, 109: 1653-64.

Cheng, S., A. S. Pollock, R. Mahimkar, J. L. Olson, and D. H. Lovett. 2006. 'Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury', *FASEB J*, 20: 1898-900.

Chilosi, M., V. Poletti, A. Zamo, M. Lestani, L. Montagna, P. Piccoli, S. Pedron, M. Bertaso, A. Scarpa, B. Murer, A. Cancellieri, R. Maestro, G. Semenzato, and C. Doglioni. 2003. 'Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis', *Am J Pathol*, 162: 1495-502.

Cho, H. J., K. E. Baek, S. Saika, M. J. Jeong, and J. Yoo. 2007. 'Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway', *Biochem Biophys Res Commun*, 353: 337-43.

Chong, C. C., R. J. Stump, F. J. Lovicu, and J. W. McAvoy. 2009. 'TGFbeta promotes Wnt expression during cataract development', *Exp Eye Res*, 88: 307-13.

Donaldson, P., J. Kistler, and R. T. Mathias. 2001. 'Molecular solutions to mammalian lens transparency', *News Physiol Sci*, 16: 118-23.

Eldred, J. A., L. J. Dawes, and I. M. Wormstone. 2011. 'The lens as a model for fibrotic disease', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 366: 1301-19.

Feil, R., J. Brocard, B. Mascrez, M. LeMeur, D. Metzger, and P. Chambon. 1996. 'Ligand-activated site-specific recombination in mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 10887-90.

Garcia-Zepeda, S. P., E. Garcia-Villa, J. Diaz-Chavez, R. Hernandez-Pando, and P. Gariglio. 2013. 'Resveratrol induces cell death in cervical cancer cells through apoptosis and autophagy', *Eur J Cancer Prev*, 22: 577-84.

Glozak, M. A., N. Sengupta, X. Zhang, and E. Seto. 2005. 'Acetylation and deacetylation of non-histone proteins', *Gene*, 363: 15-23.

Gonzalez-Mariscal, L., E. Garay, and M. Quiros. 2011. 'Identification of claudins by western blot and immunofluorescence in different cell lines and tissues', *Methods Mol Biol*, 762: 213-31.

Gronroos, E., U. Hellman, C. H. Heldin, and J. Ericsson. 2002. 'Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination', *Mol Cell*, 10: 483-93.

Guarino, M. 2007. 'Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion', *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 2153-60.

Hales, A. M., C. G. Chamberlain, B. Dreher, and J. W. McAvoy. 1999. 'Intravitreal injection of TGFbeta induces cataract in rats', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40: 3231-6.

Iwano, M., D. Plieth, T. M. Danoff, C. Xue, H. Okada, and E. G. Neilson. 2002. 'Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis', *J Clin Invest*, 110: 341-50.

Kalluri, R., and R. A. Weinberg. 2009. 'The basics of epithelial-mesenchymal transition', *J Clin Invest*, 119: 1420-8.

Kanski, J., ed. *Enfermedades del Cristalino*. Mosby 1996. 227-247.

Li, J. H., N. L. Wang, and J. J. Wang. 2008. 'Expression of matrix metalloproteinases of human lens epithelial cells in the cultured lens capsule bag', *Eye (Lond)*, 22: 439-44.

Lin, C. Y., P. H. Tsai, C. C. Kandaswami, P. P. Lee, C. J. Huang, J. J. Hwang, and M. T. Lee. 2011. 'Matrix metalloproteinase-9 cooperates with transcription factor Snail to induce epithelial-mesenchymal transition', *Cancer Sci*, 102: 815-27.

Liu, J., A. M. Hales, C. G. Chamberlain, and J. W. McAvoy. 1994. 'Induction of cataract-like changes in rat lens epithelial explants by transforming growth factor beta', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35: 388-401.

Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods*, 25: 402-8.

MacDonald, B. T., K. Tamai, and X. He. 2009. 'Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases', *Dev Cell*, 17: 9-26.

Maddala, R., V. N. Reddy, D. L. Epstein, and V. Rao. 2003. 'Growth factor induced activation of Rho and Rac GTPases and actin cytoskeletal reorganization in human lens epithelial cells', *Mol Vis*, 9: 329-36.

Mahoney, M. G., A. Simpson, M. Jost, M. Noe, C. Kari, D. Pepe, Y. W. Choi, J. Uitto, and U. Rodeck. 2002. 'Metastasis-associated protein (MTA)1 enhances migration, invasion, and anchorage-independent survival of immortalized human keratinocytes', *Oncogene*, 21: 2161-70.

Mancilla-Percino, Teresa, Lourdes Carrilo, Luis S Zamudio Rivera, Hiram I, Beltran, and Roberto Farfan. 2001. 'Synthesis and characterization of new 2-substituted isoindoline derivatives of alfa-amino acids', *Organic Preparations and Procedures International*, 33: 341-49.

Marcantonio, J. M., and G. F. Vrensen. 1999. 'Cell biology of posterior capsular opacification', *Eye (Lond)*, 13 (Pt 3b): 484-8.

Mohan, R., S. K. Chintala, J. C. Jung, W. V. Villar, F. McCabe, L. A. Russo, Y. Lee, B. E. McCarthy, K. R. Wollenberg, J. V. Jester, M. Wang, H. G. Welgus, J. M. Shipley, R. M. Senior, and M. E. Fini. 2002. 'Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration', *J Biol Chem*, 277: 2065-72.

Moustakas, A., and C. H. Heldin. 2007. 'Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression', *Cancer Sci*, 98: 1512-20.

Nathu, Z., D. J. Dwivedi, J. R. Reddan, H. Sheardown, P. J. Margetts, and J. A. West-Mays. 2009. 'Temporal changes in MMP mRNA expression in the lens epithelium during anterior subcapsular cataract formation', *Exp Eye Res*, 88: 323-30.

Nguyen, M. M., S. J. Potter, and A. E. Griep. 2002. 'Deregulated cell cycle control in lens epithelial cells by expression of inhibitors of tumor suppressor function', *Mech Dev*, 112: 101-13.

Nuovo, G. J. 2001. 'Co-labeling using *in situ* PCR: a review', *J Histochem Cytochem*, 49: 1329-39.

Ocadiz-Delgado, R., E. Castaneda-Saucedo, A. K. Indra, R. Hernandez-Pando, P. Flores-Guizar, J. L. Cruz-Colin, F. Recillas-Targa, G. Perez-Ishiwara, L. Covarrubias, and P. Gariglio. 2012. 'RXRalpha deletion and E6E7 oncogene expression are sufficient to induce cervical malignant lesions in vivo', *Cancer Lett*, 317: 226-36.

Pakala, S. B., K. Singh, S. D. Reddy, K. Ohshiro, D. Q. Li, L. Mishra, and R. Kumar. 2011. 'TGF-beta1 signaling targets metastasis-associated protein 1, a new effector in epithelial cells', *Oncogene*, 30: 2230-41.

Reddy, M. A., P. J. Francis, V. Berry, S. S. Bhattacharya, and A. T. Moore. 2004. 'Molecular genetic basis of inherited cataract and associated phenotypes', *Surv Ophthalmol*, 49: 300-15.

Saika, S. 2004. 'Relationship between posterior capsule opacification and intraocular lens biocompatibility', *Prog Retin Eye Res*, 23: 283-305.

Saika. 2006. 'TGFbeta pathobiology in the eye', *Lab Invest*, 86: 106-15.

Saika, S., T. Miyamoto, I. Ishida, K. Shirai, Y. Ohnishi, A. Ooshima, and J. W. McAvoy. 2002. 'TGFbeta-Smad signalling in postoperative human lens epithelial cells', *Br J Ophthalmol*, 86: 1428-33.

Saika, S., Y. Okada, T. Miyamoto, Y. Ohnishi, A. Ooshima, and J. W. McAvoy. 2001. 'Smad translocation and growth suppression in lens epithelial cells by endogenous TGFbeta2 during wound repair', *Exp Eye Res*, 72: 679-86.

Saito-Diaz, K., T. W. Chen, X. Wang, C. A. Thorne, H. A. Wallace, A. Page-McCaw, and E. Lee. 2013. 'The way Wnt works: components and mechanism', *Growth Factors*, 31: 1-31.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (Plainview, NY. New York.).

Schmalfeldt, B., D. Prechtel, K. Harting, K. Spathe, S. Rutke, E. Konik, R. Fridman, U. Berger, M. Schmitt, W. Kuhn, and E. Lengyel. 2001. 'Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer', *Clin Cancer Res*, 7: 2396-404.

Serafin-Higuera, N., J. Hernandez-Sanchez, R. Ocadiz-Delgado, J. Vazquez-Hernandez, M. E. Albino-Sanchez, R. Hernandez-Pando, and P. Gariglio. 2012. 'Retinoic acid receptor beta deficiency reduces splenic dendritic cell population in a conditional mouse line', *Immunol Lett*, 146: 15-24.

Simonsson, M., C. H. Heldin, J. Ericsson, and E. Gronroos. 2005. 'The balance between acetylation and deacetylation controls Smad7 stability', *J Biol Chem*, 280: 21797-803.

Song, S., A. Liem, J. A. Miller, and P. F. Lambert. 2000. 'Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis', *Virology*, 267: 141-50.

Song, S., H. C. Pitot, and P. F. Lambert. 1999. 'The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals', *J Virol*, 73: 5887-93.

Strutz, F., M. Zeisberg, F. N. Ziyadeh, C. Q. Yang, R. Kalluri, G. A. Muller, and E. G. Neilson. 2002. 'Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation', *Kidney Int*, 61: 1714-28.

Tamiya, S., I. M. Wormstone, J. M. Marcantonio, J. Gavrilovic, and G. Duncan. 2000. 'Induction of matrix metalloproteinases 2 and 9 following stress to the lens', *Exp Eye Res*, 71: 591-7.

Tuncay Cagatay, S., I. Cimen, B. Savas, and S. Banerjee. 2013. 'MTA-1 expression is associated with metastasis and epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer cells', *Tumour Biol*, 34: 1189-204.

Wertheimer, C., R. Liegl, M. Kernt, D. Docheva, A. Kampik, and K. H. Eibl-Lindner. 2014. 'EGFR-blockade with erlotinib reduces EGF and TGF-beta2 expression and the actin-cytoskeleton which influences different aspects of cellular migration in lens epithelial cells', *Curr Eye Res*, 39: 1000-12.

Wormstone, I. M. 2002. 'Posterior capsule opacification: a cell biological perspective', *Exp Eye Res*, 74: 337-47.

Wu, Y., and B. P. Zhou. 2010. 'Snail: More than EMT', *Cell Adh Migr*, 4: 199-203.

Xue, Y., J. Wong, G. T. Moreno, M. K. Young, J. Cote, and W. Wang. 1998. 'NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities', *Mol Cell*, 2: 851-61.

Yan, D., D. Avtanski, N. K. Saxena, and D. Sharma. 2012. 'Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires beta-catenin activation via Akt/GSK3- and MTA1/Wnt1 protein-dependent pathways', *J Biol Chem*, 287: 8598-612.

Yang, J., R. W. Shultz, W. M. Mars, R. E. Wegner, Y. Li, C. Dai, K. Nejak, and Y. Liu. 2002. 'Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy', *J Clin Invest*, 110: 1525-38.







Younes, A., Y. Oki, R. G. Bociek, J. Kuruvilla, M. Fanale, S. Neelapu, A. Copeland, D. Buglio, A. Galal, J. Besterman, Z. Li, M. Drouin, T. Patterson, M. R. Ward, J. K. Paulus, Y. Ji, L. J. Medeiros, and R. E. Martell. 2011. 'Mocetinostat for relapsed classical Hodgkin's lymphoma: an open-label, single-arm, phase 2 trial', *Lancet Oncol*, 12: 1222-8.

Zeisberg, M., Y. Maeshima, B. Mosterman, and R. Kalluri. 2002. 'Renal fibrosis. Extracellular matrix microenvironment regulates migratory behavior of activated tubular epithelial cells', *Am J Pathol*, 160: 2001-8.

Zhang, H., L. C. Stephens, and R. Kumar. 2006. 'Metastasis tumor antigen family proteins during breast cancer progression and metastasis in a reliable mouse model for human breast cancer', *Clin Cancer Res*, 12: 1479-86.

Research Article

HPV16-E6 Oncoprotein Activates TGF- β and Wnt/ β -Catenin Pathways in the Epithelium-Mesenchymal Transition of Cataracts in a Transgenic Mouse Model

Genaro Rodríguez-Uribe ¹, Nicolas Serafin-Higuera ²,
Gabriela Damian-Morales,³ Enoc Mariano Cortés-Malagón,³ Vicky García-Hernández,⁴
Odette Verdejo-Torres,⁴ Jessica Paulina Campos-Blázquez,⁴ Cynthia R. Trejo-Muñoz,⁵
Rubén Gerardo Contreras ⁴, Rodolfo Ocadiz-Delgado ¹, Carmen Palacios-Reyes,³
Paul F. Lambert,⁶ Anne E. Griep,⁷ Teresa Mancilla-Percino,⁸ Jaime Escobar-Herrera,⁹
Elizabeth Álvarez-Ríos,¹ Carlos Ugarte-Briones,³ José Moreno,³
Patricio Gariglio ¹ and José Bonilla-Delgado ³

¹Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Ciudad de México, Mexico

²Unit of Health Sciences, Faculty of Odontology, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, BC, Mexico

³Research Unit, Laboratory of Genetics and Molecular Diagnosis, Hospital Juárez de México, Ciudad de México, Mexico

⁴Department of Physiology Biophysics and Neurosciences, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Ciudad de México, Mexico

⁵Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, Mexico

⁶McArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin, School of Medicine and Public Health, Madison, Wisconsin, USA

⁷Department of Cell and Regenerative Biology, School of Medicine and Public Health, University of Wisconsin, Madison, WI, USA

⁸Department of Chemistry, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Ciudad de México, Mexico

⁹Department of Cellular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Ciudad de México, Mexico

Correspondence should be addressed to Patricio Gariglio; vidal@cinvestav.mx and José Bonilla-Delgado; jbonilla@cinvestav.mx

Received 30 November 2017; Revised 14 March 2018; Accepted 3 April 2018; Published 16 May 2018

Academic Editor: Bo Zuo

Copyright © 2018 Genaro Rodríguez-Uribe et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Objective. This work aimed to determine if cataractous changes associated with EMT occurring in the K14E6 mice lenses are associated with TGF- β and Wnt/ β -catenin signaling activation. **Materials and Methods.** Cataracts of K14E6 mice were analysed histologically; and components of TGF- β and Wnt/ β -catenin signaling were evaluated by Western blot, RT-qPCR, in situ RT-PCR, IHC, or IF techniques. Metalloproteinases involved in EMT were also assayed using zymography. The endogenous stabilisation of Smad7 protein was also assessed using an HDAC inhibitor. **Results.** The K14E6 mice, which displayed binocular cataracts in 100% of the animals, exhibited loss of tissue organisation, cortical liquefaction, and an increase in the number of hyperproliferative-nucleated cells with mesenchymal-like characteristics in the lenses. Changes in lenses' cell morphology were due to actin filaments reorganisation, activation of TGF- β and Wnt/ β -catenin pathways, and the accumulation of MTA1 protein. Finally, the stabilisation of Smad7 protein diminishes cell proliferation, as well as MTA1 protein levels. **Conclusion.** The HPV16-E6 oncoprotein induces EMT in transgenic mice cataracts. The molecular mechanism may involve TGF- β and Wnt/ β -catenin pathways, suggesting that the K14E6 transgenic mouse could be a useful model for the study or treatment of EMT-induced cataracts.

Anexo II. Solicitud de patente ante el IMPI.

Gaceta: Solicitudes de Patente	Ejemplar: Agosto de 2015	Sección: Solicitudes normales
Número de solicitud	MX/a/2014/002124	
Fecha de presentación	24/02/2014	
Solicitante(s)	CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I. P. N. [MX]; GUSTAVO A. MADERO, Distrito Federal, 07360, MX	
Inventor(es)	GENARO RODRÍGUEZ URIBE [MX]; NICOLAS SERAFIN HIGUERA [MX]; JOSÉ BONILLA DELGADO [MX]; CYNTHIA RAQUEL TREJO MUÑOZ [MX]; PATRICIO GARIGLIO VIDAL [MX]; TERESA MANCILLA PERCINO [MX]; GUSTAVO A. MADERO, Distrito Federal, 07360, MX	
Agente	LUIS ANTONIO CARREÑO SÁNCHEZ; Instituto Politécnico Nacional, 2508, Edificio Administrativo, 3er. piso, Subdirección de Vinculación Tecnológica, Col. San Pedro Zacatenco, 07360, Distrito Federal, México	
Clasificación	A61K31/33 (2006-01); A61K31/223 (2006-01); A61K31/44 (2006-01); A61K31/505 (2006-01); A61K31/223 (2006-01); A61K31/44 (2006-01); A61K31/505 (2006-01)	
Título	METODOS PARA LA RPEVENCION DE OPACIDAD CAPSULAR POSTERIOR MEDIANTE LA INHIBICION DE LAS VIAS TGF- β Y WNT/ β -CATENINA POR MEDIO DE UN INHIBIDOR DE HDAC.	
Resumen	La presente invención describe el uso de inhibidores de HDAC, como por ejemplo isoindolinas-2-sustituidas derivadas de aminoácidos para prevenir la formación de opacidad capsular posterior y/o catarata, específicamente inhibidores de la HDAC para inhibir las vías TGF- β y WNT/ β -Catenina. El efecto de dichos inhibidores fue evaluado en un modelo animal de catarata (ratón transgénico K14E6), donde se observó que la administración de dichos inhibidores disminuye la formación de catarata.	
Fecha de Puesta en Circulación	2015-09-09	
URL Ficha:	http://siga.impi.gob.mx/newSIGA/content/common/ficha.jsf?idFicha=5790544	
