

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



**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**La oncoproteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 aumenta la expresión del receptor beta del ácido retinoico *in vitro* y en tejido cervical del ratón K14E7**

**TESIS QUE PRESENTA**

**M en C. Jorge Gutiérrez Cuevas**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN LA  
ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. PATRICIO GARIGLIO VIDAL  
CODIRECTOR DE TESIS: DRA. MARTA ROMANO PARDO**

MÉXICO, D.F.

AGOSTO DEL 2015

**COMITÉ TUTORIAL**

Dr. Patricio Gariglio, Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Ciudad de México.

Dra. Marta Romano Pardo, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Ciudad de México.

Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Ciudad de México.

Dra. Blanca Lilia Barrón, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

Dr. Bulmaro Cisneros Vega, Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Ciudad de México.

Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo, Departamento de Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Ciudad de México.

El trabajo experimental de esta tesis fue realizado en los laboratorios 24 y 25 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Zacatenco, Ciudad de México; bajo la tutoría del Dr. Patricio Gariglio Vidal y de la cotutoría de la Dra. Marta Romano Pardo.

Durante la realización del Doctorado fui apoyado y becado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

**DEDICATORIA**

Con dedicación especial para mis Padres y Familiares, de los cuales me he ausentado y perdido momentos especiales de mi vida. Mi agradecimiento para mis Padres y Hermanos por el conocimiento y aprendizaje que he adquirido de ellos.

## AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al Dr. Patricio Gariglio Vidal por haberse realizado este trabajo de tesis en los laboratorios que tiene a cargo y por su tutoría y asesoría de mi trabajo experimental, por los conocimientos adquiridos durante mi estancia en el Doctorado.

A la Dra. Marta Romano Pardo por haber sido cotutora y por la aportación de sus conocimientos en mi trabajo de tesis.

A mis asesores de tesis, Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, Dra. Blanca Lilia Barrón, Dr. Bulmaro Cisneros Vega y Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo, por el asesoramiento en el desarrollo experimental de la tesis y comentarios del manuscrito final de la tesis.

A mi comité sinodal de mi seminario de graduación, Dr. Patricio Gariglio, Dra. Marta Romano Pardo, Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, Dr. Bulmaro Cisneros Vega, Dr. Luis Marat Álvarez Salas y Dr. José de la Luz Díaz Chávez.

Al Biólogo Enrique García Villa y al Dr. Rodolfo Ocadiz Delgado por haber contribuido en la parte experimental de esta tesis.

A mis compañeros y personal de los laboratorios 24 y 25, así como también a los que contribuyeron en experimentos y formaron parte de la publicación de los resultados obtenidos de esta tesis en la revista: Enrique García Villa, Rodolfo Ocadiz Delgado, Enoc M. Cortés Malagón, Juan Vázquez, Alejandra Román Rosales, Elizabeth Álvarez Ríos, Haydar Celik, Marta C. Romano, Aykut Üren, Paul F. Lambert, Patricio Gariglio.

A Gaby Mora Macías por el esfuerzo y trabajo en la parte secretarial.

A Lauro Macías González por su apoyo técnico en el laboratorio.

**ÍNDICE GENERAL**

<b>ÍNDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS Y TABLAS</b>	I
<b>ABSTRACT</b>	II
<b>RESUMEN</b>	III
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. GENERALIDADES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	3
1.1.1. Clasificación de los Virus del Papiloma Humano	4
1.1.2. Infección e Inicio del Ciclo de Replicación del VPH	5
1.1.2.1. Replicación y Transcripción de Genes de Expresión Temprana del VPH	6
1.1.2.2. Empaquetamiento y Transcripción de Genes de Expresión Tardía del Virus	7
1.2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y CÁNCER CERVICAL	8
1.2.1. Mecanismos Moleculares Causados por los VPHs de Alto Riesgo en la Carcinogénesis	9
1.2.2. La Oncoproteína E7 de los VPHs de Alto Riesgo Modifica la Expresión Transcripcional de la Célula	10
1.3. FACTORES DE RIESGO ADICIONALES A LA INFECCIÓN DEL VPH PARA LA CARCINOGENÉNESIS	12
1.3.1. La Deficiencia Nutricional como Cofactor en la Progresión del Cáncer Cervical	13
1.4. LA VITAMINA A Y SUS DERIVADOS (RETINOIDES)	14
1.4.1. Receptores de Ácido Retinoico (RAR) y Receptores de X Retinoide (RXR)	14
1.4.2. Vitamina A y Cáncer Cervical	16
1.5. ANTECEDENTES	17
1.5.1. El Receptor B del Ácido Retinoico Presenta Modificaciones Epigenéticas en el Cáncer Cervical	18
1.5.2. El Receptor B del Ácido Retinoico es un Supresor de Tumor	18

1.5.3. La Oncoproteína E7 Induce Reprogramación Epigenética en Células Infechadas por el VPH de Alto Riesgo	19
1.6. JUSTIFICACIÓN	21
1.7. OBJETIVOS	22
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	24
2.1. Cultivos Celulares y Tratamientos	24
2.2. Transfecciones Transitorias y Estables	25
2.3. Proliferación Celular (Ensayo de MTT)	26
2.4. RT-PCR de Punto Final y PCR Cuantitativa de la Transcriptasa Reversa (RT-qPCR)	26
2.5. Análisis de las Proteínas por Western Blotting	27
2.6. Mantenimiento de los Ratones	28
2.7. Análisis Estadístico	29
<b>III. RESULTADOS</b>	29
3.1. Líneas celulares derivadas de cáncer cervical VPH positivas no expresan el ARNm del RARB	29
3.2. La oncoproteína E7 del VPH16 incrementa la expresión del ARNm del RARB independientemente de la inhibición de HDACs en la línea celular C33-A y el RA junto con E7 potencian la sobre expresión del RARB sin afectar la proliferación	30
3.3. La mutante (R273C) del gen TP53 participa en el aumento de la expresión del RARB en las líneas celulares cervicales que expresan la oncoproteína E7 del VPH16	34
3.4. La oncoproteína E7 del virus del papiloma humano y la mutante TP53 R273C hacen sinergia en la activación de la expresión del ARNm del RARB	37
3.5. La oncoproteína E7 del VPH16 incrementa la expresión del RARB en el tejido cervical de ratones transgénicos K14E7	39
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	41
<b>V. CONCLUSIONES</b>	48
<b>VI. PERSPECTIVAS</b>	48
<b>VII. REFERENCIAS</b>	53
<b>VIII. ANEXO</b>	72

**ÍNDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS Y TABLAS**

Esquema 1. Representación esquemática del genoma del VPH16.	4
Esquema 2. Regulación transcripcional del promotor del gen RARB.	16
Esquema 3. Representación esquemática de la importancia biológica de la sobreexpresión del supresor de tumores RARB inducido por la oncoproteína E7 del VPH16.	47
Figura 1. La expresión del gen RARB está inhibida en las líneas celulares de cáncer cervical VPH positivas.	30
Figura 2. La oncoproteína E7 del VPH16 incrementa los niveles de expresión del ARNm del RARB en células C33-A y este aumento es sinergizado por RA, mientras que el TSA no lo aumenta.	33
Figura 3. La mutante R273C de TP53 incrementa la expresión del ARNm del RARB en las líneas celulares de cáncer cervical.	36
Figura 4. La oncoproteína E7 del VPH16 y la mutante TP53 R273C hacen sinergia para aumentar la expresión del ARNm del RARB en la línea celular Saos2.	38
Figura 5. La oncoproteína E7 del VPH16 incrementa la expresión del ARNm y de la proteína del RAR-beta en el tejido cervical de ratones transgénicos K14E7 de 1.5 meses de edad.	40
Figura suplementaria 1. Niveles de expresión del gen RARB en HFk primarios y en HFk transformados con E7 del VPH16.	49
Figura suplementaria 2. La proteína RAR-beta está incrementada en el tejido cervical de ratones transgénicos K14E7.	50
Tabla suplementaria 1. Principales factores de riesgo asociados con la infección del VPH de alto riesgo en el desarrollo del Cáncer Cervical.	51
Tabla suplementaria 2. Primers usados en este estudio.	52



**ABSTRACT**

Persistent infection with high-risk human papillomaviruses (HR-HPVs) is the main etiological factor in cervical cancer, which is an important cause of death in women worldwide. The human papillomavirus type 16 (HPV16) E7 oncoprotein alters several signaling molecular pathways in order to avoid cell cycle control and maintain survival of transformed cells as well as deregulating gene expression involved in epigenetic reprogramming, genome stability, metabolism, cell immortalization, among others.

The retinoic acid receptor beta (RARβ) blocks cell growth, inducing differentiation and apoptosis. This tumor suppressor gene is gradually silenced in late passages of foreskin keratinocytes immortalized with HPV16, and in various tumors, including cervical cancer, mainly by epigenetic modifications. We investigated the effect of E7 oncoprotein on RARβ gene expression. We found that HPV16 E7 increases the RARβ mRNA and RARβ protein expression both *in vitro* and in the cervix of young K14E7 transgenic mice. In E7-expressing cells, RARβ overexpression is further increased in the presence of the tumor suppressor p53 (TP53) R273C mutant. This effect does not change when either C33-A or the E7-expressing C33-A cell line is treated with Trichostatin A (TSA), suggesting that E7 enhances the RARβ expression independently of histone deacetylases (HDACs) inhibition. These findings indicate that RARβ overexpression is part of the early molecular events induced by the E7 oncoprotein prior to the development of carcinogenesis.

## RESUMEN

La infección persistente con el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo es el principal factor etiológico para el desarrollo del cáncer cervical, el cual es una importante causa de muertes para las mujeres en el mundo. La expresión de la oncoproteína E7 del VPH de alto riesgo tipo 16 (VPH16) altera diversas vías moleculares de señalización para controlar el ciclo celular y favorecer la supervivencia de la célula transformada, así como también la desregulación de la expresión de genes involucrados en la reprogramación epigenética, inestabilidad genómica, metabolismo, immortalización celular, entre otros.

El receptor beta del ácido retinoico (RARβ, del inglés retinoic acid receptor B) bloquea el crecimiento celular, induciendo diferenciación y apoptosis. Este gen supresor de tumor es silenciado gradualmente en pasajes tardíos de queratinocitos de piel immortalizados con VPH16 y en diferentes tumores incluyendo el cáncer cervical debido a modificaciones epigenéticas. Se investigó el efecto de la oncoproteína E7 sobre la expresión del RARβ. Se encontró que la oncoproteína E7 del VPH16 incrementa la expresión del ARNm y proteína (RAR-β) del gen RARβ tanto *in vitro* como en el cérvix de ratones jóvenes K14E7 transgénicos. En células que expresan E7, RARβ aumentó aun más en presencia de la mutante R273C del gen supresor de tumores TP53 (TP53 R273C). Este incremento no cambia en las células C33-A ni en las células C33-A que expresan a la oncoproteína E7 cuando son tratadas con tricostantina A (TSA), sugiriendo que E7 activa la expresión del RARβ independientemente de la inhibición de HDACs (enzima que remueve acetilos en las histonas). Estos hallazgos indican que la sobreexpresión del RARβ es parte de los eventos moleculares tempranos inducidos por la oncoproteína E7 antes del desarrollo de la carcinogénesis.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad gradual y multifactorial que se caracteriza por la acumulación de diversos eventos de daño celular, tales como la inestabilidad cromosómica, inactivación de proteínas reguladoras del ciclo celular, inhibición de apoptosis y modificaciones epigenéticas, entre otros (Hanahan & Weinberg, 2011; Mesri et al, 2014). El cáncer cervical, debido a su naturaleza viral, es un paradigma para entender el desarrollo de otros tipos de cáncer epitelial. Los tipos del virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo son los principales agentes etiológicos del cáncer cervical, debido a que están presentes en más del 95% de los tumores, siendo el VPH16 el genotipo de mayor prevalencia (Li et al, 2011). Sin embargo, solo un pequeño porcentaje de mujeres infectadas con el VPH de alto riesgo desarrollan cáncer cervical, lo cual indica que son necesarios otros factores junto con los VPHs de alto riesgo para inducir la carcinogénesis cervical (Gariglio et al, 2009). Estos virus ejercen su potencial oncogénico principalmente a través de la expresión de sus oncoproteínas E6 y E7 (Munger et al, 2004). La expresión permanente de estas oncoproteínas extiende la expectativa de vida de las células primarias humanas y facilita su inmortalización (Halbert et al, 1992). A pesar que las oncoproteínas E6 y E7 carecen de actividades de unión específicas al ADN, pueden asociarse con otras proteínas celulares para inducir alteraciones epigenéticas, inestabilidad genómica, transformación celular y progresión tumoral (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b). Por ejemplo, la oncoproteína E6 del VPH16 interactúa con el supresor de tumor TP53 (Werness et al, 1990) e induce su degradación (Scheffner et al, 1990) y consecuentemente inhibe la apoptosis celular (Lagunas-Martinez et al, 2010). Por otra parte, el principal blanco de la oncoproteína E7 es la familia de proteínas retinoblastoma (pRb, p107 y p130); la inactivación de estas proteínas provoca la desregulación del ciclo celular (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009a). Además, se ha demostrado que la expresión de E7 del VPH16 causa una reprogramación epigenética celular tanto a nivel de metilación del ADN como a nivel de modificación de histonas (Brehm et al, 1999; Burgers et al, 2007; McLaughlin-Drubin et al, 2011; Zhang et al, 2004). Por ejemplo, E7 reduce la marca global de la trimetilación de la

lisina 27 en la histona 3 (H3K27me3) lo cual libera la represión transcripcional mediada por el complejo policomb (PRC) (la mayoría de las nomenclaturas usadas son indicadas en su término original en inglés) (McLaughlin-Drubin et al, 2011). La oncoproteína E7 puede también potenciar la transcripción de varios genes a través de la activación de enzimas transferasas de acetilos en histonas (HATs), inhibiendo las deacetilasas de histonas (HDACs, enzima que remueve acetilos en las histonas) e incrementando la acetilación global de la H3 (Bodily et al, 2011; Brehm et al, 1999; McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b; Zhang et al, 2004). Todos los mecanismos mencionados anteriormente están involucrados en la reprogramación de las células epiteliales infectadas por el virus para favorecer la supervivencia de la célula y evitar el control del ciclo celular.

El gen que codifica para el receptor beta del ácido retinoico (RARB) es expresado en tejido epitelial y activado por el tratamiento con ácido retinoico de forma trans (ATRA o RA: metabolito de la vitamina A), y provoca la inhibición del crecimiento de las células de cáncer oral y cáncer cervical (Geisen et al, 2000; Hayashi et al, 2001; Si et al, 1996). En células epiteliales normales del cérvix, el gen RARB está expresado (Geisen et al, 1997); sin embargo, la pérdida de expresión del gen RARB es dependiente de la etapa del cáncer y ha sido encontrada con una frecuencia variada y correlacionada con la represión transcripcional de su promotor en diferentes tipos de tumores, incluyendo el cáncer cervical y carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCCs) (Choi et al, 2007; Ivanova et al, 2002; Narayan et al, 2003; Xu et al, 1999b; Youssef et al, 2004; Zhang et al, 2007). Interesantemente, en las líneas celulares derivadas de cáncer cervical positivas al VPH que expresan al supresor tumoral TP53 silvestre, el gen RARB no está expresado (Narayan et al, 2003; Youssef et al, 2004; Zhang et al, 2007); mientras que las líneas celulares negativas al VPH con TP53 mutado expresan RARB (Narayan et al, 2003; Youssef et al, 2004; Zhang et al, 2007). De acuerdo a lo anterior, la metilación del promotor del RARB en líneas celulares derivadas de HNSCCs se correlaciona con la pérdida de expresión del RARB y está inversamente relacionado a la presencia de TP53 mutado (Youssef et al, 2004), lo cual sugiere que el estado de TP53 junto con el VPH pueden ser factores importantes en la regulación

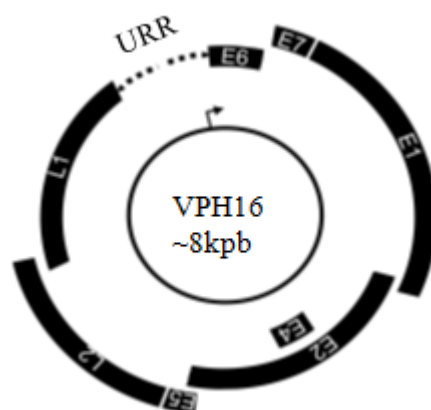
transcripcional del RARB durante la infección por el VPH y en la carcinogénesis. Se ha reportado que algunas mutaciones de TP53 adquieren nuevas actividades oncogénicas para transactivar genes que promuevan la proliferación de células cancerosas (Freed-Pastor & Prives, 2012). En apoyo a esta observación, fue reportado que los carcinomas del cérvix tienen a TP53 mutado con frecuencias del 9% al 16% (Ojesina et al, 2014; Tornesello et al, 2014) y que estas mutaciones somáticas están implicadas en la patogénesis del carcinoma cervical (Ojesina et al, 2014).

En este trabajo, describimos por primera vez que la oncoproteína E7 del VPH16 induce la sobreexpresión del gen supresor tumoral RARB tanto en líneas celulares como en el cérvix de ratones jóvenes transgénicos K14E7 sin neoplasia cervical. La activación del RARB es más elevada *in vitro* debido a la acción sinérgica de E7 del VPH16 con la mutante TP53 R273C; este efecto no es dependiente de la inhibición de las HDACs en la línea celular C33-A.

## **1.1. GENERALIDADES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**

Los virus del papiloma humano son miembros de la familia *Papillomaviridae*, muestran un tropismo en la infección de células del epitelio escamoso; su genoma es de doble cadena de ADN de aproximadamente 8 kpb empacado dentro de una cápside icosaédrica de 55 nm. Solo una de sus dos cadenas se transcribe para codificar ocho proteínas, además tiene una región regulatoria corriente arriba (URR), también conocida como región no codificante (Van Doorslaer & Burk, 2010). El ADN viral tiene marcos de lectura abierta (ORFs) de expresión temprana (E; del inglés early), éstos codifican para proteínas regulatorias no estructurales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), las cuales tienen diferentes funciones en el citoplasma y núcleo de la célula huésped; por ejemplo en la replicación viral (E1 y E2), transcripción del ADN del virus (E2), maduración y liberación de las partículas virales (E4), transformación (E5, E6 y E7) e inmortalización celular (E6 y E7). Además, el VPH posee dos ORFs de expresión tardía (L; del inglés late) que codifican a las proteínas de la cápside mayor y menor del virus (L1 y L2), respectivamente; ambas proteínas participan en el

empaquetamiento del virus para formar la cápside viral. A todos estos genes se les asignó su nombre de acuerdo a su expresión durante la diferenciación epitelial, (Esquema 1) (McLaughlin-Drubin & Munger, 2013; Van Doorslaer & Burk, 2010).



**Esquema 1. Representación esquemática del genoma del VPH16.** El círculo central representa el genoma de ADN de doble cadena. Los genes E y L son codificados a partir de tres posibles ORFs como es indicado y son transcritos unidireccionalmente. La URR es indicada en líneas discontinuas (ver texto).

### **1.1.1. Clasificación de los Virus del Papiloma Humano**

Se han identificado cerca de 200 genotipos del VPH y categorizado en géneros específicos de acuerdo a la similitud de sus secuencias de ADN. El grupo de Villiers propone la clasificación de los VPHs basándose sobre la identidad de su secuencia, topología de árboles filogenéticos y características biológicas (de Villiers et al, 2004). Los VPHs que comparten más del 60% de su identidad de secuencia de nucleótidos sobre el gen principal y estructural L1, fueron clasificados en el mismo género. El género fue llamado de acuerdo al alfabeto griego, por ejemplo alfa-, beta-, gamma-papilomavirus, respectivamente. Este es el primer sistema de clasificación viral basado en la similitud de secuencias reconocido por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (Van Doorslaer & Burk, 2010). Las distintas cepas de un género específico son comúnmente llamados “tipos”, y fueron descritos como

aquellos virus que comparten menos del 90% de similitud de su secuencia en el ORF de L1 con cualquier otro tipo previamente definido (Van Doorslaer & Burk, 2010). Las variantes de los VPHs difieren generalmente en menos del 3% en sus secuencias en el gen L1, y regularmente exhiben variación de un solo nucleótido (de Villiers et al, 2004). Además una publicación actualizó la nomenclatura asignada para los 189 papilomavirus conocidos en 29 géneros (Bernard et al, 2010).

Los VPHs también se clasifican de acuerdo al tipo de epitelio que infectan, ya sea como cutáneos o de la mucosa. Los VPHs cutáneos como los tipos VPH1 y VPH2, generalmente causan enfermedades benignas de la piel o verrugas del pie (Korzeniewski et al, 2011). Los VPHs de la mucosa son divididos en VPHs de bajo riesgo y de alto riesgo. Los tipos de bajo riesgo como VPH6 y 11 se asocian a lesiones benignas incluyendo papilomas o condiloma acuminado y de laríngea. En cuanto a los tipos del VPH de alto riesgo como el VPH16, 18, 31, 33 o 45, entre otros, son asociados principalmente a todas las lesiones con carcinomas del cérvix (Korzeniewski et al, 2011).

### **1.1.2. Infección e Inicio del Ciclo de Replicación del VPH**

El ciclo de replicación del VPH ha sido muy bien estudiado en el epitelio del cérvix y se ha encontrado que está totalmente relacionado a la diferenciación del epitelio que infecta. El VPH es transmitido sexualmente y la infección es adquirida cuando está descubierta la capa basal del epitelio escamoso estratificado debido a microlesiones de la mucosa que lo recubre; posteriormente, el virus se une principalmente a los receptores proteoglicanos de heparan sulfato (Giroglou et al, 2001) y a la integrina alfa 6 para internalizarse en las células epiteliales (Evander et al, 1997).

Como todos los virus, los VPHs son microorganismos intracelulares obligatorios que necesitan reprogramar a la célula huésped que infectan para establecer la infección y completar el ciclo viral para producir nueva progenie viral (Best et al, 2012; McLaughlin-Drubin & Munger, 2013).

### **1.1.2.1. Replicación y Transcripción de Genes de Expresión Temprana del VPH**

Después de la infección en las células epiteliales no diferenciadas de la capa celular basal, el genoma viral es mantenido en aproximadamente 100 copias por célula y las proteínas E1 y E2 se expresan para regular la replicación viral y expresión de otros genes de expresión temprana del virus (Best et al, 2012; Van Doorslaer & Burk, 2010). La proteína E1 tiene actividad de ATPasa y de ADN helicasa, la cual se une a la región palindrómica [AACCg(N4)cGGTT] en la URR (Blakaj et al, 2009), y forma un complejo con E2 para unirse al sitio de origen de la replicación viral, donde se ensambla formando un complejo hexamérico y funcionan como un andamiaje para que se unan las proteínas de la replicación celular (por ejemplo, la ADN polimerasa/primasa y la proteína RPA) (Van Doorslaer & Burk, 2010). El gen E5 es también parte del proceso de replicación temprana y forma un complejo con el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas para estimular el crecimiento celular; también inhibe la apoptosis y mantiene a las células epiteliales en continua replicación (Ibeanu, 2011).

Los VPHs no codifican para ninguna proteína que limite el porcentaje de su replicación tales como enzimas para la biosíntesis de nucleótidos o una polimerasa de ADN; por lo tanto, estos virus son muy dependientes de la disponibilidad de la maquinaria de síntesis del ADN celular para replicar su genoma (McLaughlin-Drubin & Munger, 2013).

El ADN del VPH generalmente se encuentra en la forma extracromosomal o episomal al inicio de las lesiones precursoras del cáncer. La integración del ADN viral hacia el ADN del huésped frecuentemente ocurre en lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL) y en cáncer cervical; por consiguiente, es muy común que éstas lesiones contengan el ADN viral tanto en la forma episomal como la integrada (Abreu et al, 2012). Durante la integración del ADN viral en el de la célula huésped, el genoma del virus se rompe afectando los ORFs de E1 y E2, mientras que los ORFs de E6 y E7 junto con la región no codificante permanecen intactas. La pérdida de función del gen E2 resulta en la expresión incrementada y descontrolada



de las oncoproteínas E6 y E7, las cuales modifican el ciclo celular y retienen la diferenciación de los queratinocitos del huésped en un estado favorable para la amplificación del genoma viral; además estas oncoproteínas han sido relacionadas a la persistencia de la infección por el VPH (Abreu et al, 2012; Best et al, 2012).

La célula basal infectada con el VPH se divide y forma dos células hijas con el material genético del virus; una de ellas permanece en la capa basal y retiene su capacidad de división; por lo tanto, requiere la división celular del huésped para continuar con el ciclo viral. La otra célula hija continúa hacia la capa suprabasal, donde se diferencia y eventualmente es liberada de la superficie epitelial (Ibeanu, 2011).

#### **1.1.2.2. Empaquetamiento y Transcripción de Genes de Expresión Tardía del Virus**

Después de la diferenciación celular en la capa epitelial granular; las proteínas L1 y L2 se expresan y empaquetan el nuevo genoma viral recientemente sintetizado. La proteína L1 espontáneamente forma pentámeros los cuales se ensamblan con la proteína L2 para formar la cápside viral (Buck et al, 2008). Posteriormente, el gen E4 es expresado solamente en la etapa tardía del ciclo de vida viral cuando las partículas del virus comienzan a ensamblarse; en esta etapa la proteína E4 rompe la integridad de la capa celular cornificada para asistir eficientemente el escape del virus desde el epitelio superficial (Doorbar et al, 1991). Por otro lado, el gen E5 es frecuentemente eliminado en las células del carcinoma cervical, lo cual sugiere que puede no ser importante para el mantenimiento del estado transformado.

Las proteínas de la cápside están unidas por enlaces disulfuro y proporcionan estabilidad estructural y protección contra un ambiente hostil cuando el virus es liberado desde el epitelio superficial (Buck et al, 2005). La proteína L2 está altamente conservada entre los tipos del VPH y es expuesta durante la unión al receptor celular durante la infección inicial, lo cual completa el ciclo de vida del virus (Kines et al, 2009).

## **1.2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y CÁNCER CERVICAL**

A pesar de la disponibilidad de vacunas contra el VPH (los resultados de prevención se verán en unos años más, debido a la reciente aplicación de la vacuna), la incidencia y mortalidad de cáncer cervical sigue siendo alta a nivel mundial y actualmente ocupa el cuarto lugar de los tipos de cáncer de la mujer de acuerdo a la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC). El 86% de las muertes causadas por el cáncer cervical ocurre en países en vías de desarrollo (Arbyn et al, 2011).

El grupo de Harald zur Hausen descubrió que algunos miembros del grupo mucosatópicos alfa-papilomavirus en particular los tipos de de alto riesgo oncogénico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y otros; aproximadamente 20 tipos) son los principales agentes etiológicos para el desarrollo del cáncer cervical (McLaughlin-Drubin et al, 2012), y se encuentran en más del 95% en los tumores del cérvix (Bouvard et al, 2009). Estos VPHs de alto riesgo también causan otros carcinomas del tracto anogenital incluyendo el anal, vulvar, vaginal y cánceres en el pene, y más recientemente han sido relacionados al cáncer oral, particularmente con los carcinomas orofaríngeos (McLaughlin-Drubin et al, 2012).

Los VPH16 y 18 de alto riesgo han sido encontrados aproximadamente en un 70% de todos los casos de cáncer cervical a nivel mundial y el VPH16 es el de mayor prevalencia (Li et al, 2011). Sin embargo, la persistencia de la infección con el VPH de alto riesgo es necesaria pero no suficiente causa para este cáncer, el cual se desarrolla en años o incluso en décadas a partir de lesiones precursoras; además, solamente un pequeño porcentaje de mujeres desarrollan la enfermedad, lo que indica que son necesarios otros factores adicionales al virus para la inducción y desarrollo de la carcinogénesis cervical.

### **1.2.1. Mecanismos Moleculares Causados por los VPHs de Alto Riesgo en la Carcinogénesis**

Los VPHs de alto riesgo codifican tres proteínas con actividad de transformación, E5, E6 y E7. La proteína E5 puede contribuir en las etapas iniciales del cáncer (Talbert-Slagle & DiMaio, 2009) y en la formación del cáncer en un modelo de ratón transgénico (Maufort et al, 2007). Sin embargo, esta proteína no es necesaria para el mantenimiento del fenotipo transformado, debido a que su expresión se pierde durante la progresión maligna cuando el genoma del virus se integra al de la célula huésped. Por otro lado, los principales marcadores de tumores sólidos en el humano de acuerdo a como los catalogaron Hanahan y Weinberg, incluyen a la proliferación celular ilimitada, independencia del factor de crecimiento, evasión de la apoptosis, insensibilidad a señales citostáticas, inducción de invasividad, propiedades metastásicas y angiogénesis prolongada (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b). Los VPHs de alto riesgo asociados a cánceres expresan los oncogenes E6 y E7, los cuales son reguladores críticos en cada uno de los procesos mencionados. A continuación se describe a los marcadores de tumor originados por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH de alto riesgo; de acuerdo a recientes revisiones relacionadas con el tema, la oncoproteína E6 desestabiliza los puntos de control del ciclo celular, inhibe la apoptosis, altera la polaridad y el citoesqueleto de la célula, provoca inestabilidad genómica, participa en la transición epitelial a mesenquimal, causa reprogramación epigenética e inmortalización celular. La oncoproteína E7 induce síntesis del ADN, modula la muerte celular, altera el metabolismo, causa inestabilidad genómica, promueve reprogramación epigenética, participa en la transición epitelial a mesenquimal y en la inmortalización celular (Korzeniewski et al, 2011; McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b; McLaughlin-Drubin & Munger, 2013).

### **1.2.2. La Oncoproteína E7 de los VPHs de Alto Riesgo Modifica la Expresión Transcripcional de la Célula**

La oncoproteína E7 del VPH es de bajo peso molecular (98 aminoácidos) y puede formar dímeros (McLaughlin-Drubin et al, 2012). La oncoproteína E7 del VPH de alto riesgo se asocia con otras proteínas y reprograma vías de señalización en la célula huésped para favorecer la supervivencia y proliferación de la célula transformada. El principal y mejor blanco estudiado de E7 es el supresor de tumores de la familia de proteínas retinoblastoma (pRb, p107 y p130), siendo pRb la que controla el inicio de la fase S del ciclo celular a través de su asociación con miembros de la familia de factores de transcripción E2F. Cuando pRb es fosforilada por los complejos cinasas dependientes de ciclina (cdk; del inglés cyclin-dependent kinase) 4 y/o cdk6/ciclina D en la fase G1 se interrumpen e inactivan los complejos represores transcripcionales pRb/E2F, y al disociarse los E2Fs actúan como activadores transcripcionales de los genes que participan en la entrada y progresión de la fase S (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b). La oncoproteína E7 se asocia con pRb preferencialmente en su forma hipofosforilada y dirige a esta proteína a su degradación en el proteosoma a través de la asociación con ZER1 el cual contiene un complejo culina 2 (CUL2), ligasa y ubiquitina (White et al, 2012). Se ha encontrado que muchas oncoproteínas E7 se asocian con la ligasa y ubiquitina UBR4, una proteína de 600 kDa que puede regular la anoikis (anoikis, término del inglés que refiere a muerte celular programada inducida por el desprendimiento de células de la matriz extracelular) (Moody & Laimins, 2010). Por lo tanto la degradación de pRb, altera diferentes procesos celulares como la muerte celular, los puntos de control mitótico y la diferenciación celular (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b).

Los heterodímeros E2F6/DP1 o DP2 funcionan como represores transcripcionales probablemente para disminuir y regular la transcripción de genes blanco de E2F y para inducir la salida de fase S. La oncoproteína E7 se asocia con el dominio represor carboxilo terminal de E2F6 y evita la actividad represiva de esta proteína que también es un componente de los complejos represivos polycomb (McLaughlin-Drubin & Munger, 2013).

La oncoproteína E7 del VPH16 también inhibe las actividades transcripcionales de TP53 e inactiva a p21 y p27Kip1; p21 es un inhibidor del ciclo celular dependiente de TP53 en la fase G1 (Klingelutz & Roman, 2012). Por lo tanto, la inhibición de p21 y p27Kip1 permite que E7 juegue un papel importante en el desacoplamiento de la diferenciación y proliferación celular, lo cual es necesario para la replicación viral.

Por otro lado, E7 incrementa la expresión del oncogén cdc25, una fosfatasa que remueve una fosforilación inhibitoria de la función de cdk2 y 4. Además, E7 se asocia directamente con cdk2 e incrementa su actividad enzimática independiente de pRb, p107 y p130 (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b).

Otro de los efectos de E7 es evitar la inhibición del crecimiento celular mediado por TGF-β (Diaz-Chavez et al, 2008) y la adquisición de la resistencia de TGF-β es un proceso autoregulatorio debido a que TGF-β puede reprimir la expresión de E6/E7 del VPH16 (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b).

Una característica importante de las células tumorales en humano es el cambio metabólico de la respiración mitocondrial a la glicólisis aeróbica, conocido como efecto “Warburg”. Un efecto similar del cambio metabólico ocurre en las células transformadas con el VPH, el cual es debido a que la oncoproteína E7 puede asociarse y alterar la actividad de la variante M2 embrionaria de la enzima cinasa de piruvato (M2-PK) (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b). Por otro lado, la oncoproteína E7 del VPH16 se asocia y activa a la α-glucosidasa (Zwerschke et al, 1999), una enzima que cataboliza el glucógeno. Al igual que muchos tumores, los cánceres del cérvix asociados al VPH contienen bajos niveles de glucógeno (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b).

Las células transformadas frecuentemente tienen un pH intracelular alto; la oncoproteína E7 causa una alcalinización citoplasmática debido a que incrementa la actividad de la proteína que intercambia el Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>; la inhibición de este intercambio disminuye la proliferación celular e inhibe el crecimiento independiente de anclaje de las células NIH3T3 transformadas con E7 del VPH16 (Reshkin et al, 2000).

La inestabilidad genómica es comúnmente encontrada en células que expresan las oncoproteínas del VPH; la aneuploidía y la ganancia o pérdida de cromosomas

completos en estas células aumenta como consecuencia de una variedad de anomalías en la mitosis, incluyendo la mitosis multipolar, puentes en la anafase y una mitosis desorganizada con material cromosómico retrasado (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b). Por otro lado, la presencia de E7 del VPH16 desacopla la síntesis del centriolo de la división del ciclo celular e induce muchos centrosomas (del inglés; supernumerary centrosomes) a través del centrosoma primario y de los errores de duplicación del centriolo en células normales diploides (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b). Un posible mecanismo que explicaría la inducción de muchos centrosomas en células que expresan E7 del VPH16, es la asociación de E7 con  $\gamma$ -tubulina (un regulador del centrosoma) de manera independiente a pRb, p107 y p130; no obstante, la presencia de la oncoproteína E7 inhibe el reclutamiento de la  $\gamma$ -tubulina en el centrosoma (Nguyen et al, 2007).

Como fue anteriormente mencionado, los puentes que se forman en la anafase de las células que expresan las oncoproteínas, probablemente representan las fusiones de los cromosomas debido al rompimiento del ADN de doble cadena. La presencia de sitios de reparación del ADN en las células que expresan E7, indica que la oncoproteína E7 puede inducir el rompimiento del ADN de doble cadena o interferir en la reparación de las cadenas de ADN rotas, facilitando la integración del genoma viral en el de la célula huésped (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b).

Otra de las consecuencias de la presencia de E7 del VPH de alto riesgo es la transición del tejido epitelial a mesenquimal, debido a la desregulación transcripcional de proteínas involucradas en vías que favorecen la progresión maligna y la angiogénesis (Hellner et al, 2009).

### **1.3. FACTORES DE RIESGO ADICIONALES A LA INFECCIÓN DEL VPH PARA LA CARCINOGENÉISIS**

Es importante la infección del VPH de alto riesgo y la continua expresión de sus oncogenes para que las células epiteliales adquieran un fenotipo transformado y junto con factores de riesgo adicionales la aparición de la carcinogénesis. De acuerdo

a lo anteriormente mencionado, una infección con el tipo de VPH de alto riesgo tiene un factor de riesgo relativo (RR) elevado y significativo para el desarrollo del cáncer cervical (RR = 50-100), y es mayor comparado con el fumar tabaco para el desarrollo de cáncer de pulmón (RR = 10) (Franco & Harper, 2005). Sin embargo, el fumar tabaco solamente es un factor mínimo en el desarrollo del cáncer cervical (RR = 1.6) (Appleby et al, 2006). Además del virus como el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cervical, se han asociado otros factores de riesgo adicionales para el desarrollo de la enfermedad, los cuales incluyen la actividad sexual, multiparidad y anticonceptivos orales (Tabla suplementaria 1) y otros que se describen a continuación.

### **1.3.1. La Deficiencia Nutricional como Cofactor en la Progresión del Cáncer Cervical**

El estado nutricional es un importante cofactor que afecta la persistencia y progresión de las infecciones de los VPHs de alto riesgo hacia la neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Los estudios indican que bajos niveles de folato y una deficiencia en el consumo de tiamina, riboflavina y vitamina B12 se asocian a la displasia cervical; sin embargo, hay un estudio que indica no haber encontrado asociación del folato, vitamina B12 y la homocisteína con la displasia cervical (Gariglio et al, 2009). Por otra parte, se sugiere que los nutrientes con efectos antioxidantes como el retinol, los carotenoides, el cis-licopeno y los tocoferoles protegen contra la persistencia del VPH y de la carcinogénesis (García-Closas et al, 2005; Giuliano et al, 1997; Palan et al, 1998; Sedjo et al, 2002). Sin embargo, otro estudio no encontró efecto protector en contra de la persistencia del VPH de alto riesgo con los antioxidantes luteína, zeaxantina y b-criptoxantina (Giuliano et al, 2003; Goodman et al, 2007; Sedjo et al, 2002). Pero se encontró una reducción del riesgo de cáncer cervical en la mujeres con alto consumo de vitamina C, vitamina E, Vitamina A,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, luteína, folato, frutas y vegetales (Ghosh et al, 2008). Los vegetales crucíferos son una fuente rica en isotiocianatos e indoles derivados de la hidrólisis de los glucosinolatos, sulforafano e indol-3-carbinol los

cuales han sido implicados en una variedad de mecanismos anticancerígenos (Higdon et al, 2007).

#### **1.4. LA VITAMINA A Y SUS DERIVADOS (RETINOIDES)**

Actualmente se conocen más de 4,000 moléculas naturales o sintéticas, estructuralmente y funcionalmente relacionadas con la vitamina A. Esta vitamina se obtiene exclusivamente a través de la dieta en la forma de retinol, éster retinil o  $\beta$ -caroteno. La vitamina A se almacena como éster retinil en las células hepáticas. El retinol es reversiblemente oxidado por la deshidrogenasa de retinol para generar retinal. Posteriormente, el retinal puede ser irreversiblemente oxidado a ácido retinoico (RA) en su forma trans (ATRA) por la deshidrogenasa de retinal y aún más oxidado por las enzimas citocromo P450 (principalmente CYP26) en el tejido hepático. Los retinoides con actividad biológica son el ATRA o comúnmente llamado RA, 9-cis RA, 11-cis retinaldehído, 3,4-didehído RA y quizás el 14-hidroxi-4, 14-retro retinol, 4-oxo RA y 4-oxo retinol (Bushue & Wan, 2010).

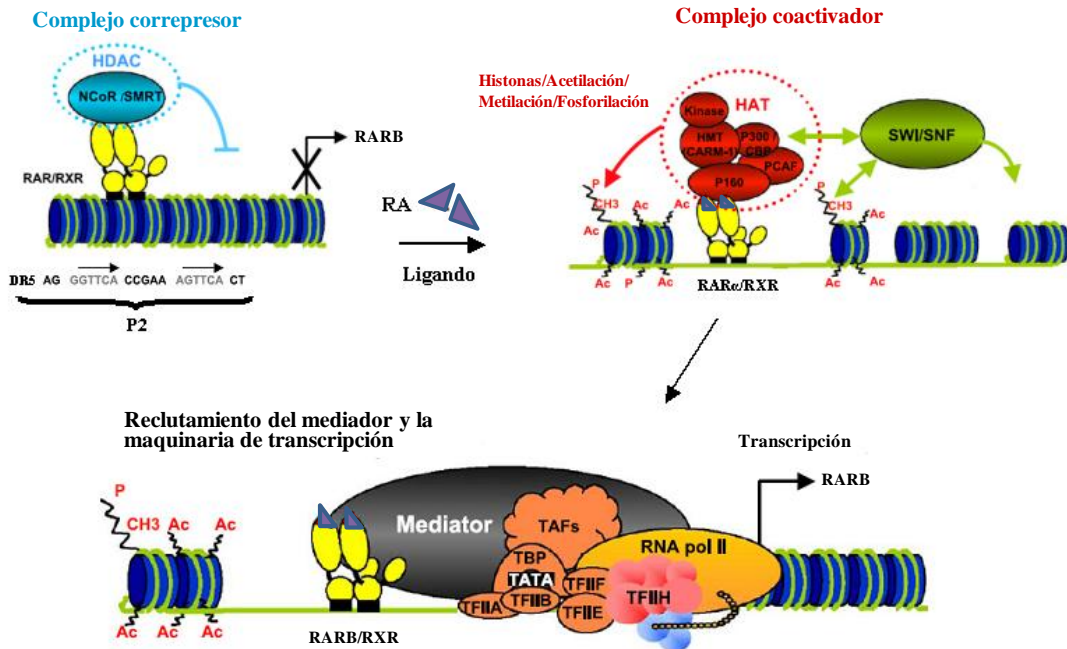
##### **1.4.1. Receptores de Ácido Retinoico (RAR) y Receptores de X Retinoide (RXR)**

Las acciones fisiológicas de los retinoides son mediadas por dos clases de receptores, receptores del ácido retinoico (RAR) y receptores de X retinoide (RXR). Ambos receptores son miembros de la superfamilia de factores de transcripción dependientes de ligando de receptores nucleares. Cada clase de receptor contiene tres subtipos ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). Los RARs son activados por ATRA y 9-cis RA; mientras que los RXRs son exclusivamente activados por 9-cis RA (Bushue & Wan, 2010). Sin embargo, debido a la conversión del ATRA a 9-cis RA, elevadas concentraciones ( $10^{-5}$  M) de ATRA también pueden activar la transcripción de genes en células transfectadas con los RXRs (Heyman et al, 1992).



En presencia del ligando, los RARs funcionan como homo o heterodímeros e interactúan con elementos de respuesta al RA (RAREs) o elementos de respuesta a X retinoides (RXREs) situados en la secuencia de ADN de genes que se activan por el RA o 9-cis RA. Los RAREs corresponden a repetidos de rearrreglos polimórficos del siguiente motivo 5'-PuG(G/T)TCA (Gariglio et al, 2009). Por ejemplo, en ausencia del RA, los heterodímeros RAR/RXRs se unen al promotor del gen RARB interactuando con correpresores como NCoR (del inglés, nuclear receptor corepressor) y SMRT (del inglés, silencing mediator of RAR and thyroid hormone receptor); los NCoRs reclutan a mSin3A y a HDACs, lo cual genera el silenciamiento de la transcripción del gen RARB a través de la condensación de la cromatina (Weston et al, 2003). Mientras que para la activación del promotor del RARB se necesita la presencia de RA y los heterodímeros RARA/RXR, incluyendo otros cofactores (Kruyt et al, 1991; Zhang et al, 1992) vía interacción con proteínas adaptadoras con actividad de transferasas de acetilos en las histonas (p300 and CBP: CREB-binding protein) (Esquema 2) (Bastien & Rochette-Egly, 2004; Gillespie & Gudas, 2007; Xu et al, 1999a).

Los RXRs son receptores promiscuos porque forman heterodímeros con otra clase de receptores, entre los cuales se incluye a los receptores para ácidos grasos (PPAR), ácidos biliares (FXR), vitamina D (VDR) y otros receptores (Bushue & Wan, 2010).



**Esquema 2. Regulación transcripcional del promotor del gen RARB.** En ausencia de ligando (RA), los heterodímeros RAR/RXR están asociados con un complejo correpresor en el promotor del RARB; mientras que en presencia de RA los heterodímeros RAR/RXR forman un complejo con proteínas coactivadoras para remodelar la cromatina y originar una cromatina relajada y permitir el reclutamiento de la maquinaria de transcripción para la iniciación de la expresión del gen RARB (Esquema modificado de Bastien & Rochette-Egly, 2004).

### 1.4.2. Vitamina A y Cáncer Cervical

La vitamina A y sus derivados (retinoides) participan en un amplio rango de efectos sobre el desarrollo embrionario, crecimiento celular, diferenciación y apoptosis. La vitamina A ha sido usada como tratamiento para la ceguera desde hace muchos años (Bushue & Wan, 2010).

De acuerdo a un estudio el cual analizó la asociación de la vitamina A con el riesgo de cáncer cervical a través de un meta-análisis considerando 15 artículos, 11 evaluaron el consumo de la vitamina A (retinol, caroteno y otros carotinoides) y 4 midieron los niveles de esta vitamina en plasma (retinol y caroteno). Los resultados

indicaron que la ingesta de vitamina A y sus niveles en plasma están inversamente asociados con el riesgo de cáncer cervical (Zhang et al, 2012). Además, desde hace varios años se había observado que los niveles bajos de la vitamina A en suero y la correlación de las concentraciones de  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno en plasma están asociados con el desarrollo de NIC (Bernstein & Harris, 1984; Gamboa-Pinto et al, 1998). Por otro lado, la carcinogénesis cervical inducida por el VPH está asociada con los niveles bajos del ATRA en suero (Berlin Grace et al, 2006).

## **1.5. ANTECEDENTES**

El RA es un importante regulador de la proliferación y diferenciación celular, y tiene un efecto en la inhibición de la proliferación de células cancerosas derivadas del cérvix (Behbakht et al, 1996); por lo tanto, el RA tanto en su forma natural como la sintética ha sido usado como agente quimioterapéutico para el tratamiento de lesiones precancerosas y cancerosas del tejido cervical (Benbrook et al, 1997; Ruffin et al, 2004; Surwit et al, 1982; Wilailak et al, 2003). Sin embargo, recientemente un estudio indica que los retinoides no son efectivos en la regresión de NIC 3 pero si pueden tener un efecto regresivo sobre NIC 2 (Helm et al, 2013).

La inhibición de la proliferación de las células cancerosas por los retinoides es debida a diferentes efectos que causan a nivel intracelular, como son la supresión de la actividad de la telomerasa y un arresto del ciclo celular en la fase G1 en las células HeLa (Guo et al, 2006); además, un aumento en la transcripción de p21 (Arany et al, 2003), activación de la caspasa 1 e inducción de la apoptosis con inhibición de la angiogénesis (Liaudet-Coopman et al, 1997; Oridate et al, 1995) entre otros efectos.

### **1.5.1. El Receptor B del Ácido Retinoico Presenta Modificaciones Epigenéticas en Cáncer Cervical**

Existen dos tipos de epitelio morfológicamente distintos en el cérvix uterino, un epitelio estratificado escamoso no queratinizado el cual cubre al ectocérvix y un epitelio simple columnar que reviste el canal cervical. Se ha reportado que el gen RARB se expresa de manera normal en ambos queratinocitos extraídos de la parte ectocervical y endocervical del tejido cervical normal; además, la expresión del ARNm del RARB se incrementa cuando estos queratinocitos son tratados con RA (Geisen et al, 1997). Sin embargo, en muchos tipos de cánceres incluyendo el cáncer cervical la expresión del RARB está disminuida o totalmente ausente debido a la pérdida de heterocigosidad (Choi et al, 2007) o por las modificaciones epigenéticas, como lo es la metilación de las islas CpG en la región promotora del gen, el cual presenta una metilación dependiente del grado de neoplasia del cérvix; por ejemplo, en cánceres invasivos se reporta una metilación del promotor RARB desde un 33% hasta un 63% (Ivanova et al, 2002; Narayan et al, 2003; Xu et al, 1999b). Otra modificación epigenética del RARB encontrada en líneas celulares derivadas de cáncer cervical incluye la modificación de histonas con marcas represivas en su promotor, el cual es reactivado por un inhibidor de desacetilasas de histonas (TSA) (Zhang et al, 2007).

### **1.5.2. El Receptor B del Ácido Retinoico es un Supresor de Tumor**

El efecto más relevante del RARB es su función supresora de varios tumores incluyendo el cáncer cervical, teniendo como principal efecto la inhibición de la proliferación celular (Geisen et al, 2000; Si et al, 1996); en células HeLa positivas al VPH18 se ha encontrado que RARB disminuye la actividad del promotor que dirige la expresión de E6 y E7 (Bartsch et al, 1992) y este mismo efecto fue visto para E7 en las células SiHa positivas al VPH16 cuando fueron tratadas con altas dosis de RA, causando una disminución de la unión de AP1 al sitio del promotor que dirige la expresión de este oncogén (Faluhelyi et al, 2004); en células CaSki positivas al

VPH16 también el RA inhibe la transcripción de E6 y E7 (Narayanan et al, 1998). Sin embargo, un estudio indica que el RA no tiene ningún efecto represivo sobre la expresión de E6 y E7 tanto en células CaSki como en las células HeLa (Myga-Nowak et al, 2011); además, el efecto del RA sobre la proliferación es dependiente del contexto celular y de su concentración así como del tiempo de exposición a la célula (Myga-Nowak et al, 2011).

### **1.5.3. La Oncoproteína E7 Induce Reprogramación Epigenética en Células Infectadas por el VPH de Alto Riesgo**

Las oncoproteínas de los VPHs de alto riesgo exhiben un papel clave en la carcinogénesis del cérvix. La expresión de estas oncoproteínas modifica el perfil transcripcional de las células infectadas, favoreciendo la progresión de la célula transformada hacia un estado canceroso. La oncoproteína E7 del VPH16 ha sido la más estudiada y relacionada con la reprogramación epigenética a nivel de metilación del ADN y de modificaciones en las histonas. Se sabe por ejemplo que la oncoproteína E7 regula la expresión de ciertos genes al interactuar e inducir la actividad de la enzima DNMT (DNMT1; del inglés DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1) (Burgers et al, 2007; Laurson et al, 2010); esta enzima es la principal responsable de mantener en los mamíferos los patrones de metilación de los CpG en las células que se están replicando.

Con respecto a la regulación de la transcripción de genes por las modificaciones de histonas, la oncoproteína E7 interacciona con las deacetilasas de histonas de la clase I (HDACs), las cuales funcionan como represores transcripcionales al inducir un remodelamiento de la cromatina debido a la eliminación de grupos acetilo en los residuos de la lisina que se encuentra en las histonas; como consecuencia de la inhibición de la función de las HDACs se promueve el crecimiento e inmortalización de las células infectadas por el VPH y el mantenimiento estable del genoma y ciclo de vida del virus (Brehm et al, 1999; Longworth & Laimins, 2004). En concordancia con lo anteriormente descrito, E7 incrementa la acetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9), lo cual está

relacionado con activación transcripcional (Zhang et al, 2004). Por otra parte, E7 se asocia directa o indirectamente con proteínas con actividad de transferasas de acetilo a las histonas (HATs) como p300, pCAF y SRC1; se ha demostrado que anula la actividad HAT asociada a SRC1 (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009a).

El análisis de los niveles de H3K27me3 en queratinocitos que expresan el oncogén E7 del VPH16, reveló una dramática reducción de la marca de H3K27me3 la cual es esencial para la represión mediada por el PRC (McLaughlin-Drubin et al, 2011); efectos similares a la disminución de H3K27me3 se detectaron en muestras clínicas de HSILs del cérvix positivas al VPH16 (Hyland et al, 2011; McLaughlin-Drubin & Munger, 2013). La disminución de H3K27me3 es debida a la inducción transcripcional de dos proteínas KDM6A y KDM6B con actividad de desmetilasas específicas para H3K27; el mecanismo aún no es elucidado pero se sabe que es independiente de pRb (McLaughlin-Drubin et al, 2011). Es importante mencionar que la remoción de la marca H3K27me3 es principalmente mediada por KDM6B (Hyland et al, 2011; McLaughlin-Drubin & Munger, 2013).

Los genes que son regulados por las marcas de represión H3K27me3 y de activación H3K4me3 incluyen a los homeobox así como también a cdk4/6 y al supresor de tumor p16INK4A, un biomarcador muy bien establecido para las células infectadas con el VPH de alto riesgo (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b).

La proteína EZH2 con actividad de transferasa de metilo específica para H3K27 y parte del componente PRC2, es oncogénica, está sobreexpresada y amplificada en tumores humanos, y es activada por E2F en células que expresan la oncoproteína E7 (Holland et al, 2008; McLaughlin-Drubin & Munger, 2013). La sobre expresión de EZH2 incrementa la formación de PRC4, el cual cataliza la metilación de la lisina 26 en la histona 1 (H1K26me) y causa un silenciamiento de la transcripción (Kuzmichev et al, 2005). La eliminación de EZH2 causa un arresto del ciclo celular en G1 y niveles bajos de apoptosis (McLaughlin-Drubin & Munger, 2013). Por lo tanto, la oncoproteína E7 del VPH de alto riesgo induce una reprogramación epigenética para activar genes necesarios que inhiban y/o reviertan los mecanismos moleculares de señalización que son activados en la célula infectada.

## **1.6. JUSTIFICACIÓN**

Desde hace más de 3 décadas, Harald zur Hausen asoció a la infección del VPH con el cáncer cervical, y desde entonces se ha estudiado la patología causada por este virus lográndose un gran avance en la comprensión de los factores y mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de esta neoplasia. A pesar de la disponibilidad de vacunas en contra de los VPHs de alto riesgo más comunes (VPH16 y 18) encontrados en el cáncer cervical, y de la aplicación de la prueba de Papanicolau que ha sido de gran utilidad para reducir la incidencia del cáncer cervical en países donde es constante su uso; el cáncer cervical sigue causando una alta incidencia de muertes en mujeres principalmente en países que carecen de infraestructura y programas de salud específicos para la detección de esta enfermedad.

El cáncer cervical se presenta con una alta incidencia en África, América Central, Melanesia, centro y sur de Asia. Se calcula que en México la incidencia es de 20 y la mortalidad de 10 por cada 100 000 mujeres por año (Arbyn et al, 2011).

La infección persistente por el VPH de alto riesgo es la principal causa del desarrollo del cáncer cervical; sin embargo, no todas las mujeres infectadas desarrollan la enfermedad (Moody & Laimins, 2010), lo cual sugiere que para la iniciación del cáncer se necesita la alteración de las vías de señalización que regulan la homeostasis celular, así como alteraciones genéticas y epigenéticas causadas por la expresión constante de las oncoproteínas E6 y E7 del virus (inducen transformación e inmortalización celular) y la presencia de un factor de riesgo.

En congruencia con lo mencionado anteriormente se ha demostrado en un modelo de ratones transgénicos que la expresión del oncogén E7 y concentraciones bajas de estrógeno son suficientes para inducir HSIL y neoplasia cervical invasiva (Arbeit et al, 1996). Además, hay reportes que indican a la deficiencia de la vitamina A y sus derivados (retinoides) como otro importante factor de riesgo asociado al desarrollo del cáncer cervical (Gariglio et al, 2009; Zhang et al, 2012); con respecto a esto, un porcentaje muy variado (del 30 al 60%) de muestras de biopsias extraídas de pacientes con cáncer cervical presentan una disminución de la expresión del supresor

de tumores (RARB) y esta disminución se debe a modificaciones epigenéticas (Ivanova et al, 2002; Narayan et al, 2003; Xu et al, 1999b; Zhang et al, 2007). Este receptor es el principal en ejecutar los efectos fisiológicos de los retinoides. Entre los retinoides el más estudiado es el all-trans-ácido retinoico (ATRA) o ácido retinoico (RA) y participan en la diferenciación celular, apoptosis e inhibición del crecimiento celular (Behbakht et al, 1996; Gariglio et al, 2009; Geisen et al, 2000; Si et al, 1996).

Entre los efectos más relevantes de las oncoproteínas del VPH de alto riesgo están las modificaciones epigenéticas; se ha encontrado que E7 regula ciertos promotores de genes a través de la interacción e inducción de la actividad de la enzima que transfiere metilos al ADN (DNMT1) (Burgers et al, 2007; Laurson et al, 2010). Por lo tanto, nos interesamos en evaluar si las oncoproteínas E6/E7 del VPH16 están involucradas en la regulación de la expresión del promotor del RARB.

El estudio de los efectos de las oncoproteínas del VPH de alto riesgo ha servido y contribuido como modelo para el entendimiento de los mecanismos moleculares en la iniciación y progresión de la carcinogénesis; por consiguiente el estudio de la participación de las oncoproteínas sobre la expresión del RARB proporcionará un mejor entendimiento de las actividades que tienen estas oncoproteínas sobre la inducción de los mecanismos básicos de la carcinogénesis necesarios para la supervivencia de la célula transformada.

## **1.7. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del Virus del Papiloma humano Tipo 16 (VPH16) sobre la expresión del Receptor Beta del Ácido Retinoico (RARB), en líneas celulares derivadas de cáncer cervical y en un modelo de ratones transgénicos K14E7.



## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar por RT-PCR de punto final la expresión basal del ARNm del RARB y el ARNm de los coactivadores del promotor del RARB en diferentes líneas celulares derivadas de cáncer cervical, positivas (HeLa, ViPa, CaLo, SiHa y CaSki) y negativas (C33-A) para el VPH de alto riesgo.
- Realizar la construcción de plásmidos que expresen las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16.
- Evaluar a través de RT-qPCR el efecto de transfecciones transitorias y estables de E6 y E7 realizadas en la línea celular C33-A sobre la expresión del ARNm del RARB.
- Tratar con RA, TSA y DZNep a las células C33-A que han sido transfectadas establemente con el oncogén E7 y medir la expresión del ARNm del RARB.
- Determinar la proliferación celular en las células C33-A que expresan establemente la oncoproteína E7 y son tratadas con RA.
- Transfectar el plásmido que expresa un siRNA dirigido para la mutante TP53 (TP53 R273C) en la línea celular C33-A, la cual exprese establemente la oncoproteína E7 del VPH16 y evaluar por RT-qPCR la expresión del ARNm del RARB.
- Analizar en la línea celular SiHa transfectada transitoriamente con los plásmidos que expresan a TP53 silvestre y TP53 R273C mutado la expresión del ARNm del RARB por RT-qPCR.
- Evaluar por RT-qPCR la expresión del ARNm del RARB en las transfecciones estables realizadas en la línea celular Saos2 con los plásmidos que expresan a TP53 silvestre, TP53 R273C mutado y de la cotransfección con la oncoproteína E7 del VPH16.
- Analizar por RT-qPCR y Western blotting la expresión del gen RARB en los HFKs primarios y en los HFKs transformados con la oncoproteína E7 del VPH16.

- Determinar la expresión tanto del ARNm como de la proteína del RAR-beta en el tejido cervical de ratones de 1.5 meses de edad, tanto en ratones FvB controles como en los ratones transgénicos que expresan la oncoproteína E7 del VPH16 (K14E7).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Cultivos Celulares y Tratamientos**

Las líneas celulares derivadas de cáncer cervical positivas al virus del papiloma humano como HeLa (VPH18), SiHa y CaSki (VPH16) y C33-A (negativa al VPH) junto con la línea celular Saos2 derivada de osteosarcoma (sin VPH) y los queratinocitos primarios aislados de prepucio humano (HFKs, del inglés human foreskin keratinocytes) fueron originalmente adquiridas de la ATCC (American Type Culture Collection); con respecto a las líneas celulares ViPa y CaLo (con VPH18) fueron obtenidas y establecidas de tumores de pacientes mexicanas diagnosticadas con carcinoma cervical epidermoide, proporcionadas amablemente por el Dr. Alberto Monroy (FES-Zaragoza, UNAM, México). Estas líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM (DMEM; del inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS del inglés Fetal Bovine Serum), con 2 mM de L-glutamina y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Invitrogen). Las células se incubaron a 37 °C en un ambiente modificado con 5% de CO<sub>2</sub> y fueron cultivadas hasta alcanzar del 50 al 80% de confluencia antes de realizarse el siguiente pasaje o experimento.

Los HFKs primarios y los HFKs transformados con E7 fueron cultivados en medio libre de suero para queratinocitos el cual contiene el factor recombinante de crecimiento epidermal y extracto de pituitaria de bovino como suplemento (Gibco, Life Technologies).

Para el tratamiento con RA, las células C33-A que expresan establemente la oncoproteína E7 del VPH16 y las células C33-A que no expresan la oncoproteína

fueron cultivadas 24 horas previamente al tratamiento con RA; posteriormente, el medio de cultivo fue reemplazado y la células fueron incubadas con 3  $\mu$ M de RA (Sigma-Aldrich) por un periodo de tres días con un cambio de RA y medio fresco en el día dos previo a la extracción total del ARN. Antes de agregar el medio fresco con RA, las células fueron enjuagadas con PBS (PBS del inglés Phosphate Buffered Saline). El RA fue disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO, CH<sub>3</sub>SOCH<sub>3</sub>) (Merck, USA) a una concentración stock de 10 mM y se conservó a -70 °C. Las células control recibieron solo medio de cultivo con DMSO al 0.03% (v/v). Los tratamientos con tricostantina A (TSA; Sigma-Aldrich) fueron realizados de acuerdo a Zhang et al., 2007. En los experimentos con 3-Deazaneplanocin A (DZNep), las células C33-A fueron tratadas con 30  $\mu$ M de DZNep (Sigma-Aldrich) por 48 h.

## **2.2. Transfecciones Transitorias y Estables**

En cajas petri para cultivo celular de 60 mm x 15 mm fueron sembradas 5 X 10<sup>5</sup> células y transfectadas con diferentes cantidades de plásmidos, pcDNA3 (vector vacío), pcDNA3E6, pcDNA3E7, pcDNA3TP53 R273C, pcDNA3TP53 silvestre y con el kit de plásmidos SureSilencing hRNA para silenciar a TP53 (SABiosciences, Qiagen). Los plásmidos fueron construidos insertando los fragmentos de la secuencia de ADNc que codifica para el gen E6 y E7 del VPH16 dentro del vector pcDNA3, empleando el sitio de corte único para la enzima *HindIII*. La orientación de los insertos fue determinada por secuenciación del ADN de los plásmidos. Las transfecciones fueron realizadas usando el reactivo lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el proveedor. Con la finalidad de obtener una línea celular estable, las células transfectadas fueron seleccionadas durante dos semanas en un medio de crecimiento que contenía 1200  $\mu$ g/mL de G-418 (Invitrogen). Para conservar las células transfectadas, las clonas fueron crecidas en un medio que contiene 800  $\mu$ g/mL de G-418. Mientras que para los ensayos de transfección transitoria, las células fueron cosechadas a las 48 horas después de la transfección.

### **2.3. Proliferación Celular (Ensayo de MTT)**

La línea celular C33-A derivada de cáncer cervical y las células C33-A que expresan establemente la oncoproteína E7 fueron sembradas en una placa de 24 pozos a una densidad de 50 000 células con 1 mL de medio DMEM por pozo. Después de la adherencia de las células a la placa de cultivo durante 24 h, el tratamiento con RA fue hecho de acuerdo a la sección de metodología cultivo celular y tratamientos. La viabilidad celular fue determinada por el método convencional 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich); una solución de MTT (0.5 mg/mL de medio DMEM sin suero) fue preparada y usada inmediatamente; para esto, el medio de cultivo fue removido de la placa de cultivo de 24 pozos, los pozos fueron lavados con PBS y se les agregó la solución de MTT; las células fueron incubadas por 30 minutos a 37°C. La formación de los cristales de formazan fueron removidos y solubilizados con 500 µL de isopropanol acidificado y la absorbancia fue medida en una placa de lectura a 570 nm de longitud (Sunrise, TECAN). La viabilidad celular fue expresada en porcentaje considerando como control a las células C33-A sin la expresión del oncogén E7 o el tratamiento con RA.

### **2.4. RT-PCR de Punto Final y PCR Cuantitativa de la Transcriptasa Reversa (RT-qPCR)**

El ARN total de las líneas celulares derivadas de cáncer cervical, HFKs, Saos2 y del tejido cervical de ratones (previamente triturado en un mortero con nitrógeno líquido) fue extraído usando el reactivo trizol y tratado con DNasa I libre de RNasa (Invitrogen) y almacenado a -70°C de acuerdo a las sugerencias recomendadas. El ADNc fue sintetizado a partir de 5 µg de ARN total usando la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen) en un volumen total de la reacción de 20 µl. Los cebadores (primers) de oligonucleótidos, los cuales no incluyen intrones fueron diseñados de acuerdo a las secuencias reportadas en la base de datos de GenBank y comprados en Invitrogen. En la Tabla suplementaria 2 se muestran las secuencias de primers que se diseñaron con el software primer express.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada con estos cebadores empleando una temperatura de 95°C por 3 min, seguida por 40 ciclos a 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s y 72°C por 7 min.

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1.5% y las imágenes fueron obtenidas después de teñir los geles con bromuro de etidio. La RT-qPCR fue realizada usando SYBR green Master Mix (Thermo Scientific) en el sistema PCR de tiempo real ABI 7300 y la reacción óptima de PCR fue establecida de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). La eficiencia de la RT-qPCR fue determinada para cada gen analizado, obteniéndose los siguientes valores:  $R^2 = 0.992$  y  $\text{Eff\%} = 96.459$  para beta-2-microglobulina (B2M);  $R^2 = 0.882$  y  $\text{Eff\%} = 97.964$  para el receptor beta del ácido retinoico de humano (RARB);  $R^2 = 0.996$  y  $\text{Eff\%} = 105.177$  para el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en ratón (Gapdh);  $R^2 = 0.95$  y  $\text{Eff\%} = 85.000$  para el receptor beta del ácido retinoico de ratón (Rarb). Cada reacción fue realizada por triplicado. El gen de expresión constitutivo B2M de humano y el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de ratón fueron usados como control para normalizar los ensayos y el valor del threshold (Ct) de cada muestra y fueron usados para determinar los niveles relativos de expresión de los genes problema (se empleó el método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ).

## **2.5. Análisis de las Proteínas por Western Blotting**

Las líneas celulares, HFKs y los tejidos cervicales de los ratones transgénicos K14E7 fueron lisados usando un buffer de lisis, el cual contiene 1% de triton X-100, 4.9 mM/mL de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM/mL de ortovanadato de sodio, 2.1  $\mu\text{g/mL}$  de aprotinina, 0.5  $\mu\text{g/mL}$  de leupeptina y 1 mM/mL fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, del inglés phenylmethylsulfonyl fluoride). Las proteínas fueron separadas por su tamaño en electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato sódico (SDS, del inglés sodium dodecyl sulfate y PAGE del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore) por electrotransferencia (del inglés, electroblotting). Después de bloquear la membrana de nitrocelulosa por una hora con el 5% de leche en polvo sin grasa

disuelta en PBS, las membranas fueron incubadas durante una noche con el anticuerpo primario para el Rarb de ratón (C19) (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A) a una dilución de 1:500. El anticuerpo para TP53 (Santa Cruz Biotechnology, sc-126 HRP) fue usado a una dilución de 1:500 el cual está acoplado a peroxidasa. El anticuerpo para el RARB de humano (Santa Cruz Biotechnology, sc-552) y el anticuerpo para E7 del VPH16 (Santa Cruz Biotechnology, sc-6981) fueron usados en la dilución 1:500. Una cantidad igual de carga y de transferencia de proteínas fue evaluada usando un anticuerpo monoclonal para beta-actina y  $\alpha$ -tubulina (Sigma-Aldrich) a una dilución de 1:500. Las bandas fueron visualizadas con un anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma-Aldrich) a una dilución de 1:10000. Las señales fueron detectadas y visualizadas usando los reactivos ECL Western blotting (Amersham Biosciences). La intensidad de la banda de la proteína fue analizada con el software ImageJ (versión 1.41).

## **2.6. Mantenimiento de los Ratones**

Los ratones fueron conservados y tratados de acuerdo a los procedimientos de la American Association of Laboratory Animal Care (AALAC). Todos los procedimientos realizados en los ratones estuvieron bajo el protocolo para animales, aprobado por la Research Unit for Laboratory Animal Care Committee (UPEAL-CINVESTAV-IPN, México; NOM-062-ZOO-1999). Los ratones K14E7 transgénicos y los ratones FvB no transgénicos usados en este estudio fueron de 1.5 meses de edad. La generación del ratón K14E7 transgénico ha sido previamente descrito (Herber et al, 1996). Para el análisis por RT-qPCR, tres ratones K14E7 y tres ratones control no transgénicos se usaron; mientras que para el análisis por Western blot, se incluyeron cuatro ratones de cada grupo. Se muestran dos ratones de cada grupo.

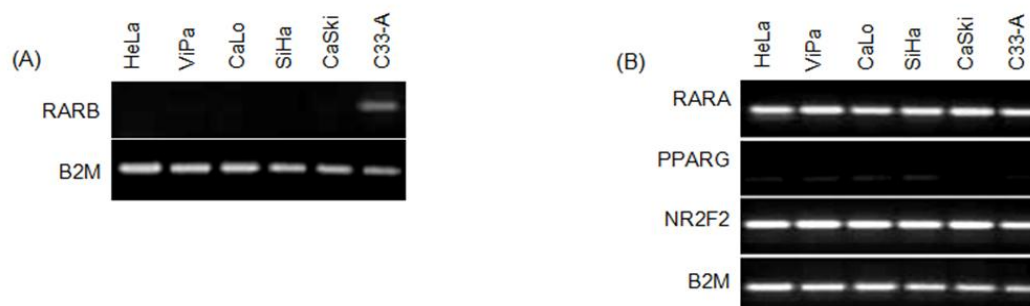
## **2.7. Análisis Estadístico**

Se utilizó la *t* de Student para evaluar la significación estadística de los datos. Los análisis estadísticos fueron hechos en el programa SPSS, versión 16.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago II).

## **RESULTADOS**

### **3.1. Líneas celulares derivadas de cáncer cervical VPH positivas no expresan el ARNm del RARB**

Varias líneas celulares de tumores y tumores primarios de humanos, incluyendo al cáncer cervical, presentan disminuida o abatida la expresión del RARB (Choi et al, 2007; Ivanova et al, 2002; Narayan et al, 2003; Xu et al, 1999b; Youssef et al, 2004; Zhang et al, 2007). En concordancia con lo mencionado, en la figura 1A se muestra por RT-PCR de punto final la ausencia de la expresión del ARNm del RARB en todas las líneas celulares analizadas positivas al VPH; sin embargo, la línea celular C33-A negativa para el VPH y con una mutación en el gen TP53 (TP53 R273C), expresa de manera disminuida el ARNm del RARB. Debido a que se ha reportado a RAR-alpha, PPAR-gamma y COUP-TF2 (gen NR2F2) como coactivadores del promotor RARB (Geisen et al, 1997; James et al, 2003; Kruyt et al, 1991; Lin et al, 2000) nos preguntamos si habría una diferencia en la expresión del ARNm de estos coactivadores entre la línea celular C33-A y las líneas celulares positivas al VPH. La figura 1B muestra por RT-PCR que el nivel del ARNm del PPAR-gamama fue ligeramente más bajo en CaSki que en las otras líneas celulares.



**Figura 1. La expresión del gen RARB está inhibida en las líneas celulares de cáncer cervical VPH positivas.** Ensayo de RT-PCR en células con VPH18 (HeLa, ViPa y CaLo), VPH16 (SiHa, CaSki) y negativas al VPH (C33-A). (A) Análisis de la expresión basal del ARNm del RARB. (B) Expresión basal del ARNm de diferentes coactivadores del promotor RARB, lo cual indica que solamente el nivel del ARNm del PPAR-gamma (PPARG) fue más bajo en las células CaSki que en las otras líneas celulares. Los productos amplificados por PCR fueron separados en geles de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio. El gen beta-2-microglobulina (B2M) fue usado como control.

### **3.2. La oncoproteína E7 del VPH16 incrementa la expresión del ARNm del RARB independientemente de la inhibición de HDACs en la línea celular C33-A y el RA junto con E7 potencian la sobre expresión del RARB sin afectar la proliferación**

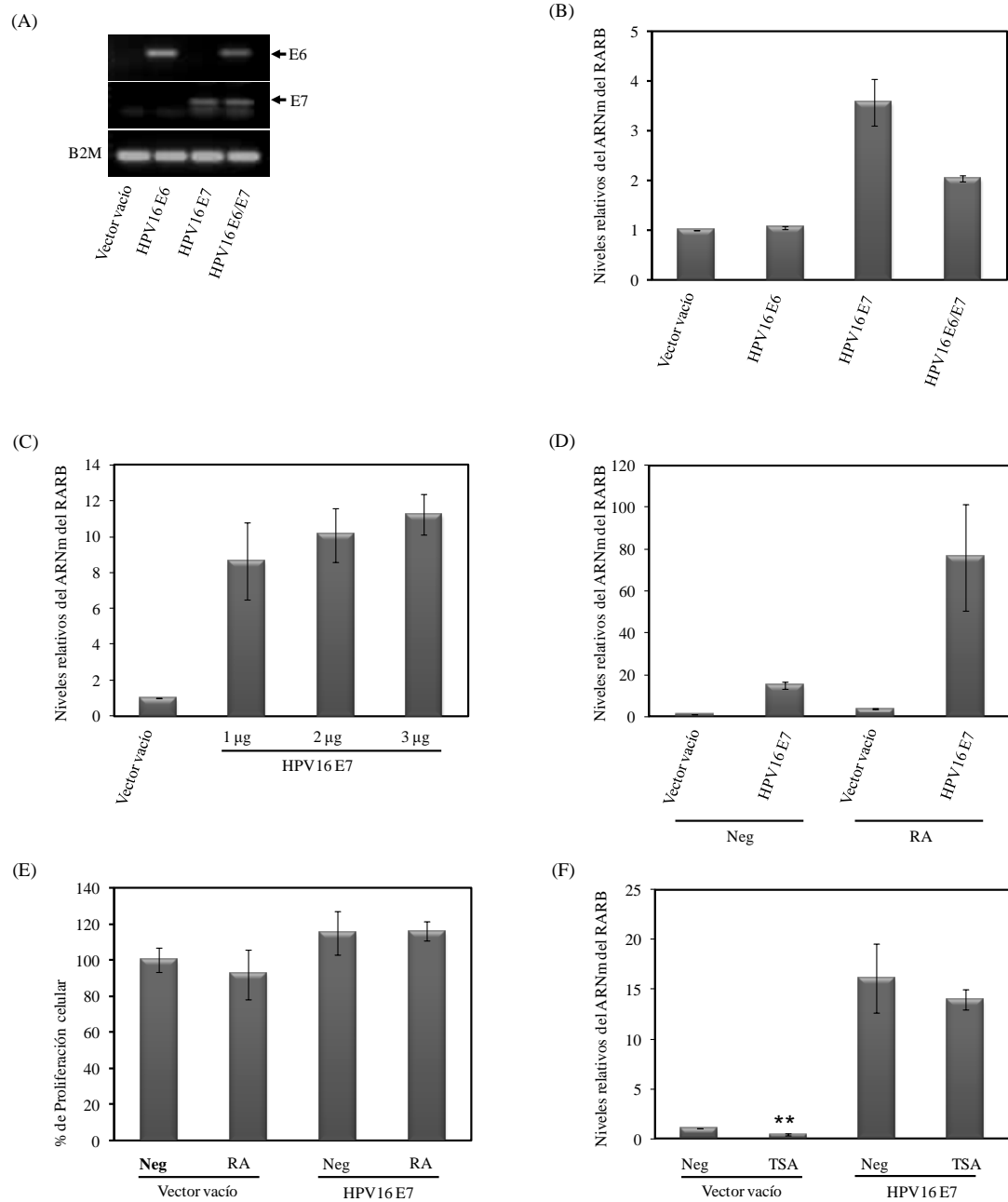
Para determinar si la expresión de las oncoproteínas E6 y/o E7 del VPH16 causan cambios en la expresión del gen RARB, se transfectaron transitoriamente estos oncogenes virales en la línea celular C33-A (Figura 2A). Sorprendentemente, se encontró por RT-qPCR que las células que expresan la oncoproteína E7 tienen incrementado casi 4 veces más la expresión del gen supresor de tumores RARB en comparación con las células control transfectadas con el vector vacío (Figura 2B). Sin embargo, los niveles del ARNm del RARB en las células C33-A transfectadas con E6 no tuvieron cambios y se observó un nivel intermedio de la expresión del ARNm del



RARB cuando ambas oncoproteínas fueron expresadas (Figura 2B). Para confirmar si estos resultados obtenidos se debieron a un efecto de la transfección transitoria, o a la concentración del plásmido que se usó, se realizó una transfección estable usando cantidades incrementadas del plásmido que expresa la oncoproteína E7 del VPH16. Mediante RT-qPCR se observa una expresión aumentada del RARB alrededor de 10 veces más en todas las clonas estables de las células que expresan diferentes concentraciones del oncogén E7 cuando se comparan con las células transfectadas con el vector vacío (Figura 2C). Un experimento similar fue realizado para la oncoproteína E6; sin embargo, los niveles de expresión del ARNm del RARB no fueron alterados (resultados no mostrados), lo cual sugiere que este efecto es específico e independiente de la concentración de E7 del VPH16. Además, se analizó la expresión del RARB en HFKs transformados con E7 del VPH16 en el pasaje 5 (RT-qPCR) y en el pasaje 7 (Western blotting); los experimentos de RT-qPCR en HFKs no mostraron cambios en los niveles de expresión del ARNm del RARB, mientras que los experimentos de Western blotting sugieren que en los HFKs hay un ligero (1.54 veces más) incremento en los niveles de la proteína RAR-beta debido a la presencia de la oncoproteína E7 del VPH16 (Figura suplementaria 1).

Debido a que el RA activa al promotor del RARB, se determinó su efecto sobre la expresión del ARNm del RARB en células que expresan establemente la oncoproteína E7 por RT-qPCR. En las células control se observó el resultado esperado, un incremento de 3 veces más de la expresión del ARNm del RARB después del tratamiento con RA; mientras que las células C33-A establemente transfectadas con E7 y tratadas con RA mostraron una fuerte expresión del ARNm del RARB (75 veces más) (Figura 2D). Se sabe que la sobreexpresión del RARB promueve la inhibición de la proliferación de las células cancerosas (Geisen et al, 2000; Hayashi et al, 2001; Si et al, 1996). Sin embargo, en este trabajo se encontró por el ensayo de MTT que ambas líneas celulares C33-A control y C33-A que expresa establemente la oncoproteína E7 no mostraron cambios significativos en la proliferación después del tratamiento con RA (Figura 2E, ver también el Esquema 3 en la sección de la Discusión). Por otro lado, el TSA incrementa la expresión del ARNm del RARB en las células SiHa a través de la inhibición de las HDACs (Zhang

et al, 2007); cultivamos las células C33-A que expresan establemente a E7 en presencia de TSA para determinar si la expresión incrementada del ARNm del RARB inducida por E7 es dependiente de la inhibición de HDACs. Las células C33-A control tratadas con TSA mostraron una disminución significativa de la expresión del ARNm del RARB; mientras que, las células C33-A que expresan E7 tratadas con TSA no mostraron ningún cambio en la expresión del ARNm del RARB (Figura 2F). Estos resultados sugieren que la activación de la expresión del ARNm del RARB por la oncoproteína E7 en las células C33-A es independiente de la inhibición de HDACs. Para determinar si la inducción de la expresión del gen RARB por la oncoproteína E7 del VPH16 es mediada por una desmetilación global de la marca H3K27me3, se trataron las células C33-A control con 3-Deazaneplanocin A (DZNep), se reportó que este compuesto inhibe la expresión de EZH2 y la marca H3K27me3 (Miranda et al, 2009); como parte de los complejos represivos del poycomb, la enzima EZH2 es la responsable de la trimetilación de la H3K27 (H3K27me3) (Miranda et al, 2009). Se especuló que el DZNep incrementara los niveles del ARNm del RARB principalmente en las células C33-A control, pero curiosamente, la expresión del ARNm del RARB fue ligeramente disminuido en ambas células C33-A control y en las células C33-A que expresan a E7 (resultados no mostrados).



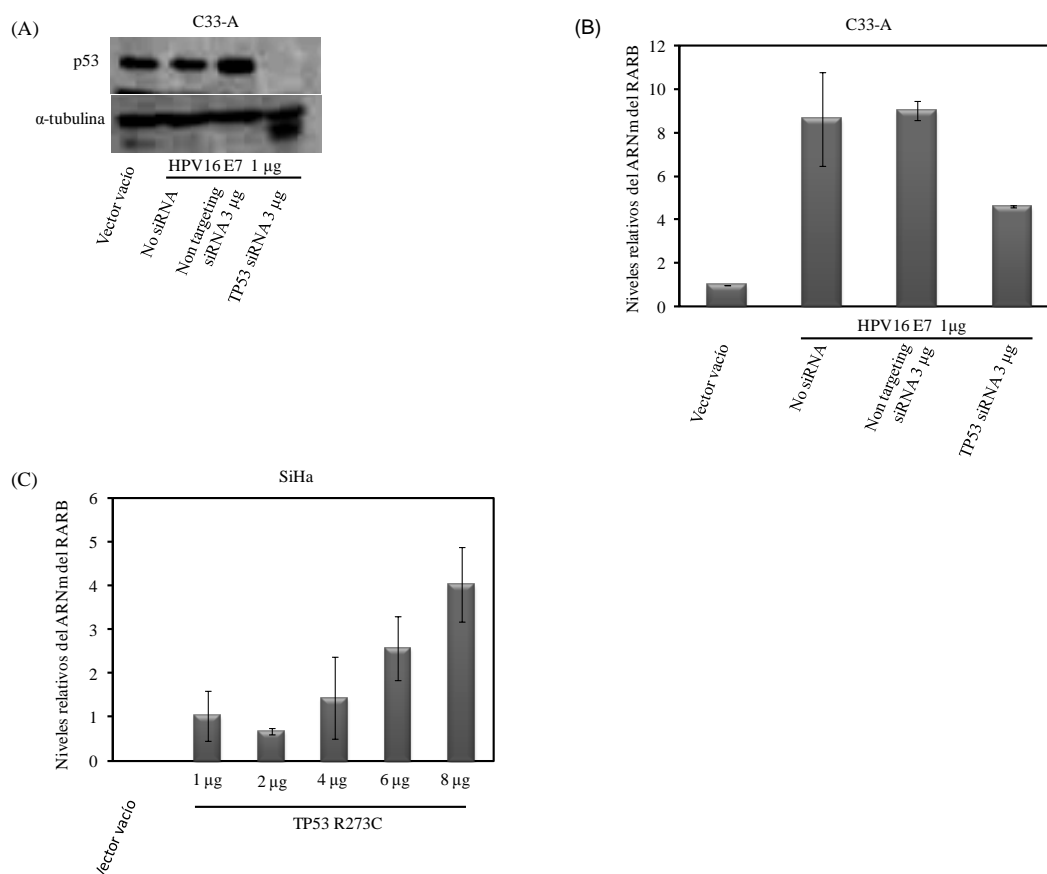
**Figura 2. La oncoproteína E7 del VPH16 incrementa los niveles de expresión del ARNm del RARB en células C33-A y este aumento es sinergizado por RA, mientras que el TSA no lo aumenta.** Las células C33-A fueron transfectadas con el vector pcDNA3 vacío o con los plásmidos que expresan a las oncoproteínas E6, E7 o E6 junto con E7 del VPH16 (pcDNA3E6 y pcDNA3E7), como se indica en materiales y métodos. (A) RT-PCR de la expresión de los transcritos E6 y E7 en las

células C33-A transfectadas transitoriamente. Análisis por RT-qPCR de la expresión del ARNm del RARB en células C33-A: (B) transfección transitoria con 1µg; (C) transfección estable con concentraciones incrementadas gradualmente del oncogén E7; (D) células que expresan establemente la oncoproteína E7 (transfección de 1µg) y tratadas con o sin 3 µM de RA; (E) células con la expresión estable de la oncoproteína E7 del VPH16, fueron cultivadas con o sin 0.6 µM de TSA; y (F) ensayo de proliferación celular realizado en células C33-A control y en células C33-A establemente transfectadas con el oncogén E7 después del tratamiento con RA. La proliferación celular de ambos grupos de células se determinó usando el método de MTT, como se describe en materiales y métodos. Los porcentajes de crecimiento fueron relativos a las células que crecieron establemente transfectadas con el vector vacío o en ausencia de RA (DMSO al 0.03%). Se determinaron los porcentajes de crecimiento de las células C33-A establemente transfectadas con la oncoproteína E7 en presencia o ausencia del tratamiento con RA. En todos los ensayos el gen beta-2-microglobulina (B2M) fue usado como control para medir la expresión del gen RARB. En las gráficas se representa el promedio de 3 experimentos independientes y las barras muestran el valor  $\pm$  de la desviación estándar. Los cambios estadísticamente significativos son indicados por dos asteriscos ( $P < 0.001$ ).

### **3.3. La mutante (R273C) del gen TP53 participa en el aumento de la expresión del RARB en las líneas celulares cervicales que expresan la oncoproteína E7 del VPH16**

Debido a que la línea celular C33-A tiene a TP53 mutado (Scheffner et al, 1991), el efecto de esta mutación fue analizado sobre la expresión del RARB. Considerando que la mayoría de los tumores humanos presentan mutaciones en la secuencia del gen TP53 (Freed-Pastor & Prives, 2012), es posible que la mutante R273C de TP53 presente en C33-A podría ser parcialmente responsable del incremento de la expresión del ARNm del RARB (Figura 1A). Se cotransfectó a las células C33-A que expresan a la oncoproteína E7 establemente con diferentes

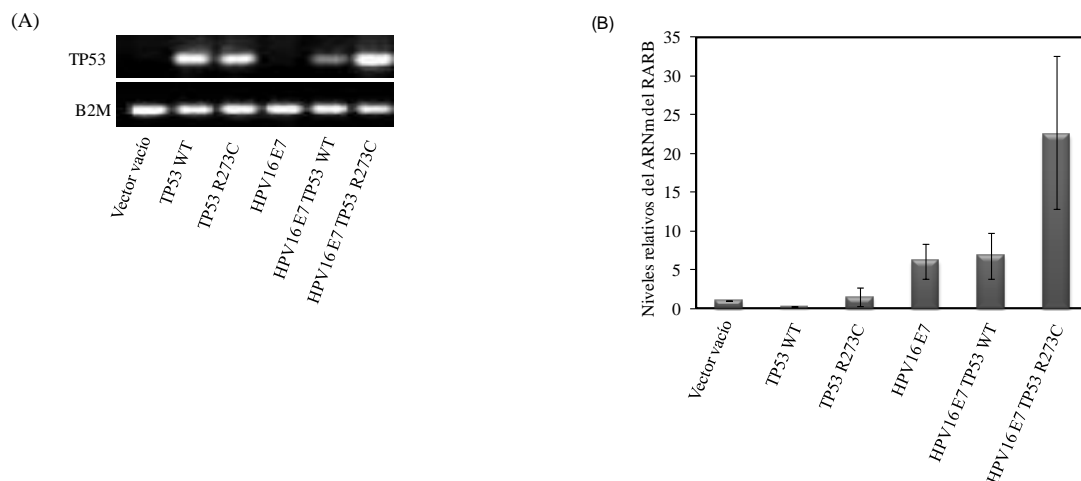
cantidades de un siRNA específico para TP53. Como se muestra en la figura 3A por el análisis de Western blot para la expresión del antígeno tumoral p53 (p53), el silenciamiento de TP53 mutado revela una disminución de los niveles del ARNm del RARB en la células C33-A; esta disminución de los niveles del ARNm del RARB se encontró solamente después de la transfección con 3 µg del siRNA específico para TP53, cuando éste es comparado con los controles sin siRNA y con el siRNA no específico (Figura 3B); la transfección con menos de 3 µg del siRNA específico para TP53 no silenció a TP53 R273C mutado y no afectó significativamente la expresión del ARNm del RARB (resultados no mostrados). Para reafirmar el hallazgo de la activación del gen RARB por TP53 R273C, transfectamos establemente la línea celular cervical SiHa (positiva para VPH16 con baja expresión de TP53 silvestre) con cantidades crecientes del plásmido que codifica para la mutante TP53 R273C o para TP53 silvestre. El análisis de estas transfecciones reveló por RT-qPCR un incremento gradual de los niveles de expresión del ARNm del RARB dependiente de la concentración de TP53 R273C (Figura 3C), pero no así para TP53 normal (resultados no mostrados). Considerando que la línea celular SiHa no expresa el ARNm del RARB porque su promotor está epigenéticamente silenciado debido a un incremento en la deacetilación de histonas (Figura 1 A) (Zhang et al, 2007), es posible que TP53 R273C regule positivamente la expresión de RARB mediante un mecanismo que involucre la activación de HATs o la inhibición de HDACs en las células SiHa.



**Figura 3. La mutante R273C de TP53 incrementa la expresión del ARNm del RARB en las líneas celulares de cáncer cervical.** (A) Análisis de Western blot de los niveles de la proteína p53 en C33-A y en C33-A establemente transfectada con E7 y cotransfectada con un siRNA específico para TP53. Cantidades iguales de proteínas [normalizadas para  $\alpha$ -tubulina (del inglés, tubulin alpha-1A chain)] se cargaron en un gel de SDS PAGE. Se realizaron tres experimentos independientes. Ensayos de RT-qPCR para la expresión del ARNm del RARB realizados en: (B) Células C33-A transfectadas establemente con el oncogén E7 del VPH16 y con la mutante TP53 R273C silenciada (siRNA para TP53); y (C) Células SiHa las cuales no expresan el RARB fueron transfectadas establemente con cantidades incrementadas del plásmido que expresa la mutante TP53 R273C. El gen beta-2-microglobulina (B2M) fue usado como control de la expresión constitutiva. Cada gráfica representa el promedio de 3 experimentos independientes y las barras representan el valor  $\pm$  de la desviación estándar.

### **3.4. La oncoproteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 y la mutante TP53 R273C hacen sinergia en la activación de la expresión del ARNm del RARB**

La proteína TP53 R273C mutada junto con la oncoproteína E7 del VPH16 estimulan la expresión del ARNm del RARB tanto en las células C33-A como en las células SiHa y para evitar un efecto de tetraheterodimerización entre TP53 silvestre y TP53 R273C (en células SiHa) y discernir los efectos del oncogén E7 y de TP53 R273C mutado, decidimos transfectar los plásmidos TP53 silvestre o TP53 R273C mutado y E7 del VPH16 en la línea celular Saos2, la cual no expresa TP53 (Figura 4A) ni las oncoproteínas del VPH (resultados no mostrados). Por lo tanto, la línea celular Saos2 fue establemente transfectada con los plásmidos que expresan TP53 silvestre o TP53 R273C mutado o cotransfectados con E7. Como se observa en la figura 4B, en las células Saos2 establemente transfectadas con los plásmidos TP53 silvestre o TP53 R273C mutado no se modificó sustancialmente la expresión del ARNm del RARB. Sin embargo, la transfección con la oncoproteína E7 del VPH16 sola o con TP53 R273C incrementó 6 y 20 veces el nivel de expresión del ARNm del RARB, respectivamente (Figura 4B). Mientras que la transfección con TP53 silvestre no presentó ningún efecto sobre el nivel de expresión del ARNm del RARB cuando se cotransfectó junto con el plásmido que expresa E7 del VPH. Estos resultados indican que *in vitro* la mutante TP53 R273C hace sinergia con la oncoproteína E7 para incrementar los niveles del ARNm del RARB.

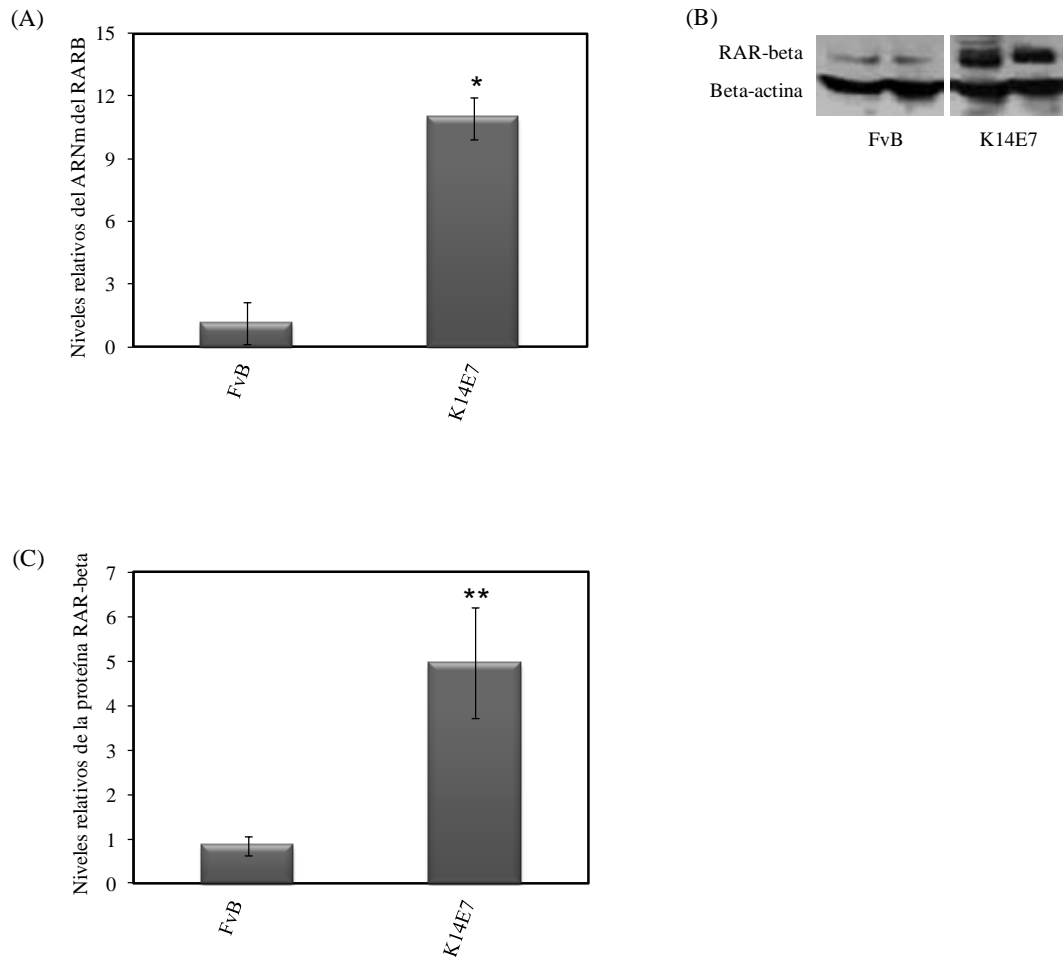


**Figura 4. La oncoproteína E7 del VPH16 y la mutante TP53 R273C hacen sinergia para aumentar la expresión del ARNm del RARB en la línea celular Saos2.** (A) RT-PCR de punto final para evaluar la expresión del ARNm de TP53 en células Saos2 (negativa para el VPH y TP53) transfectadas establemente solo con TP53 silvestre o TP53 R273C mutado o cotransfectadas establemente con la oncoproteína E7 del VPH16, respectivamente. Como control, la expresión del ARNm de TP53 fue determinada en las células Saos2 establemente transfectadas con TP53 silvestre o TP53 R273C mutado. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% y teñido con bromuro de etidio. (B) Incremento del nivel de expresión del ARNm del RARB en las células Saos2 determinado por RT-qPCR en presencia de TP53 R273C mutado o TP53 silvestre y en combinación con la cotransfección de la oncoproteína E7. La transfección de TP53 silvestre sola o con E7 y la transfección individual de la mutante TP53 R273C no afectaron la expresión del RARB. Cada gráfica representa el promedio de 3 experimentos independientes y las barras indican el valor  $\pm$  de la desviación estándar. El gen constitutivo beta-2-microglobulina (B2M) fue usado en ambos experimentos como control.



### **3.5. La oncoproteína E7 del VPH16 incrementa la expresión del RARB en el tejido cervical de ratones transgénicos K14E7**

El ratón transgénico K14E7 expresa la oncoproteína E7 bajo el promotor de la citoqueratina 14 en los queratinocitos del tejido cervical; este ratón desarrolla cáncer al ser tratado crónicamente durante 6 meses con dosis bajas de  $17\beta$ -estradiol (Brake & Lambert, 2005; Herber et al, 1996); además, es un modelo muy bien establecido para estudiar los efectos de la oncoproteína E7 del VPH16 y cofactores en la carcinogénesis cervical. Por lo tanto, en este modelo se analizó el impacto de la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 como principal factor etiológico implicado en la carcinogénesis cervical. Se determinó por RT-qPCR la expresión del gen RARB en tejidos del cérvix extraído de ratones transgénicos K14E7 de 1.5 meses de edad y de FvB controles. La figura 5A muestra el nivel del ARNm del Rarb significativamente elevado en ratones K14E7, en comparación con el de los ratones FvB controles o de los ratones K14E6 y K14E7/E6 transgénicos (Figura suplementaria 2). Además, como se muestra en las figuras 5B y 5C, la expresión de la proteína RAR-beta también está incrementada en los ratones transgénicos K14E7 de 1.5 meses de edad. Por lo tanto, también se demuestra *in vivo* que la oncoproteína E7 incrementa los niveles de expresión del gen RARB.



**Figura 5. La oncoproteína E7 del VPH16 incrementa la expresión del ARNm y proteína del RAR-beta en el tejido cervical de ratones transgénicos K14E7 de 1.5 meses de edad.** (A) Análisis por RT-qPCR de la expresión del ARNm del RARB en muestras de cérvix indicado. El gen GAPDH (del inglés, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) fue usado como gen de referencia, cada gráfica representa el promedio de 3 experimentos biológicamente independientes y las barras muestran el valor  $\pm$  de la desviación estándar. (B) Análisis de Western blot para evaluar la expresión de la proteína RAR-beta en el tejido cervical indicado (dos ratones de 1.5 meses de edad de cada grupo estudiado son mostrados) y normalizada con beta-actina. (C) Densitometría de la expresión de la proteína RAR-beta con promedios y valores  $\pm$  de la desviación estándar de 4 ratones FvB control y 4 ratones transgénicos K14E7, los cuales se analizaron por triplicado cada uno. Los cambios

estadísticamente significativos se indican por un asterisco ( $P < 0.05$ ) o dos asteriscos ( $P < 0.001$ ).

## DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó con la finalidad de determinar el efecto de la oncoproteína E7 del VPH16 sobre la expresión del gen RARB, tanto en líneas celulares como en ratones transgénicos. RARB es de los más potentes supresores de tumores entre los receptores del ácido retinoico; está involucrado en la inhibición del crecimiento celular y se ha demostrado que bloquea la función de AP1 (De-Castro Arce et al, 2004; Geisen et al, 2000; Hayashi et al, 2001; Si et al, 1996). Por otra parte, la expresión del RARB es afectada en muchos tipos de cánceres incluyendo el cervical y HNSCCs, debido a modificaciones epigenéticas como la hipermetilación y modificaciones de histonas de su promotor, pérdida o rearrreglos estructurales de su secuencia (Choi et al, 2007; Ivanova et al, 2002; Narayan et al, 2003; Xu et al, 1999b; Zhang et al, 2007). Por ejemplo, en cáncer cervical la disminución de la transcripción del RARB se correlaciona con el grado de metilación de su promotor, el cual incrementa progresivamente desde un 11% en lesiones de bajo grado hasta un 29% en lesiones de alto grado y con un porcentaje variable del 33% al 63% en cánceres invasivos (Narayan et al, 2003; Xu et al, 1999b); con respecto a lo anterior, un estudio reportó que la transcripción de este importante gen se encuentra incrementada 1.5 veces en lesiones cervicales benignas, mientras que se encontró una reducción progresiva de la expresión del RARB en etapas avanzadas de la enfermedad (Abu et al, 2008). Por otra parte, ha sido reportado que en queratinocitos de prepucio inmortalizados con VPH16 o VPH18 se produce una metilación gradual del promotor RARB y una correspondiente disminución en el nivel de expresión del ARNm, esta metilación no se manifiesta si no hasta los pasajes tardíos de la inmortalización de los queratinocitos (Henken et al, 2007). Estos datos sugieren que esta modificación epigenética en el promotor del RARB juega un papel importante en su regulación transcripcional y que es dependiente de la etapa de progresión de la carcinogénesis

cervical. Además, la disminución de la expresión del RARB observada en etapas avanzadas del cáncer cervical podría también estar asociada a niveles bajos de vitamina A en suero, por insuficiente consumo (Berlin Grace et al, 2006). De acuerdo con los hallazgos previamente mencionados, reconfirmamos que el gen RARB no está expresado en todas las líneas celulares positivas al VPH analizadas pero se expresa en la línea celular C33-A negativa al VPH (Figura 1A).

Debido a que la oncoproteína E7 del VPH16 puede reprimir al promotor del gen E-caderina mediante el aumento de la actividad de la DNMT1 (Laurson et al, 2010), se consideró que E7 podría ser la responsable del silenciamiento del gen RARB en las líneas de células cancerosas positivas al virus del papiloma humano. Sorprendentemente, encontramos una expresión incrementada del ARNm del RARB en células C33-A transfectadas transitoria y establemente con el oncogén E7 (Figuras 2B y 2C, respectivamente). Además, en la línea celular Saos2 transfectada establemente con el oncogén E7 también se incrementaron los niveles del ARNm del RARB comparadas con las células Saos2 sin transfectar (Figura 4B). Estos resultados indican que la oncoproteína E7 del VPH16 no reprime el promotor del RARB en estas células, al contrario esta oncoproteína incrementa la expresión del ARNm del RARB.

A diferencia de los queratinocitos del cérvix del ratón transgénico K14E7, los HFKs primarios responden mínimamente a la inducción del RARB por la oncoproteína E7. Una posible explicación puede estar relacionada con el reporte de Darwiche (1994), el cual indica que los transcritos del RARA y RXR solamente se expresaron en el epitelio cervical escamoso estratificado al compararse con el epitelio columnar simple (altamente responsivo a la vitamina A), el cual expresó altos niveles de transcritos del RARA, RXRs y RARB (Darwiche et al, 1994). Desafortunadamente, los HFKs primarios son obtenidos de prepucio, el cual está formado principalmente de epitelio escamoso estratificado, sugiriendo que estas células podrían ser relativamente resistentes a la sobreexpresión del RARB inducida por la oncoproteína E7 del VPH16 (Figura suplementaría 1). Además, es importante considerar que en el modelo *in vivo*, varios factores microambientales así como también algunos factores transcripcionales relacionados al tejido cervical de los

ratones transgénicos K14E7 pueden contribuir a la sobreexpresión del RARB (Figura 5). Entre estos factores microambientales se puede incluir a la mucosa inalterada, la presencia de estroma y del sistema inmune, los cuales pueden afectar el resultado en las células HFKs transfectadas con E7.

Debido a que E7 del VPH de alto riesgo interactúa con HDACs y HATs para regular la expresión de algunos genes (Bodily et al, 2011; Brehm et al, 1999), es posible predecir que las HDACs podrían estar regulando la expresión del RARB; sin embargo, cuando la línea celular C33-A, la cual expresa la oncoproteína E7, fue tratada con un inhibidor de HDACs (TSA), la expresión del ARNm del RARB no cambió (figura 2E); por lo tanto, la inducción de la expresión del gen RARB no es dependiente de la inhibición de HDACs.

Las mutaciones somáticas del gen TP53 se manifiestan con una frecuencia del 9% al 16% en los tumores del cáncer cervical (Ojesina et al, 2014; Tornesello et al, 2014); sin embargo, debido a que la línea celular C33-A derivada de cáncer cervical contiene la mutante TP53 R273C, evaluamos su efecto sobre la expresión del RARB. Sorpresivamente, se encontró que la mutante TP53 R273C coopera con E7 en la sobreexpresión del RARB en las líneas celulares C33-A, SiHa y Saos2. Dado que el promotor del RARB está silenciado por las HDACs en la línea celular SiHa (Zhang et al, 2007), se consideró que en presencia de la oncoproteína E7 la mutante TP53 R273C podría contribuir a la activación del RARB como un posible inhibidor de HDACs en esta línea celular (Figuras 3C). En apoyo a lo mencionado anteriormente, se ha demostrado que varios genes son transactivados por mutantes de TP53 (Freed-Pastor & Prives, 2012) a través de la acetilación de histonas en sus promotores blanco (Vrba et al, 2008). Además, se ha demostrado que varios genes son activados por la mutante TP53 R273H, la cual es muy similar a la mutante TP53 R273C (por ejemplo, ambas mutantes estimulan la proliferación, inducen invasión, presentan resistencia a drogas, entre otros efectos) (Li et al, 2014; Vaughan et al, 2012); TP53 R273C es una mutación con pérdida de sentido en los residuos de aminoácidos con pérdida de sentido, que comúnmente hacen contacto directo con las secuencias blanco de ADN y tiene también un efecto dominante negativo sobre TP53 silvestre (Freed-Pastor & Prives, 2012).

A pesar de que la degradación de TP53 silvestre es promovida por la oncoproteína E6 (Scheffner et al, 1990), algunas mutantes de TP53 son resistentes a este efecto (Bernard et al, 2011). En este trabajo se observó que la sobreexpresión del ARNm del RARB en las células C33-A transfectadas establemente con la oncoproteína E7 fue más baja cuando la oncoproteína E6 estaba presente, sugiriendo que la oncoproteína E6 podría parcialmente degradar a la mutante TP53 R273C; en acuerdo con estos resultados, fue publicado que E6 del VPH16 se une a la proteína TP53 R273C y promueve su degradación (Scheffner et al, 1992).

En este trabajo también se encontró en el tejido cervical de ratones transgénicos K14E7 de 1.5 meses de edad sin neoplasia cervical (ausencia de tratamiento con estrógeno exógeno), un marcado incremento del RARB tanto a nivel del ARNm como de la proteína en comparación con los ratones control FvB (Figura 5). Es importante enfatizar que a pesar que E7 induce una alta inestabilidad genómica, estos ratones transgénicos no desarrollan cáncer, solo una moderada hiperplasia epitelial escamosa en el exocérnix (Herber et al, 1996). Como fue mencionado anteriormente, los ratones transgénicos K14E7 solo desarrollan cáncer cervical cuando ellos son tratados crónicamente por 6 meses con 17 $\beta$ -estradiol; interesantemente, fue reportado en cáncer de mama que los receptores del estrógeno (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ), los cuales son activados por el 17 $\beta$ -estradiol reprimen la transcripción del gen RARB (Ribeiro et al, 2014; Rousseau et al, 2003). Basándose de estos resultados, se podría sugerir que en el ratón transgénico el incremento de la expresión del gen Rarb inducido por la oncoproteína E7 se presenta en ausencia de estrógeno y previo al desarrollo del tumor.

Se ha demostrado que la marca represiva H3K27me3 está disminuida en las células que expresan a E7 del VPH16 y en lesiones cervicales positivas al VPH16 debido a la inducción transcripcional de la desmetilasa específica de lisina 27 de la histona 3 (KDM6B) (McLaughlin-Drubin & Munger, 2013). Además, la oncoproteína E7 del VPH16 induce la sobreexpresión del gen supresor de tumores p16INK4A a través de la activación de la KDM6B, el cual es necesario para la supervivencia de las líneas celulares de carcinoma cervical (McLaughlin-Drubin et al, 2011; McLaughlin-Drubin et al, 2013); lo anterior indica que el RARB no es el único

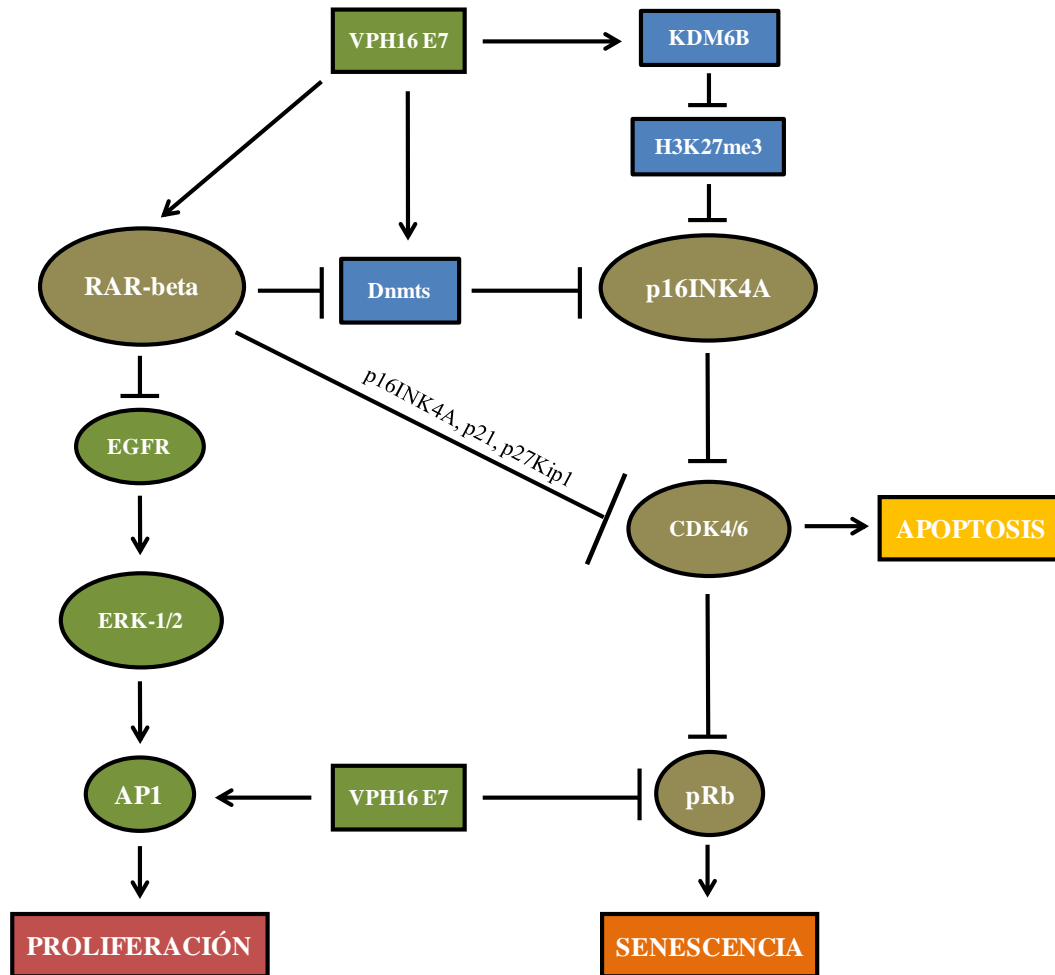
gen supresor de tumores activado por E7. El DZNep inhibe la marca represiva H3K27me3 e induce la reactivación de genes no silenciados por metilación en las islas CpG del promotor (Miranda et al, 2009). Es importante resaltar que el promotor del RARB está hipometilado en las células C33-A (Zhang et al, 2007); interesantemente, este gen no fue inducido por el DZNep en las células C33-A control ni en las células C33-A que expresan a E7; sin embargo, los niveles de expresión del ARNm del RARB disminuyeron ligeramente en estas células (resultados no mostrados). Una posible explicación para la reducción observada del RARB en presencia del DZNep podría estar relacionada a la inhibición de la marca activa de histonas H3K4me3 (Miranda et al, 2009). Por lo tanto, es tentador a especular que el tratamiento con el DZNep induce un represor del RARB y enmascara el resultado esperado; pero aún es posible que la sobreexpresión del RARB por E7 pueda estar relacionada a la modificación de marcas de metilación de las histonas. En apoyo a lo anterior, se sabe que la marca H3K27me3 es catalizada por EZH2 como parte del complejo 2 represivo polycomb (PRC2; del inglés polycomb repressive complex 2), y estos complejos represivos son reducidos en células que expresan a la oncoproteína E7 del VPH16 (McLaughlin-Drubin et al, 2008). Otra posible vía de activación de la sobreexpresión del RARB en células que expresan a E7 podría ser similar a la inducida por la oncoproteína E1A del Adenovirus. Esta oncoproteína es homóloga estructuralmente y funcionalmente a la oncoproteína E7 (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009a), y es un cofactor para la activación del promotor del RARB a través de la interacción directa con la proteína RAR-beta (Folkers & van der Saag, 1995; Kruyt et al, 1993). De acuerdo a la homología estructural entre las oncoproteínas E1A y E7, la oncoproteína E1A también induce la expresión de p16INK4A en fibroblastos primarios de humano (Mroz et al, 2008). Por lo tanto, es posible que tanto p16INK4A como el RARB puedan tener funciones oncogénicas en la carcinogénesis. En acuerdo a lo anterior, fue publicado que la presencia del RARB en el compartimiento estromal es esencial para el crecimiento del carcinoma mamario (Liu et al, 2011), y que la inactivación del gen RARB inhibe la tumorigénesis mamaria inducida por Wnt1 debido a la supresión de las transiciones epitelial-mesenquimal (Liu & Giguere, 2014). Por lo tanto, estos

hallazgos sugieren que la expresión del RARB podría ser esencial en la carcinogénesis cervical temprana.

El incremento observado de la expresión del RARB en células que expresan a E7 podría ser requerido para bloquear la actividad de las Dnmts (Burgers et al, 2007; Lim et al, 2011) en la carcinogénesis temprana (Esquema 3), y para favorecer la expresión del gen p16INK4A (McLaughlin-Drubin et al, 2011); sin embargo, la expresión de la oncoproteína E7 del VPH16 puede también incrementar la actividad de las Dnmts (Burgers et al, 2007). Fue reportado que el RARB (activado por ATRA o RA) induce senescencia celular a través de la activación de p21 y p16INK4A (Lim et al, 2011). Si bien es cierto que E7 del VPH16 activa a p16INK4A (McLaughlin-Drubin et al, 2011) y la expresión del RARB (en este trabajo), no hay inducción de senescencia debido a que E7 simultáneamente inhibe la forma activa e hipofosforilada de la proteína pRb (Boyer et al, 1996), la cual es un mediador clave de la senescencia celular inducida por p16INK4A (Ohtani et al, 2004). A demás, la expresión de p16INK4A es necesaria para la supervivencia de las células que expresan a E7 del VPH y esta actividad oncogénica de p16INK4A es dependiente de la inhibición de cdks (McLaughlin-Drubin et al, 2013). A pesar de que el RARB inhibe la progresión del ciclo celular debido a que incrementa el porcentaje proteolítico de la ciclina D1 y de la expresión de los inhibidores de cdks tales como a p21, p27Kip1 y p16INK4A (Li et al, 2004; Lim et al, 2011; Mongan & Gudas, 2007; Park et al, 2011), es muy bien conocido que la oncoproteína E7 del VPH16 puede anular las actividades de los inhibidores de cdks al bloquear sus funciones (Jones et al, 1997; Shin et al, 2009; Zerfass-Thome et al, 1996). Otra importante actividad supresora de tumor del RARB es mediada por la inhibición del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR, del inglés epidermal growth factor receptor) (Song et al, 2005), con una subsecuente disminución de la fosforilación de ERK-1/2 y de la actividad de AP1 (Xu, 2007). Interesantemente, E7 del VPH16 evita la inhibición de AP1 por la transactivación directa “corriente abajo” de la familia de factores de transcripción de AP1 (Antinore et al, 1996). Por lo tanto, E7 puede evitar las consecuencias desfavorables derivadas de la activación de ambos genes supresores de tumor p16INK4A y RARB en vías similares (Esquema 3). Finalmente, existe la



posibilidad como fue descrito para p16INK4A (McLaughlin-Drubin et al, 2013), el gen RARB puede tener alguna función desconocida que le proporciona una ventaja al VPH en la infección temprana.



**Esquema 3. Representación esquemática de la importancia biológica de la sobreexpresión del supresor de tumores RARB inducido por la oncoproteína E7 del VPH16.** La oncoproteína E7 de VPH16 sobreexpresa a p16INK4A a través de la inducción de la enzima KDM6B, la cual remueve los grupos metilos de la marca H3K27m3, induciendo senescencia e inhibición de la apoptosis dependiente de las cdk. La sobreexpresión de la proteína RAR-beta por la oncoproteína E7 del VPH16

podría inhibir la actividad de las Dnmts y causar hipometilación del promotor del gen p16INK4A. Además, el supresor de tumores RARB podría también incrementar el nivel de los inhibidores de cdk y bloquear al EGFR causando una disminución de la función de AP1. Sin embargo, el oncogén E7 del VPH16 podría evitar las funciones antiproliferativas del RARB por una activación directa de la familia de factores de transcripción de AP1. Leer la discusión para más detalles y referencias.

## **CONCLUSIONES**

En conclusión, en este trabajo demostramos que la oncoproteína E7 del VPH16 activa la expresión del gen supresor de tumores RARB *in vitro* bajo ciertas características de las células y en el tejido cervical del ratón transgénico joven K14E7, como una respuesta temprana y previa al desarrollo del cáncer cervical, como fue observado en lesiones benignas (Abu et al, 2008). Este resultado puede ser relevante tanto para el diagnóstico temprano como para la prevención de la progresión de la enfermedad. El mecanismo involucrado en la sobreexpresión del RARB por la oncoproteína E7 del VPH16 requiere de otros estudios.

Los resultados obtenidos de esta tesis fueron publicados en la revista *Molecular and Cellular Biochemistry* (Anexo).

## **PERSPECTIVAS**

De los resultados experimentales obtenidos en esta Tesis de Doctorado, los cuales son apoyados por trabajos publicados que se mencionan en la sección de Discusión, surgen nuevas preguntas que permitirían profundizar y ampliar el conocimiento del tema como por ejemplo:

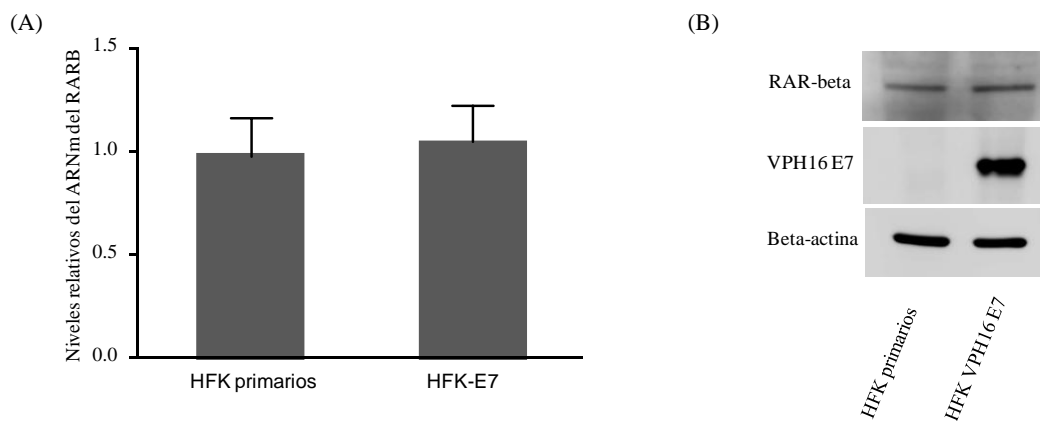
-Elucidar el mecanismo molecular implicado en la activación del promotor del gen RARB por la oncoproteína E7 del VPH16; la técnica de inmunoprecipitación de

la cromatina mostrará las marcas epigenéticas de histonas inducidas por E7 del VPH16 involucradas en la activación del promotor del gen RARB.

-Investigar la función de la sobreexpresión del RARB en etapas previas al inicio del desarrollo del cáncer cervical.

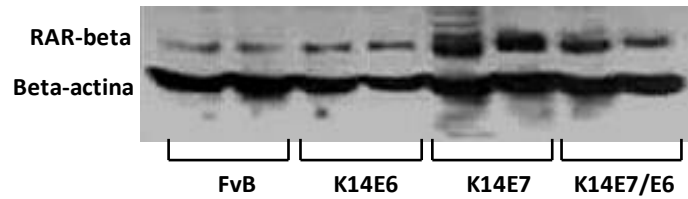
-Evaluar si los ratones transgénicos K14E7 presentan mutaciones en la secuencia del gen TP53.

-Evaluar la expresión del gen RARB en biopsias de tejido de mujeres infectadas por el VPH16, lo cual serviría de apoyo en el diagnóstico del cáncer cervical, así como para la prevención del desarrollo de esta enfermedad.



**Figura suplementaria 1. Niveles de expresión del gen RARB en HFK primarios y en HFK transformados con E7 del VPH16.** Los HFK primarios y HFK transformados con E7 fueron establemente transfectados como es indicado. (A) Niveles de expresión del ARNm del RARB en HFK primarios y en HFK transformados con E7 en los pasajes 5 analizados por RT-qPCR. El gen beta-2-microglobulina (B2M) fue usado como control de la expresión constitutiva. Cada gráfica representa el promedio de 3 experimentos independientes y las barras representan el valor  $\pm$  de la desviación estándar. (B) Análisis por Western blot de los niveles de expresión de la proteína RAR-beta, el cual muestra un ligero aumento de 1.54 veces en las células HFK transformados con E7 comparado con las células HFK primarios. Los niveles de la proteína RAR-beta fueron analizados en el pasaje 7. La

proteína beta-actina fue usada como control y la misma cantidad de proteína fue cargada en el gel SDS-PAGE.



**Figura suplementaria 2. La proteína RAR-beta está incrementada en el tejido cervical de ratones transgénicos K14E7.** Análisis de Western blot para la proteína RAR-beta en el tejido cervical indicado y normalizado con beta-actina (Se muestran dos ratones de 1.5 meses de edad de cada grupo).

**TABLAS SUPLEMENTARIAS**

**Tabla suplementaria 1.** Principales factores de riesgo asociados con la infección del VPH de alto riesgo en el desarrollo del Cáncer Cervical.

**Actividad Sexual:** Los VPHs se transmiten comúnmente durante las *relaciones sexuales* (Stanley, 2010) y se estima que más del 50% de las mujeres sexualmente activas son infectadas con uno o varios tipos de VPH en algún momento de su vida. Las mujeres que tienen relaciones sexuales con *múltiples compañeros* durante su vida, adquieren la infección del VPH en un 20% más con respecto al 7% en mujeres con un solo compañero sexual (Stone et al, 2002). Después de adquirir la infección viral, ésta progresa por etapas causando una severa *neoplasia intraepitelial cervical* (de NIC1 a NIC3) hasta la formación de *cáncer invasivo* (Van Doorslaer & Burk, 2010). Sin embargo, en cada etapa existe la posibilidad de que se elimine el virus o haya una *regresión de la lesión*; incluso aproximadamente el 45% de las mujeres en los primeros 36 meses de haber iniciado su actividad sexual adquieren la infección, pero la mayoría de las infecciones pueden ser eliminadas a los 2 años. Estos hallazgos son consistentes con los resultados que indican que más del 90% de las *nuevas infecciones* con VPH de alto riesgo *podrían no ser de significancia clínica* (Van Doorslaer & Burk, 2010).

**Multiparidad:** Otro factor de riesgo para el cáncer cervical es la *multiparidad* debido a que mantiene la *zona de transformación* (sitio de origen de la mayoría de las displasias cervicales y carcinomas) en el *exocérvix* por muchos años (Autier et al, 1996), lo cual facilita la *exposición directa al VPH de alto riesgo*.

**Anticonceptivos Orales:** El cáncer cervical también se incrementa con el uso de *anticonceptivos orales*; por ejemplo las mujeres que consumieron anticonceptivos orales por más de 5 años tienen un *riesgo 3 veces* más de desarrollar cáncer cervical comparadas con las que no los consumieron (Gariglio et al, 2009; Marks et al, 2011). En apoyo de este factor de riesgo, fue demostrado en *ratones transgénicos* (los cuales expresaban las *oncoproteínas E6 y E7 del VPH16* en las células del epitelio basal) el desarrollo de cáncer cervical con una dependencia de exposición a *bajas dosis de estrógeno* (Arbeit et al, 1996).

**Tabla suplementaria 2.** Primers usados en este estudio.

*Gen	Primer	Secuencia (5'-3')
RARA	sentido	CTCTCCACCAAGTGCATCATTAAAG
	antisentido	CAGCCTTGAGGAGGGTGATC
PPARG	sentido	CAGGCCGAGAAGGAGAAGCT
	antisentido	GATCGCCCTCGCCTTTG
NR2F2	sentido	CATAC GGATCTTCCAAGAGCAAGT
	antisentido	CATCTGAGGTGAACAGGACTATGG
RARB	sentido	CTCACAG AGAAGATCCGAAAAGC
	antisentido	AATGCACTTGGTGGCCAGTT
TP53	sentido	GATGCTGTCCCCGGACGA
	antisentido	AGGGGCCCGCCGGTGTAG
B2M	sentido	ACCCCACTGAAAAAGATGAG
	antisentido	ATGATGCTGCTTACATGTCTCG
VPH16 E6	sentido	CACAGGAGCGACCCAGAAAG
	antisentido	TATATAC TATGCATAAATCCCGAAAAGC
VPH16 E7	sentido	ATGGAGATACACCTACATTGCATGA
	antisentido	AATGGGCTCTGTCCGGTTCT
Rarb	sentido	ACAAGTCATCGGGCTACCAC
	antisentido	ACTGGCATCGGTTCCCTAGTG
Gapdh	sentido	CATCTCCTCCCGTTCTGCC
	antisentido	GTGGTGCAGGATGCATTGC

\*Símbolo oficial de los genes de acuerdo a HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC).

Los símbolos de los genes con letras mayúsculas corresponden a humano y los que están con minúsculas a ratón.

**REFERENCIAS**

**Abreu AL**, Souza RP, Gimenes F, Consolaro ME (2012) A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virol J* **9**: 262

**Abu J**, Batuwangala M, Symonds P (2008) Expression of RAR beta2 gene by real-time RT-PCR: differential expression in normal subjects compared to cervical cancer patients normalised against GAPDH as a housekeeping gene. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **140**(2): 295-296

**Antinore MJ**, Birrer MJ, Patel D, Nader L, McCance DJ (1996) The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J* **15**(8): 1950-1960

**Appleby P**, Beral V, Berrington de Gonzalez A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, Green J, Peto J, Plummer M, Sweetland S (2006) Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* **118**(6): 1481-1495

**Arany I**, Ember IA, Tying SK (2003) All-trans-retinoic acid activates caspase-1 in a dose-dependent manner in cervical squamous carcinoma cells. *Anticancer Res* **23**(1A): 471-473

**Arbeit JM**, Howley PM, Hanahan D (1996) Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(7): 2930-2935

**Arbyn M**, Castellsague X, de Sanjose S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, Ferlay J (2011) Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol* **22**(12): 2675-2686

**Autier P**, Coibion M, Huet F, Grivegne AR (1996) Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Br J Cancer* **74**(3): 488-490

**Bartsch D**, Boye B, Baust C, zur Hausen H, Schwarz E (1992) Retinoic acid-mediated repression of human papillomavirus 18 transcription and different ligand regulation of the retinoic acid receptor beta gene in non-tumorigenic and tumorigenic HeLa hybrid cells. *EMBO J* **11**(6): 2283-2291

**Bastien J**, Rochette-Egly C (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* **328**: 1-16

**Behbakht K**, DeGeest K, Turyk ME, Wilbanks GD (1996) All-trans-retinoic acid inhibits the proliferation of cell lines derived from human cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* **61**(1): 31-39

**Benbrook DM**, Shen-Gunther J, Nunez ER, Dynlacht JR (1997) Differential retinoic acid radiosensitization of cervical carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* **3**(6): 939-945

**Berlin Grace VM**, Niranjali Devaraj S, Radhakrishnan Pillai M, Devaraj H (2006) HPV-induced carcinogenesis of the uterine cervix is associated with reduced serum ATRA level. *Gynecol Oncol* **103**(1): 113-119

**Bernard HU**, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* **401**(1): 70-79

**Bernard X**, Robinson P, Nomine Y, Masson M, Charbonnier S, Ramirez-Ramos JR, Deryckere F, Trave G, Orfanoudakis G (2011) Proteasomal degradation of p53 by human papillomavirus E6 oncoprotein relies on the structural integrity of p53 core domain. *PLoS One* **6**(10): e25981



**Bernstein A**, Harris B (1984) The relationship of dietary and serum vitamin A to the occurrence of cervical intraepithelial neoplasia in sexually active women. *Am J Obstet Gynecol* **148**(3): 309-312

**Best SR**, Niparko KJ, Pai SI (2012) Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers. *Otolaryngol Clin North Am* **45**(4): 807-822

**Blakaj DM**, Fernandez-Fuentes N, Chen Z, Hegde R, Fiser A, Burk RD, Brenowitz M (2009) Evolutionary and biophysical relationships among the papillomavirus E2 proteins. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**: 900-917

**Bodily JM**, Mehta KP, Laimins LA (2011) Human papillomavirus E7 enhances hypoxia-inducible factor 1-mediated transcription by inhibiting binding of histone deacetylases. *Cancer Res* **71**(3): 1187-1195

**Bouvard V**, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglianò V (2009) A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol* **10**(4): 321-322

**Boyer SN**, Wazer DE, Band V (1996) E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* **56**(20): 4620-4624

**Brake T**, Lambert PF (2005) Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(7): 2490-2495

**Brehm A**, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T (1999) The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J* **18**(9): 2449-2458

**Buck CB**, Cheng N, Thompson CD, Lowy DR, Steven AC, Schiller JT, Trus BL (2008) Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol* **82**(11): 5190-5197

**Buck CB**, Thompson CD, Pang YY, Lowy DR, Schiller JT (2005) Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol* **79**(5): 2839-2846

**Burgers WA**, Blanchon L, Pradhan S, de Launoit Y, Kouzarides T, Fuks F (2007) Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene* **26**(11): 1650-1655

**Bushue N**, Wan YJ (2010) Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* **62**(13): 1285-1298

**Choi CH**, Lee KM, Choi JJ, Kim TJ, Kim WY, Lee JW, Lee SJ, Lee JH, Bae DS, Kim BG (2007) Hypermethylation and loss of heterozygosity of tumor suppressor genes on chromosome 3p in cervical cancer. *Cancer Lett* **255**(1): 26-33

**Darwiche N**, Celli G, De Luca LM (1994) Specificity of retinoid receptor gene expression in mouse cervical epithelia. *Endocrinology* **134**(5): 2018-2025

**De-Castro Arce J**, Soto U, van Riggelen J, Schwarz E, zur Hausen H, Rosl F (2004) Ectopic expression of nonliganded retinoic acid receptor beta abrogates AP-1 activity by selective degradation of c-Jun in cervical carcinoma cells. *J Biol Chem* **279**(44): 45408-45416

**de Villiers EM**, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**(1): 17-27

**Diaz-Chavez J**, Hernandez-Pando R, Lambert PF, Gariglio P (2008) Down-regulation of transforming growth factor-beta type II receptor (TGF-betaRII) protein and mRNA expression in cervical cancer. *Mol Cancer* **7**: 3

**Doorbar J**, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**(6338): 824-827

**Evander M**, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA (1997) Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* **71**(3): 2449-2456

**Faluhelyi Z**, Rodler I, Csejtei A, Tying SK, Ember IA, Arany I (2004) All-trans retinoic acid (ATRA) suppresses transcription of human papillomavirus type 16 (HPV16) in a dose-dependent manner. *Anticancer Res* **24**(2B): 807-809

**Folkers GE**, van der Saag PT (1995) Adenovirus E1A functions as a cofactor for retinoic acid receptor beta (RAR beta) through direct interaction with RAR beta. *Mol Cell Biol* **15**(11): 5868-5878

**Franco EL**, Harper DM (2005) Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine* **23**(17-18): 2388-2394

**Freed-Pastor WA**, Prives C (2012) Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev* **26**(12): 1268-1286

**Gamboa-Pinto AJ**, Rock CL, Ferruzzi MG, Schowinsky AB, Schwartz SJ (1998) Cervical tissue and plasma concentrations of alpha-carotene and beta-carotene in women are correlated. *J Nutr* **128**(11): 1933-1936

**Garcia-Closas R**, Castellsague X, Bosch X, Gonzalez CA (2005) The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer* **117**(4): 629-637

**Gariglio P**, Gutierrez J, Cortes E, Vazquez J (2009) The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. *Arch Med Res* **40**(6): 449-465

**Geisen C**, Denk C, Gremm B, Baust C, Karger A, Bollag W, Schwarz E (1997) High-level expression of the retinoic acid receptor beta gene in normal cells of the uterine cervix is regulated by the retinoic acid receptor alpha and is abnormally down-regulated in cervical carcinoma cells. *Cancer Res* **57**(8): 1460-1467

**Geisen C**, Denk C, Kupper JH, Schwarz E (2000) Growth inhibition of cervical cancer cells by the human retinoic acid receptor beta gene. *Int J Cancer* **85**(2): 289-295

**Ghosh C**, Baker JA, Moysich KB, Rivera R, Brasure JR, McCann SE (2008) Dietary intakes of selected nutrients and food groups and risk of cervical cancer. *Nutr Cancer* **60**(3): 331-341

**Gillespie RF**, Gudas LJ (2007) Retinoic acid receptor isotype specificity in F9 teratocarcinoma stem cells results from the differential recruitment of coregulators to retinoic response elements. *J Biol Chem* **282**(46): 33421-33434

**Giroglou T**, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M (2001) Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* **75**(3): 1565-1570

**Giuliano AR**, Papenfuss M, Nour M, Canfield LM, Schneider A, Hatch K (1997) Antioxidant nutrients: associations with persistent human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **6**(11): 917-923

**Giuliano AR**, Siegel EM, Roe DJ, Ferreira S, Baggio ML, Galan L, Duarte-Franco E, Villa LL, Rohan TE, Marshall JR, Franco EL (2003) Dietary intake and risk of persistent human papillomavirus (HPV) infection: the Ludwig-McGill HPV Natural History Study. *J Infect Dis* **188**(10): 1508-1516

**Goodman MT**, Shvetsov YB, McDuffie K, Wilkens LR, Zhu X, Franke AA, Bertram CC, Kessel B, Bernice M, Sunoo C, Ning L, Easa D, Killeen J, Kamemoto L, Hernandez BY (2007) Hawaii cohort study of serum micronutrient concentrations and clearance of incident oncogenic human papillomavirus infection of the cervix. *Cancer Res* **67**(12): 5987-5996

**Guo JM**, Xiao BX, Kang GZ, Liu DH, Chen H, Zhang S, Zhang XN (2006) Suppression of telomerase activity and arrest at G1 phase in human cervical cancer HeLa cells by all-trans retinoic acid. *Int J Gynecol Cancer* **16**(1): 341-346

**Halbert CL**, Demers GW, Galloway DA (1992) The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol* **66**(4): 2125-2134

**Hanahan D**, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5): 646-674

**Hayashi K**, Yokozaki H, Naka K, Yasui W, Lotan R, Tahara E (2001) Overexpression of retinoic acid receptor beta induces growth arrest and apoptosis in oral cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* **92**(1): 42-50

**Helm CW**, Lorenz DJ, Meyer NJ, Rising WW, Wulff JL (2013) Retinoids for preventing the progression of cervical intra-epithelial neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev* **6**: CD003296

**Hellner K**, Mar J, Fang F, Quackenbush J, Munger K (2009) HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. *Virology* **391**(1): 57-63

**Henken FE**, Wilting SM, Overmeer RM, van Rietschoten JG, Nygren AO, Errami A, Schouten JP, Meijer CJ, Snijders PJ, Steenbergen RD (2007) Sequential gene

promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. *Br J Cancer* **97**(10): 1457-1464

**Herber R**, Liem A, Pitot H, Lambert PF (1996) Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J Virol* **70**(3): 1873-1881

**Heyman RA**, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C (1992) 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* **68**(2): 397-406

**Higdon JV**, Delage B, Williams DE, Dashwood RH (2007) Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacol Res* **55**(3): 224-236

**Holland D**, Hoppe-Seyler K, Schuller B, Lohrey C, Maroldt J, Durst M, Hoppe-Seyler F (2008) Activation of the enhancer of zeste homologue 2 gene by the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Cancer Res* **68**(23): 9964-9972

**Hyland PL**, McDade SS, McCloskey R, Dickson GJ, Arthur K, McCance DJ, Patel D (2011) Evidence for alteration of EZH2, BMI1, and KDM6A and epigenetic reprogramming in human papillomavirus type 16 E6/E7-expressing keratinocytes. *J Virol* **85**(21): 10999-11006

**Ibeanu OA** (2011) Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biol Ther* **11**(3): 295-306

**Ivanova T**, Petrenko A, Gritsko T, Vinokourova S, Eshilev E, Kobzeva V, Kisseljov F, Kisseljova N (2002) Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta 2 gene in cervical cancer. *BMC Cancer* **2**: 4

**James SY**, Lin F, Kolluri SK, Dawson MI, Zhang XK (2003) Regulation of retinoic acid receptor beta expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands in cancer cells. *Cancer Res* **63**(13): 3531-3538

**Jones DL**, Alani RM, Munger K (1997) The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* **11**(16): 2101-2111

**Kines RC**, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2009) The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(48): 20458-20463

**Klingelhutz AJ**, Roman A (2012) Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology* **424**(2): 77-98

**Korzeniewski N**, Spardy N, Duensing A, Duensing S (2011) Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses. *Cancer Lett* **305**(2): 113-122

**Kruyt FA**, Folkers GE, Walhout AJ, van der Leede BJ, van der Saag PT (1993) E1A functions as a coactivator of retinoic acid-dependent retinoic acid receptor-beta 2 promoter activation. *Mol Endocrinol* **7**(4): 604-615

**Kruyt FA**, van den Brink CE, Defize LH, Donath MJ, Kastner P, Kruijer W, Chambon P, van der Saag PT (1991) Transcriptional regulation of retinoic acid receptor beta in retinoic acid-sensitive and -resistant P19 embryocarcinoma cells. *Mech Dev* **33**(3): 171-178

**Kuzmichev A**, Margueron R, Vaquero A, Preissner TS, Scher M, Kirmizis A, Ouyang X, Brockdorff N, Abate-Shen C, Farnham P, Reinberg D (2005)

Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(6): 1859-1864

**Lagunas-Martinez A**, Madrid-Marina V, Gariglio P (2010) Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. *Biochim Biophys Acta* **1805**(1): 6-16

**Laurson J**, Khan S, Chung R, Cross K, Raj K (2010) Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. *Carcinogenesis* **31**(5): 918-926

**Li J**, Yang L, Gaur S, Zhang K, Wu X, Yuan YC, Li H, Hu S, Weng Y, Yen Y (2014) Mutants TP53 p.R273H and p.R273C but not p.R273G enhance cancer cell malignancy. *Hum Mutat* **35**(5): 575-584

**Li N**, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM (2011) Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer* **128**(4): 927-935

**Li R**, Faria TN, Boehm M, Nabel EG, Gudas LJ (2004) Retinoic acid causes cell growth arrest and an increase in p27 in F9 wild type but not in F9 retinoic acid receptor beta2 knockout cells. *Exp Cell Res* **294**(1): 290-300

**Liaudet-Coopman ED**, Berchem GJ, Wellstein A (1997) In vivo inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis by retinoic acid in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **3**(2): 179-184

**Lim JS**, Park SH, Jang KL (2011) All-trans retinoic acid induces cellular senescence by up-regulating levels of p16 and p21 via promoter hypomethylation. *Biochem Biophys Res Commun* **412**(3): 500-505



**Lin B**, Chen GQ, Xiao D, Kolluri SK, Cao X, Su H, Zhang XK (2000) Orphan receptor COUP-TF is required for induction of retinoic acid receptor beta, growth inhibition, and apoptosis by retinoic acid in cancer cells. *Mol Cell Biol* **20**(3): 957-970

**Liu X**, Giguere V (2014) Inactivation of RARbeta inhibits Wnt1-induced mammary tumorigenesis by suppressing epithelial-mesenchymal transitions. *Nucl Recept Signal* **12**: e004

**Liu X**, Nugoli M, Laferriere J, Saleh SM, Rodrigue-Gervais IG, Saleh M, Park M, Hallett MT, Muller WJ, Giguere V (2011) Stromal retinoic acid receptor beta promotes mammary gland tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(2): 774-779

**Longworth MS**, Laimins LA (2004) The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* **78**(7): 3533-3541

**Marks M**, Gravitt PE, Gupta SB, Liaw KL, Kim E, Tadesse A, Phongnarisorn C, Wootipoom V, Yuenyao P, Vipupinyo C, Rugsao S, Sriplienchan S, Celentano DD (2011) The association of hormonal contraceptive use and HPV prevalence. *Int J Cancer* **128**(12): 2962-2970

**Maufort JP**, Williams SM, Pitot HC, Lambert PF (2007) Human papillomavirus 16 E5 oncogene contributes to two stages of skin carcinogenesis. *Cancer Res* **67**(13): 6106-6112

**McLaughlin-Drubin ME**, Crum CP, Munger K (2011) Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(5): 2130-2135

**McLaughlin-Drubin ME**, Huh KW, Munger K (2008) Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. *J Virol* **82**(17): 8695-8705

**McLaughlin-Drubin ME**, Meyers J, Munger K (2012) Cancer associated human papillomaviruses. *Curr Opin Virol* **2**(4): 459-466

**McLaughlin-Drubin ME**, Munger K (2009a) The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* **384**(2): 335-344

**McLaughlin-Drubin ME**, Munger K (2009b) Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res* **143**(2): 195-208

**McLaughlin-Drubin ME**, Munger K (2013) Biochemical and functional interactions of human papillomavirus proteins with polycomb group proteins. *Viruses* **5**(5): 1231-1249

**McLaughlin-Drubin ME**, Park D, Munger K (2013) Tumor suppressor p16INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(40): 16175-16180

**Mesri EA**, Feitelson MA, Munger K (2014) Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe* **15**(3): 266-282

**Miranda TB**, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK, Marquez VE, Jones PA (2009) DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther* **8**(6): 1579-1588

**Mongan NP**, Gudas LJ (2007) Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. *Differentiation* **75**(9): 853-870

**Moody CA**, Laimins LA (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* **10**(8): 550-560

**Mroz EA**, Baird AH, Michaud WA, Rocco JW (2008) COOH-terminal binding protein regulates expression of the p16INK4A tumor suppressor and senescence in primary human cells. *Cancer Res* **68**(15): 6049-6053

**Munger K**, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K (2004) Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* **78**(21): 11451-11460

**Myga-Nowak M**, Pacholska-Bogalska J, Kwasniewski W, Kwasniewska A, Gozdzicka-Jozefiak A (2011) Proliferation of cells and expression of RARs, RXRs and HPV viral E6 and E7 proteins in cervical cancer cell lines after treatment with ATRA. *Ann Agric Environ Med* **18**(1): 145-150

**Narayan G**, Arias-Pulido H, Koul S, Vargas H, Zhang FF, Vilella J, Schneider A, Terry MB, Mansukhani M, Murty VV (2003) Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. *Mol Cancer* **2**: 24

**Narayanan BA**, Holladay EB, Nixon DW, Mauro CT (1998) The effect of all-trans and 9-cis retinoic acid on the steady state level of HPV16 E6/E7 mRNA and cell cycle in cervical carcinoma cells. *Life Sci* **63**(7): 565-573

**Nguyen CL**, Eichwald C, Nibert ML, Munger K (2007) Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component gamma-tubulin. *J Virol* **81**(24): 13533-13543

**Ohtani N**, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E (2004) The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest* **51**(3-4): 146-153

**Ojesina AI**, Lichtenstein L, Freeman SS, Peadarallu CS, Imaz-Rosshandler I, Pugh TJ, Cherniack AD, Ambrogio L, Cibulskis K, Bertelsen B, Romero-Cordoba S, Trevino V, Vazquez-Santillan K, Guadarrama AS, Wright AA, Rosenberg MW, Duke F, Kaplan B, Wang R, Nickerson E, Walline HM, Lawrence MS, Stewart C, Carter SL, McKenna A, Rodriguez-Sanchez IP, Espinosa-Castilla M, Woie K, Bjorge L, Wik E, Halle MK, Hoivik EA, Krakstad C, Gabino NB, Gomez-Macias GS, Valdez-Chapa LD, Garza-Rodriguez ML, Maytorena G, Vazquez J, Rodea C, Cravioto A, Cortes ML, Greulich H, Crum CP, Neuberg DS, Hidalgo-Miranda A, Escareno CR, Akslen LA, Carey TE, Vintermyr OK, Gabriel SB, Barrera-Saldana HA, Melendez-Zajgla J, Getz G, Salvesen HB, Meyerson M (2014) Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature* **506**(7488): 371-375

**Oridate N**, Lotan D, Mitchell MF, Hong WK, Lotan R (1995) Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in cervical carcinoma cells by retinoids: implications for chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl* **23**: 80-86

**Palan PR**, Chang CJ, Mikhail MS, Ho GY, Basu J, Romney SL (1998) Plasma concentrations of micronutrients during a nine-month clinical trial of beta-carotene in women with precursor cervical cancer lesions. *Nutr Cancer* **30**(1): 46-52

**Park SH**, Lim JS, Jang KL (2011) All-trans retinoic acid induces cellular senescence via upregulation of p16, p21, and p27. *Cancer Lett* **310**(2): 232-239

**Reshkin SJ**, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M, Alunni-Fabbroni M, Casavola V, Tommasino M (2000) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an

essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J* **14**(14): 2185-2197

**Ribeiro MP**, Santos AE, Custodio JB (2014) Interplay between estrogen and retinoid signaling in breast cancer--current and future perspectives. *Cancer Lett* **353**(1): 17-24

**Rousseau C**, Pettersson F, Couture MC, Paquin A, Galipeau J, Mader S, Miller WH, Jr. (2003) The N-terminal of the estrogen receptor (ERalpha) mediates transcriptional cross-talk with the retinoic acid receptor in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **86**(1): 1-14

**Ruffin MT**, Bailey JM, Normolle DP, Michael CW, Bieniasz ME, Kmak DC, Unger ER, Brenner DE (2004) Low-dose topical delivery of all-trans retinoic acid for cervical intraepithelial neoplasia II and III. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**(12): 2148-2152

**Scheffner M**, Munger K, Byrne JC, Howley PM (1991) The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13): 5523-5527

**Scheffner M**, Takahashi T, Huibregtse JM, Minna JD, Howley PM (1992) Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins. *J Virol* **66**(8): 5100-5105

**Scheffner M**, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**(6): 1129-1136

**Sedjo RL**, Roe DJ, Abrahamsen M, Harris RB, Craft N, Baldwin S, Giuliano AR (2002) Vitamin A, carotenoids, and risk of persistent oncogenic human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**(9): 876-884

**Shin MK**, Balsitis S, Brake T, Lambert PF (2009) Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21Cip1 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res* **69**(14): 5656-5663

**Si SP**, Lee X, Tsou HC, Buchsbaum R, Tibaduiza E, Peacocke M (1996) RAR beta 2-mediated growth inhibition in HeLa cells. *Exp Cell Res* **223**(1): 102-111

**Song S**, Lippman SM, Zou Y, Ye X, Ajani JA, Xu XC (2005) Induction of cyclooxygenase-2 by benzo[a]pyrene diol epoxide through inhibition of retinoic acid receptor-beta 2 expression. *Oncogene* **24**(56): 8268-8276

**Stanley M** (2010) Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol* **117**(2 Suppl): S5-10

**Stone KM**, Karem KL, Sternberg MR, McQuillan GM, Poon AD, Unger ER, Reeves WC (2002) Seroprevalence of human papillomavirus type 16 infection in the United States. *J Infect Dis* **186**(10): 1396-1402

**Surwit EA**, Graham V, Droegemueller W, Alberts D, Chvapil M, Dorr RT, Davis JR, Meyskens FL, Jr. (1982) Evaluation of topically applied trans-retinoic acid in the treatment of cervical intraepithelial lesions. *Am J Obstet Gynecol* **143**(7): 821-823

**Talbert-Slagle K**, DiMaio D (2009) The bovine papillomavirus E5 protein and the PDGF beta receptor: it takes two to tango. *Virology* **384**(2): 345-351

**Tornesello M**, Annunziata C, Buonaguro L, Losito S, Gregg S, Buonaguro FM (2014) TP53 and PIK3CA gene mutations in adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and high-grade intraepithelial neoplasia of the cervix. *J Transl Med* **12**(1): 255

**Van Doorslaer K**, Burk RD (2010) Evolution of human papillomavirus carcinogenicity. *Adv Virus Res* **77**: 41-62

**Vaughan CA**, Singh S, Windle B, Sankala HM, Graves PR, Andrew Yeudall W, Deb SP, Deb S (2012) p53 mutants induce transcription of NF-kappaB2 in H1299 cells through CBP and STAT binding on the NF-kappaB2 promoter and gain of function activity. *Arch Biochem Biophys* **518**(1): 79-88

**Vrba L**, Junk DJ, Novak P, Futscher BW (2008) p53 induces distinct epigenetic states at its direct target promoters. *BMC Genomics* **9**: 486

**Werness BA**, Levine AJ, Howley PM (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**(4951): 76-79

**Weston AD**, Blumberg B, Underhill TM (2003) Active repression by unliganded retinoid receptors in development: less is sometimes more. *J Cell Biol* **161**(2): 223-228

**White EA**, Sowa ME, Tan MJ, Jeudy S, Hayes SD, Santha S, Munger K, Harper JW, Howley PM (2012) Systematic identification of interactions between host cell proteins and E7 oncoproteins from diverse human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(5): E260-267

**Wilailak S**, Dangprasert S, Srisupundit S (2003) Phase I clinical trial of chemoimmunotherapy in combination with radiotherapy in stage IIIB cervical cancer patients. *Int J Gynecol Cancer* **13**(5): 652-656

**Xu L**, Glass CK, Rosenfeld MG (1999a) Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* **9**(2): 140-147

**Xu XC** (2007) Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor-beta in cancer. *Cancer Lett* **253**(1): 14-24

**Xu XC**, Mitchell MF, Silva E, Jetten A, Lotan R (1999b) Decreased expression of retinoic acid receptors, transforming growth factor beta, involucrin, and cornifin in cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res* **5**(6): 1503-1508

**Youssef EM**, Lotan D, Issa JP, Wakasa K, Fan YH, Mao L, Hassan K, Feng L, Lee JJ, Lippman SM, Hong WK, Lotan R (2004) Hypermethylation of the retinoic acid receptor-beta(2) gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res* **10**(5): 1733-1742

**Zerfass-Thome K**, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P (1996) Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* **13**(11): 2323-2330

**Zhang B**, Laribee RN, Klemsz MJ, Roman A (2004) Human papillomavirus type 16 E7 protein increases acetylation of histone H3 in human foreskin keratinocytes. *Virology* **329**(1): 189-198

**Zhang X**, Dai B, Zhang B, Wang Z (2012) Vitamin A and risk of cervical cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol* **124**(2): 366-373

**Zhang XK**, Hoffmann B, Tran PB, Graupner G, Pfahl M (1992) Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature* **355**(6359): 441-446

**Zhang Z**, Joh K, Yatsuki H, Zhao W, Soejima H, Higashimoto K, Noguchi M, Yokoyama M, Iwasaka T, Mukai T (2007) Retinoic acid receptor beta2 is epigenetically silenced either by DNA methylation or repressive histone modifications at the promoter in cervical cancer cells. *Cancer Lett* **247**(2): 318-327



**Zwerschke W**, Mazurek S, Massimi P, Banks L, Eigenbrodt E, Jansen-Durr P (1999) Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1291-1296

ANEXO

Mol Cell Biochem. 2015 Jul 15. [Epub ahead of print]

**Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein upregulates the retinoic acid receptor-beta expression in cervical cancer cell lines and K14E7 transgenic mice.**

Gutiérrez J<sup>1</sup>, García-Villa E, Ocadiz-Delgado R, Cortés-Malagón EM, Vázquez J, Roman-Rosales A, Alvarez-Rios E, Celik H, Romano MC, Üren A, Lambert PF, Gariglio P.

**Abstract**

Persistent infection with high-risk human papillomaviruses is the main etiological factor in cervical cancer (CC). The human papillomavirus type 16 (HPV16) E7 oncoprotein alters several cellular processes, regulating the expression of many genes in order to avoid cell cycle control. Retinoic acid receptor beta (RARβ) blocks cell growth, inducing differentiation and apoptosis. This tumor suppressor gene is gradually silenced in late passages of foreskin keratinocytes immortalized with HPV16 and in various tumors, including CC, mainly by epigenetic modifications. We investigated the effect of E7 oncoprotein on RARβ gene expression. We found that HPV16 E7 increases RARβ mRNA and RARβ protein expression both in vitro and in the cervix of young K14E7 transgenic mice. In E7-expressing cells, RARβ overexpression is further increased in the presence of the tumor suppressor p53 (TP53) R273C mutant. This effect does not change when either C33-A or E7-expressing C33-A cell line is treated with Trichostatin A, suggesting that E7 enhances RARβ expression independently of histone deacetylases inhibition. These findings indicate that RARβ overexpression is part of the early molecular events induced by the E7 oncoprotein.

PMID: 26173416