

LA ENZIMA CONJUGADORA DE SUMO UBC9 COMO BIOMARCADOR PARA LAS INFECCIONES CERVICALES POR VPH

Domenico Mattoscio^{1,§}, Chiara Casadio^{2,§}, Marzia Fumagalli³,
Mario Sideri⁴ y Susanna Chiocca*

¹ Instituto Europeo de Oncología, Departamento de Oncología Experimental, Via Adamello 16, 20139 Milán, Italia, ² Instituto Europeo de Oncología, Departamento de Patología, 20141 Milán, Italia, ³ TTFactor Srl, Via Adamello 16, 20139 Milán, Italia, ⁴ Instituto Europeo de Oncología, División de Ginecología, 20141 Milán, Italia.

§ Autores que colaboraron por igual

*Autor para la correspondencia. Domicilio postal: European Institute of Oncology, Department of Experimental Oncology, Via Adamello 16, 20139 Milan, Italy.

Teléfono SC: +39-02-57489835

e-mail: susanna.chiocca@ieo.eu

RESUMEN

Los virus del papiloma humano (VPH) infectan el epitelio estratificado y son agentes causales del cáncer cervical, la segunda causa más común de muertes por cáncer en mujeres. Un aspecto crítico que todavía persiste en el campo del VPH es la selección de métodos de diagnóstico altamente sensitivos y específicos para el VPH. En el presente proporcionamos evidencia de que la crucial enzima conjugadora Ubc9, modificador tipo ubiquitina de pequeño tamaño (SUMO) E2, muestra significativa regulación ascendente en las lesiones cervicales. La detección de Ubc9 podría entonces ser utilizada para el diagnóstico y/o monitoreo del progreso de una infección oncogénica por VPH.

ANTECEDENTES/INTRODUCCION

Los virus del papiloma humano (VPH) son un grupo de virus pequeños de cadena doble de ADN que se conoce son la principal causa de cáncer cervical. En la actualidad está emergiendo evidencia de su papel en la etiología de los cánceres de cabeza y cuello y en otros cánceres tanto en hombres como en mujeres.

Los VPH pueden clasificarse como virus de bajo y de alto riesgo. En el cuello uterino, los VHP de bajo riesgo están asociados con una variedad de verrugas benignas, mientras que las infecciones por VPH de alto riesgo, como el VPH16, se manifiestan por una progresión intraepitelial maligna producida por las proteínas virales E6 y E7 (1, 2). E6 y E7 son proteínas oncovirales de alto riesgo que, mediante la degradación respectiva de supresores tumorales p53 y pRb (proteína supresora tumoral de retinoblastoma) a través de la vía de la ubiquitina-proteasoma, perturban la regulación del ciclo celular y las funciones celulares normales en las células infectadas (1, 2).

Evidencia sólida y convincente actualmente refuerza la aceptación de las técnicas de prevención del cáncer cervical. La estrategia es dirigirse y enfocarse enfáticamente en las infecciones persistentes producidas por el VPH. Además de los exámenes de laboratorio para detectar el ADN del VPH, existen otros marcadores prometedores de la infección oncogénica por VPH. Los mismos incluyen: i) marcadores de expresión incrementada de ARNm y proteínas de VPH; ii) marcadores de proliferación celular incrementada, como Ki-67, MCM2, TOP2a, y p16INK4a; y

iii) marcadores de inestabilidad cromosomal, como la ganancia en el brazo del cromosoma 3q y la integración del ADN del VPH (3).

En la actualidad, el candidato más promisorio como biomarcador clínico es la detección de la sobreexpresión de p16INK4a (p16) (4-7). La sobreexpresión de p16 es resultado de la inactivación de la proteína de retinoblastoma que regula el ciclo celular (pRb) por parte de la E7 de los VPH de alto riesgo (4-7). La detección de p16 tiene en la actualidad múltiples indicaciones clínicas ya sea en los programas de detección o prevención, a nivel citológico o histopatológico (3).

El diagnóstico más utilizado de VPH todavía se basa en la citología, ya que el virus claramente altera las células infectadas generando una vacuolización característica alrededor del núcleo. Este fenómeno distintivo se conoce como coilocitosis e indica la presencia de una infección por VPH. El coilocito es una célula del epitelio escamoso que ha sufrido ciertos cambios estructurales que se producen como resultado de la infección de la célula por parte del VPH (8). Dichos cambios morfológicos no necesariamente son displásicos, como aquellos presentes en la neoplasia cervical intraepitelial (NIC). Recientemente se ha propuesto que la p16 es un marcador para la detección de neoplasias cervicales intraepiteliales 2 y 3 (NIC2 y NIC3) o como prueba de triaje para identificar mujeres VPH positivas con riesgo de desarrollo de NIC3 dentro de los próximos 3 años. Por lo tanto, aquellas mujeres VPH p16 positivas se beneficiarían claramente de una intervención clínica y colposcopia tempranas (5). Sin embargo, el marcador p16 no siempre es efectivo en la detección de NIC2 (comunicación personal entre Chiara Casadio y Mario Sideri).

La sumoilación es una modificación postraducciona en la cual los modificadores tipo ubiquitina de pequeño tamaño (SUMO) se fijan de manera reversible a la proteína diana por medio de una vía similar a la de la ubiquitina, con resultados diversos en cuanto a la estabilidad proteica, interacción y localización, reparación y replicación del ADN, regulación transcripcional, control del ciclo celular, apoptosis, señalización celular y replicación viral (9-11). Entre las distintas maneras de explotación de los sistemas anfitriones, se conoce también que los virus tienen como blanco los sistemas de modificación postraduccionales, como la vía SUMO (analizada en (11-13)). De hecho, la mayoría de los virus ADN (parvovirus, adenovirus, papovavirus y herpesvirus) contienen proteínas virales que se sumoilan o que interactúan con componentes SUMO (analizado en (11-13)). La conjugación de las proteínas diana con los SUMO requiere de una serie de eventos catalizados por las familia de enzimas

E1 (activadoras de los SUMO SAE1/SAE2), E2 (conjugadoras de los SUMO Ubc9) y E3 (ligadoras de los SUMO). Los tejidos humanos expresan cuatro miembros de la familia SUMO: SUMO1, SUMO2 y SUMO3, que son casi idénticos al SUMO1, todos ellos expresados ubicuamente, y SUMO4, que es muy similar a SUMO2, pero que se expresa principalmente en el riñón, los nódulos linfáticos y el bazo (analizados en (9, 10, 14)).

Nuestro laboratorio ha demostrado anteriormente que otras proteínas virales, como la proteína adenoviral Gam1, pueden desregular la vía SUMO al interactuar con las proteínas celulares (14-20). Datos recientes también describen que las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo son capaces de utilizar el sistema de sumoilación como blanco al reducir los niveles de la enzima conjugadora de SUMO Ubc9 en las líneas celulares (21) o modular la sumoilación de las proteínas anfitrionas (22, 23).

Entonces nos preguntamos si podríamos evaluar las diferencias en la expresión de Ubc9 endógena en lesiones cervicales VPH positivas de pacientes tratadas en el Instituto Europeo de Oncología (Milán, Italia).

Los estudios presentes muestran la regulación ascendente de la enzima conjugadora de la maquinaria de sumoilación Ubc9 en biopsias cervicales de manera dependiente de la lesión. Nuestros datos señalan un posible uso de la Ubc9 como biomarcador para la infección oncogénica por VPH. En efecto, la Ubc9 permite una detección precisa, sensible y selectiva de la infección.

METODOS

Análisis estadístico

Se llevó a cabo un ANOVA unidireccional seguido de un test de Bonferroni con la utilización de GraphPad Prism versión 5.00 (programa GraphPad, La Jolla, California, Estados Unidos, www.graphpad.com). Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos.

Análisis inmunohistoquímico

Para la inmunohistoquímica, las muestras cervicales se fijaron en formalina y se parafinaron (FFPE) de acuerdo a los procedimientos establecidos. Todas las secciones se tiñeron con hematoxilina de Mayer y se visualizaron con el uso de un microscopio de campo brillante. Se generaron imágenes con un microscopio vertical BX51 de Olympus America Inc. Se utilizó el siguiente anticuerpo primario: anti-Ubc9 (Santa Cruz, SC10759) (Recuperación del antígeno a 99° C por 40 minutos en baño de agua,

solución reguladora EDTA pH 8.0, enfriamiento a temperatura ambiente por 20 minutos), 1:3200, incubación O/N a 4° C. Se utilizó el kit Envision de DAKO y luego del paso de visualización cromogénica mediante el uso de un cromógeno 3,3' diaminobenzidina (DAB), se contratiñeron los portaobjetos con hematoxilina y se colocaron cubreobjetos.

RESULTADOS

Análisis inmunohistoquímico de neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC).

Llevamos a cabo un análisis de inmunohistoquímica (IHQ) para evaluar si existía una expresión diferencial de la Ubc9 en distintos grados de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC), también conocidos como HSIL (lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado) o LSIL (lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado) en pacientes VPH positivas. Por lo general las NIC1 se refieren a LSIL, mientras que las NIC2 y 3 se refieren a HSIL.

Analizamos un total de aproximadamente 130 pacientes, entre las cuales 54 eran LSIL y 78 HSIL (Tabla 1). En algunas pacientes se encontraron lesiones de alto y de bajo grado y por lo tanto se calificaron ambas lesiones. En el análisis también incluimos tejido normal adyacente.

Como lo demuestra el IHQ representativo que se reporta en la Figura 1A, encontramos que la expresión de la Ubc9 aumenta a medida que las lesiones van de normal a alto grado. De hecho, en el epitelio normal la Ubc9 se expresa casi exclusivamente en células basales, mientras que en las lesiones de bajo grado la Ubc9 también se expresa en la zona media del epitelio escamoso. Por último, en las HSIL, la Ubc9 se expresa en grandes cantidades prácticamente en todas las células de la lesión.

Lo que es más, en algunos experimentos de IHQ en muestras cervicales fijadas en formalina y parafinadas de la misma población de pacientes, también cuantificamos el porcentaje de células Ubc9 positivas mediante análisis computacional. Tal como se representa en la Figura 1B, a medida que la lesión cervical progresa de LSIL a HSIL, se produce un aumento estadístico significativo en los niveles de expresión de la Ubc9. A pesar de que los tejidos no infectados tienen un nivel basal de Ubc9, el porcentaje de células Ubc9 positivas aumenta considerablemente en las lesiones cervicales de bajo grado. Este fenotipo se ve incluso más exacerbado en los tejidos de alto grado (Figura 1B), confirmando una vez más que la expresión de la Ubc9

aumenta a medida que progresa la lesión cervical. Por lo tanto, nuestros datos señalan la expresión cuantitativa y cualitativa de la Ubc9 como un excelente posible marcador para la identificación de lesiones cervicales NIC1 y NIC2/3. De manera interesante, la Figura 1A muestra que los niveles de la proteína Ubc9 también están aumentados en el estroma subyacente a la lesión cancerosa y todavía más en las HSIL. En la actualidad estamos investigando este fenómeno.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El concepto del uso de la Ubc9 y otros componentes de la vía SUMO como marcadores diagnósticos también ha surgido en otros estudios.

Ronen et al. han sugerido que la Ubc9 podría jugar un rol en la tumorigénesis y en la progresión tumoral en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y que podría potencialmente ser utilizada como marcador molecular para la progresión del cáncer de cabeza y cuello (24).

Szendefi et al. admiten el uso de promielocitos, cuerpos nucleares con proteína y su asociación a SUMO1, como marcador citodiagnóstico paralelo a la progresión del cáncer cervical (25).

Wang et al. demostraron que la expresión de la SENP1 (proteasa SUMO específica 1, miembro de la familia de proteasas de de-sumoilación) se correlacionaba directamente con la agresividad y recurrencia del cáncer de próstata (26). Sus resultados demostraron cómo la SENP1 contribuía a la progresión del cáncer de próstata, y sugirieron que la SENP1 podría ser un marcador pronóstico y un blanco terapéutico para las metástasis en pacientes con cáncer de próstata.

Chen et al. evaluaron la contribución de la Ubc9 a la quimiorresistencia en pacientes con cáncer de mama. El nivel de expresión de la Ubc9 fue determinado por IHQ: la proporción de células Ubc9 positivas era más alto en el carcinoma ductal invasivo que en los tejidos mamarios normales. Adicionalmente, aparte de la escasa respuesta clínica a la quimioterapia, la expresión elevada de Ubc9 se asociaba con pobre diferenciación tumoral, mayor tamaño del tumor, estado clínico avanzado, metástasis en nodos linfáticos, fenotipo basal y por lo tanto, un peor pronóstico clínico (27).

En la población de pacientes analizadas, también encontramos un aumento de la expresión de Ubc9 en los adenocarcinomas (Figura 2). Si los tomamos en conjunto, nuestros resultados son consistentes con aquellos estudios que reportan

sobreexpresión de la Ubc9 y/o contribución a la tumorigénesis en diversos tipos de cánceres ((24, 28-39) y analizado en (40)).

El diagnóstico preciso de LSIL y HSIL es el determinante más importante y fundamental en la prevención del cáncer cervical. Las estrategias actuales implican tanto la identificación como la erradicación de NIC2/3 para prevenir el cáncer invasivo y monitorear los LSIL hasta su resolución o posible progresión hacia HSIL. El desencadenante para el tratamiento es el diagnóstico histopatológico de NIC2/3, el cual los datos actuales indican como muy sensible a la tinción con un anticuerpo que reconoce la enzima conjugadora de la vía de sumoilación Ubc9. Además, la Ubc9 también puede detectar las NIC1, constituyéndola en un marcador valioso para evitar el sobrediagnóstico y en consecuencia, el sobretatamiento.

La prevención de cáncer cervical es un problema a nivel mundial, que crece cada vez más principalmente en los países en desarrollo. Para aumentar el poder de detección, los patólogos deben ser entrenados para identificar los diagnósticos de NIC2/3, de manera certera. Por lo tanto, la tinción de la Ubc9 podría ser muy útil y existe claramente un mercado potencial para implementar esta noción. En conclusión, las proteínas involucradas en la vía de sumoilación, en especial la Ubc9, podrían explotarse para prevenir el cáncer cervical.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Reconocimientos

Los autores agradecen a las pacientes que contribuyeron en este proyecto.

También agradecemos enormemente a la Dra. Francesca Carozzi (ISPO, Florencia Toscana) y al Dr. Giovanni Negri (Hospital Central de Bolzano, Italia) por sus útiles sugerencias y el tiempo que nos dedicaron para evaluar los portaobjetos.

Un agradecimiento especial para Sara Boveri y Alessandra Cavallon.

Este trabajo contó con el apoyo de becas de la Comisión Europea-FP7-HPVAHEAD y la Asociación Italiana para la Investigación del Cáncer (A.I.R.C.) a S.C. D.M. es miembro de la Fundación Italiana para la Investigación del Cáncer (F.I.R.C.).

Lo más importante, gracias Mario por tu constante entusiasmo en este proyecto. Te extrañamos cada día.

REFERENCIAS

1. Moody, C. A., and Laimins, L. A. (2010) **Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation.** *Nat Rev Cancer* **10**, 550-560
2. Tommasino, M. (2014) **The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis.** *Semin Cancer Biol* **26**, 13-21
3. Schiffman, M., Wentzensen, N., Wacholder, S., Kinney, W., Gage, J. C., and Castle, P. E. (2011) **Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer.** *J Natl Cancer Inst* **103**, 368-383
4. Carozzi, F., Confortini, M., Dalla Palma, P., Del Mistro, A., Gillio-Tos, A., De Marco, L., Giorgi-Rossi, P., Pontenani, G., Rosso, S., Sani, C., Sintoni, C., Segnan, N., Zorzi, M., Cuzick, J., Rizzolo, R., and Ronco, G. (2008) **Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial.** *Lancet Oncol* **9**, 937-945
5. Carozzi, F., Gillio-Tos, A., Confortini, M., Del Mistro, A., Sani, C., De Marco, L., Girlando, S., Rosso, S., Naldoni, C., Dalla Palma, P., Zorzi, M., Giorgi-Rossi, P., Segnan, N., Cuzick, J., and Ronco, G. (2013) **Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial.** *The Lancet. Oncology* **14**, 168-176
6. Denton, K. J., Bergeron, C., Klement, P., Trunk, M. J., Keller, T., and Ridder, R. (2010) **The sensitivity and specificity of p16(INK4a) cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results.** *Am J Clin Pathol* **134**, 12-21
7. Tsoumpou, I., Arbyn, M., Kyrgiou, M., Wentzensen, N., Koliopoulos, G., Martin-Hirsch, P., Malamou-Mitsi, V., and Paraskeva, E. (2009) **p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis.** *Cancer Treat Rev* **35**, 210-220
8. Nucci, M. R., Oliva, E. (2009) **Gynecologic pathology: A volume in the series - Foundations in diagnostic Pathology.**
9. Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007) **Concepts in sumoylation: a decade on.** *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 947-956
10. Hay, R. T. (2005) **SUMO: a history of modification.** *Mol Cell* **18**, 1-12
11. Mattoscio, D., Segre C.V., Chiocca S. (2013) **Viral manipulation of cellular protein conjugation pathways: The SUMO lesson.** *World Journal of Virology* **2**
12. Boggio, R., and Chiocca, S. (2006) **Viruses and sumoylation: recent highlights.** *Curr Opin Microbiol* **9**, 430-436
13. Everett, R. D., Boutell, C., and Hale, B. G. (2013) **Interplay between viruses and host sumoylation pathways.** *Nat Rev Microbiol* **11**, 400-411
14. Citro, S., and Chiocca, S. (2013) **Sumo paralogs: redundancy and divergencies.** *Front Biosci (Schol Ed)* **5**, 544-553
15. Boggio, R., and Chiocca, S. (2005) **Gam1 and the SUMO pathway.** *Cell Cycle* **4**, 533-535

16. Boggio, R., Colombo, R., Hay, R. T., Draetta, G. F., and Chiocca, S. (2004) **A mechanism for inhibiting the SUMO pathway.** *Mol Cell* **16**, 549-561
17. Boggio, R., Passafaro, A., and Chiocca, S. (2007) **Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation.** *J Biol Chem* **282**, 15376-15382
18. Chiocca, S., Kurtev, V., Colombo, R., Boggio, R., Scurpi, M. T., Brosch, G., Seiser, C., Draetta, G. F., and Cotten, M. (2002) **Histone deacetylase 1 inactivation by an adenovirus early gene product.** *Curr Biol* **12**, 594-598
19. Colombo, R., Boggio, R., Seiser, C., Draetta, G. F., and Chiocca, S. (2002) **The adenovirus protein Gam1 interferes with sumoylation of histone deacetylase 1.** *EMBO Rep* **3**, 1062-1068
20. Pozzebon, M. E., Varadaraj, A., Mattosio, D., Jaffray, E. G., Miccolo, C., Galimberti, V., Tommasino, M., Hay, R. T., and Chiocca, S. (2013) **BC-box protein domain-related mechanism for VHL protein degradation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 18168-18173
21. Heaton, P. R., Deyrieux, A. F., Bian, X. L., and Wilson, V. G. (2011) **HPV E6 proteins target Ubc9, the SUMO conjugating enzyme.** *Virus Res* **158**, 199-208
22. Chand, V., John, R., Jaiswal, N., Johar, S. S., and Nag, A. (2014) **High-risk HPV16E6 stimulates hADA3 degradation by enhancing its SUMOylation.** *Carcinogenesis* **35**, 1830-1839
23. Jaiswal, N., John, R., Chand, V., and Nag, A. (2014) **Oncogenic Human Papillomavirus 16E7 modulates SUMOylation of FoxM1b.** *Int J Biochem Cell Biol* **58C**, 28-36
24. Ronen, O., Malone, J. P., Kay, P., Bivens, C., Hall, K., Paruchuri, L. P., Mo, Y. Y., Robbins, K. T., and Ran, S. (2009) **Expression of a novel marker, Ubc9, in squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Head Neck* **31**, 845-855
25. Szendefi, M., Walt, H., Krasieva, T. B., Caduff, R., Osann, K. E., and LaMorte, V. J. (2003) **Association between promyelocyte protein and small ubiquitin-like modifier protein and the progression of cervical neoplasia.** *Obstet Gynecol* **102**, 1269-1277
26. Wang, Q., Xia, N., Li, T., Xu, Y., Zou, Y., Zuo, Y., Fan, Q., Bawa-Khalfe, T., Yeh, E. T., and Cheng, J. (2013) **SUMO-specific protease 1 promotes prostate cancer progression and metastasis.** *Oncogene* **32**, 2493-2498
27. Chen, S. F., Gong, C., Luo, M., Yao, H. R., Zeng, Y. J., and Su, F. X. (2011) **Ubc9 expression predicts chemoresistance in breast cancer.** *Chin J Cancer* **30**, 638-644
28. Geletu, M., Balkhi, M. Y., Peer Zada, A. A., Christopeit, M., Pulikkan, J. A., Trivedi, A. K., Tenen, D. G., and Behre, G. (2007) **Target proteins of C/EBPalphap30 in AML: C/EBPalphap30 enhances sumoylation of C/EBPalphap42 via up-regulation of Ubc9.** *Blood* **110**, 3301-3309
29. Han, J. Y., Lee, G. K., Yoo, S. Y., Yoon, S. J., Cho, E. Y., Kim, H. T., and Lee, J. S. (2010) **Association of SUMO1 and UBC9 genotypes with tumor response in non-small-cell lung cancer treated with irinotecan-based chemotherapy.** *Pharmacogenomics J* **10**, 86-93
30. Li, H., Niu, H., Peng, Y., Wang, J., and He, P. (2013) **Ubc9 promotes invasion and metastasis of lung cancer cells.** *Oncol Rep* **29**, 1588-1594
31. McDoniels-Silvers, A. L., Stoner, G. D., Lubet, R. A., and You, M. (2002) **Differential expression of critical cellular genes in human lung**

- adenocarcinomas and squamous cell carcinomas in comparison to normal lung tissues.** *Neoplasia* **4**, 141-150
32. Mo, Y. Y., Yu, Y., Theodosiou, E., Ee, P. L., and Beck, W. T. (2005) **A role for Ubc9 in tumorigenesis.** *Oncogene* **24**, 2677-2683
 33. Moschos, S. J., Smith, A. P., Mandic, M., Athanassiou, C., Watson-Hurst, K., Jukic, D. M., Edington, H. D., Kirkwood, J. M., and Becker, D. (2007) **SAGE and antibody array analysis of melanoma-infiltrated lymph nodes: identification of Ubc9 as an important molecule in advanced-stage melanomas.** *Oncogene* **26**, 4216-4225
 34. Tomasi, M. L., Tomasi, I., Ramani, K., Pascale, R. M., Xu, J., Giordano, P., Mato, J. M., and Lu, S. C. (2012) **S-adenosyl methionine regulates ubiquitin-conjugating enzyme 9 protein expression and sumoylation in murine liver and human cancers.** *Hepatology* **56**, 982-993
 35. Wang, S., Jiao, B., Geng, S., Ma, S., Liang, Z., and Lu, S. (2014) **Combined aberrant expression of microRNA-214 and UBC9 is an independent unfavorable prognostic factor for patients with gliomas.** *Med Oncol* **31**, 767
 36. Wu, F., Zhu, S., Ding, Y., Beck, W. T., and Mo, Y. Y. (2009) **MicroRNA-mediated regulation of Ubc9 expression in cancer cells.** *Clin Cancer Res* **15**, 1550-1557
 37. Zhao, Z., Tan, X., Zhao, A., Zhu, L., Yin, B., Yuan, J., Qiang, B., and Peng, X. (2012) **microRNA-214-mediated UBC9 expression in glioma.** *BMB Rep* **45**, 641-646
 38. Zhu, S., Sachdeva, M., Wu, F., Lu, Z., and Mo, Y. Y. (2010) **Ubc9 promotes breast cell invasion and metastasis in a sumoylation-independent manner.** *Oncogene* **29**, 1763-1772
 39. Agboola, A. O., Musa, A. A., Ayoade, B. A., Banjo, A. A., Anunobi, C. C., Deji-Agboola, A. M., Rakha, E. A., Nolan, C., Ellis, I. O., and Green, A. R. (2014) **Clinicopathological and molecular significance of Sumoylation marker (ubiquitin conjugating enzyme 9 (UBC9)) expression in breast cancer of black women.** *Pathol Res Pract* **210**, 10-17
 40. Varadaraj, A., Mattoscio, D., and Chiocca, S. (2014) **SUMO Ubc9 enzyme as a viral target.** *IUBMB Life* **66**, 27-33

FIGURAS

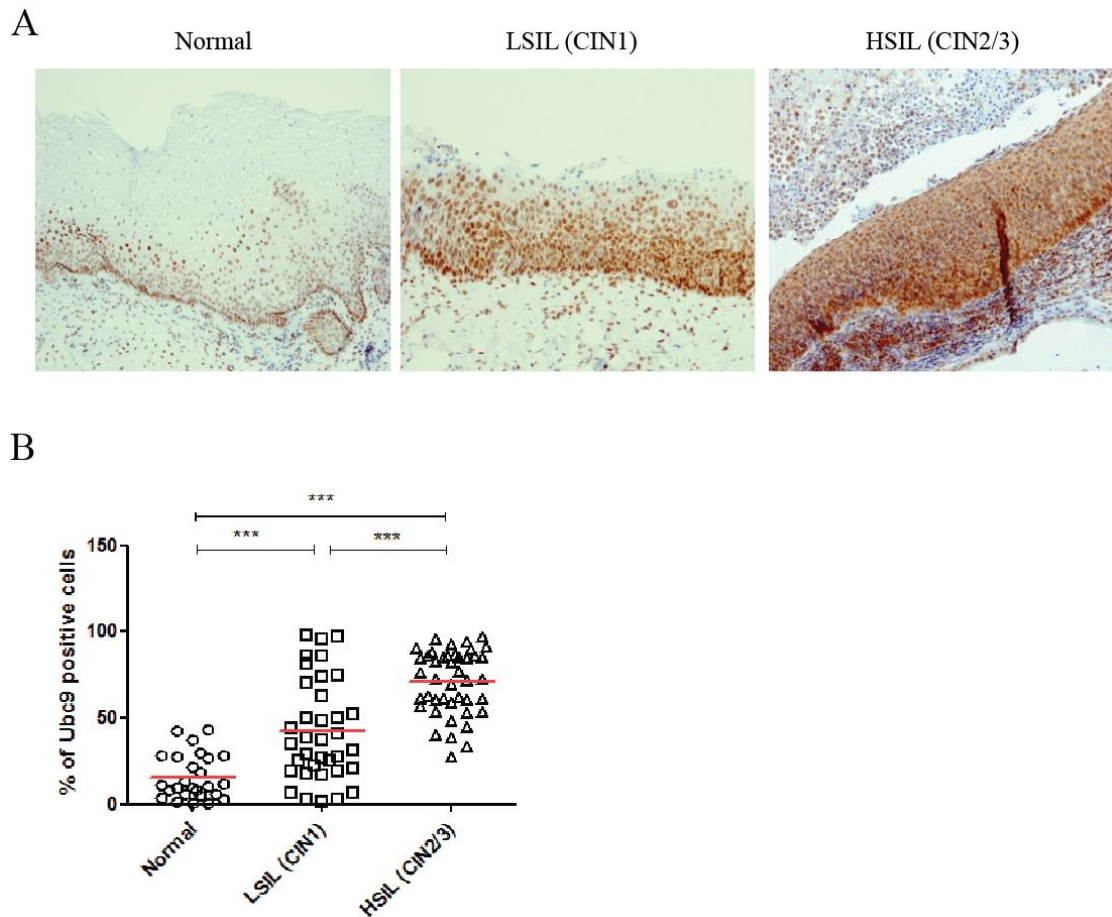


Figura 1. La expresión del Ubc9 aumenta a medida que progresa a lesión cervical. A) Imágenes inmunohistoquímicas (IHQ) representativas de tejidos cervicales humanos fijados en formalina y parafinados (FFPE). Muestras de tejido normal, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL-NIC1) y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL-NIC2/3) se incubaron con anticuerpo anti Ubc9 (Santa Cruz Biotechnology), contrateñidas con hematoxilina y visualizadas bajo microscopio de campo brillante. B) Porcentaje de células Ubc9 positivas en tejidos cervicales humanos. Los tejidos fijados en formalina y parafinados fueron teñidos con Ubc9 y calificados con el programa Aperio Image Scope (Leica Biosystems) mediante el uso de un algoritmo para el conteo de píxeles positivos. Los datos se expresan en porcentaje de células positivas y altamente positivas calculados en varios portaobjetos obtenidos de por lo menos 10 donantes diferentes. Las líneas rojas representan la media para cada grupo. Se calculó la significancia estadística con el programa GraphPad Prims mediante el uso de un ANOVA unidireccional seguido de un test de Bonferroni post-hoc. ***: $P < 0.0001$

Adenocarcinoma

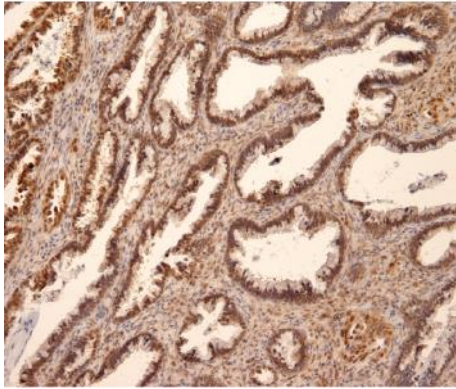


Figura 2. Expresión de la Ubc9 en el adenocarcinoma cervical.

La muestra de adenocarcinoma cervical fijada en formalina y parafinada fue incubada con anticuerpo anti-Ubc9 (Santa Cruz Biotechnology), contrateñida con hematoxilina y visualizada bajo un microscopio de campo brillante.

Características	
Edad de la paciente (en años)	
Media	38
Rango	22-76
Diagnóstico histopatológico (cantidad de muestras)	
Negativo	4
LSIL (NIC1)	54
HSIL (NIC2/3)	78
Metaplasia	3
Adenocarcinoma	3
Carcinoma de células escamosas	4
NE	3

Tabla 1. Muestras de pacientes evaluadas en IHQ para determinar expresión de la Ubc9. NE: no evaluado