



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“La oncoproteína E7 VPH16 induce cambios en la
expresión de genes de la vía de señalización Hh-Gli
durante el desarrollo del cáncer en un modelo *in vivo*”**

TESIS

que presenta

M. EN C. ELOÍSA IBARRA SIERRA

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**

Directores de la tesis:

Dr. Patricio Gariglio Vidal

Dr. Alejandro García Carrancá

México, D.F. Noviembre de 2016

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 24 del departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) y en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Cotutores:

Dr. Patricio Gariglio Vidal

Dr. Alejandro García Carrancá

Asesores:

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Dr. Efraín Garrido Guerrero

Dr. Jaime García Mena

Asesor Externo

Dr. José de la Luz Díaz Chávez

Durante la realización de este trabajo, Eloísa Ibarra Sierra fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) en el periodo comprendido de agosto-2010 a agosto-2014.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme concluir una meta más en la vida.

A mis padres María y Esteban por darme la vida.

A mi hija Mariana por soportar mis ausencias aun cuando no las entendía, por ser el motor que me empuja a superarme día a día.

A Silver, Doña Tere, Doña Mary, Don Rodolfo, a todos los que me apoyaron para que esto fuera posible, les doy gracias.

A Gaby Mora por su gran ayuda con el trabajo administrativo.

A mis amigos del laboratorio, Enoc, Piccito y Toño, gracias por su ayuda.

A Wilox, Eli, Enrique y Lauro, por su apoyo y disposición

CONTENIDO	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Cáncer Cervicouterino (CaCu) y su relación con el VPH	9
1.2 Mecanismos oncogénicos de E7.....	10
1.3 Vías de señalización inducidas por E7.....	12
1.3.1 La vía de señalización de Hh y su participación en cáncer	13
1.3.2 La vía de señalización de Hh y su relación con transición epitelial mesenquimal (TEM).....	18
1.4 El ratón transgénico k14E7 como modelo de cáncer cervicouterino.....	20
II. HIPÓTESIS	21
III.OBJETIVOS	21
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	22
V. RESULTADOS	26
Capítulo I. La oncoproteína E7 induce cambios en la expresión de genes en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical	26
Capítulo II. La oncoproteína E7 induce cambios en la expresión de genes reguladores de TEM en el modelo murino K14E7	35
VI. DISCUSIÓN	45
VII. CONCLUSIÓN	52
VIII. PERSPECTIVAS	52
IX. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	54
X. ANEXOS	56
XI. REFERENCIAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La vía de señalización de hedgehog.....	16
Figura 2. Transición epitelial mesenquimal.....	19
Figura 3. Genes expresados diferencialmente en el ratón K14E7 comparado con ratones FvB/NT.....	28
Figura 4. Cuantificación de la expresión del gen E7 usando RT-qPCR en tejido cervical y piel.....	29
Figura 5. Procesos biológicos afectados en piel y cérvix de ratones transgénicos K14E7.....	31
Figura 6. Validación por RT-qPCR de genes seleccionados expresados diferencialmente en tejido cervical de ratones K14E7 comparados con FvB/NT.....	32
Figura 7. Validación por RT-qPCR de genes seleccionados expresados diferencialmente en piel de ratones K14E7 comparados con FvB/NT.....	33
Figura 8. Inmunohistoquímica de la proteína DMBT1 en tejido cervical.....	34
Figura 9. Expresión de genes componentes de la vía de señalización de Hh en ratones K14E7 y K14E7+E2 de 2 meses de edad comparado con ratones NT/FvB.....	37
Figura 10. Expresión de genes asociados a EMT inducidos por la vía de señalización de Hh en ratones K14E7 y K14E7+E2 comparados con NT/FvB de 2 meses de edad.....	39
Figura 11. Expresión de genes componentes de la vía de señalización de Hh en ratones K14E7 y K14E7+E2 de 7 meses de edad comparado con ratones NT/FvB.....	40
Figura 12. Expresión de genes asociados a EMT inducidos por la vía de señalización de Hh en ratones K14E7 y K14E7+E2 comparados con NT/FvB de 7 meses de edad.....	41
Figura 13. Inmunohistoquímica de la expresión de Gli1 en cérvix de ratones NT/FvB, K14E7 y K14E7+E2 de 7 meses de edad.....	42
Figura 14. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de E-cadherina en epitelio cervical de ratones NT/FvB, K14E7 y K14E7+E2 de 7 meses de edad.....	43
Figura 15. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de E-cadherina en epitelio cervical de ratones NT/FvB, K14E7 y K14E7+E2 de 2 meses de edad.....	44

ABREVIATURAS

CaCu. Cáncer cervicouterino

CDK. Cinasa dependiente de ciclina.

cDNA. DNA obtenido mediante una reacción de retrotranscripción.

CKI. Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas.

cRNA. RNA obtenido mediante una reacción de transcripción in vitro.

HDACs. Desacetilasas de histonas.

IFN. Interferón

LCR. Región larga de control.

MCM. complejo de mantenimiento de minicromosoma.

ORFs. Fragmentos de lectura abiertos.

PCA. Análisis de componentes principales.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

RT-PCR. PCR acoplada a retrotranscripción.

RT-qPCR. PCR en tiempo real acoplada a retrotranscripción

TTL. Codón de terminación de la traducción.

VPH. Virus del Papiloma Humano.

Hh. Hedgehog

EMT. Transición epitelial mesenquimal

RESUMEN

El cáncer cervical, un problema de salud en todo el mundo, ha sido asociado a la infección genital por papilomavirus humano de alto riesgo (HR-HPVs). La oncoproteína E7 juega un papel central en el ciclo de vida viral, el inicio del tumor y la inducción de inestabilidad genómica; es considerada la principal proteína transformante dada su habilidad en cultivo de inmortalizar células epiteliales humanas y en el contexto de ratones transgénicos K14E7, de inducir tumores cervicales [en cooperación con 17β -estradiol (E2)], así como mantener lesiones precancerosas y cáncer una vez que se originan. Las actividades transformantes de la oncoproteína E7 están relacionadas con su unión a un gran número de blancos celulares.

Usando microarreglos, empleamos ratones K14E7 jóvenes con el objetivo de definir cambios en la expresión de genes inducidos por la oncoproteína E7 en tejido cervical y piel que podrían ser cruciales en etapas tempranas del desarrollo del cáncer. En esos tejidos, la oncoproteína E7 alteró el perfil transcripcional de genes involucrados en varios procesos biológicos que incluyen: transducción de señales, transporte, proceso metabólico, adhesión y apoptosis.

Transducción de señales fue el proceso biológico más afectado en el cérvix por E7; por esta razón, decidimos analizar una vía de señalización involucrada en el desarrollo del cáncer. Sobreexpresión de genes de la vía de señalización de Hedgehog (Hh), así como cambios en la expresión de genes promotores de transición epitelial mesenquimal (TEM) fueron encontrados en el cérvix de ratones K14E7 y K14E7+E2 en etapas avanzadas de la carcinogénesis cervical. Nuestros hallazgos sugieren que la vía de señalización de Hh podría estar activada durante el desarrollo de cáncer cervical y podría modular la expresión de genes de TEM en etapas tardías del cáncer cervical invasivo.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC), a worldwide health problem, has been directly linked to genital infection by high-risk human papilloma-viruses (HR-HPVs). The E7 oncoprotein plays a central role in the viral life cycle, tumor initiation and induction of genomic instability; it is considered the major transforming protein given its ability, in cell culture to immortalize human epithelial cells, and, in the context of genetically engineered K14E7 mice expressing this oncoprotein to induce cervical tumors [in cooperation with 17 β -estradiol (E₂)], as well as to maintain precancerous lesions and cancers once they have arisen. It is well documented that the transforming activities of the E7 protein are related to the binding of a large number of cellular targets.

Using microarrays, we employed young K14E7 mice with the goal of defining gene expression changes induced by the E7 oncoprotein in cervical and skin tissue that might be crucial to early steps in cancer development. In these tissues, the E7 oncoprotein altered the transcriptional pattern of genes involved in several biological processes including signal transduction, transport, metabolic process, cell adhesion and apoptosis.

We found that signal transduction was the biological processes most affected in the mouse cervix by E7; for this reason, we decided to analyze a signaling pathway involved in cancer development. Some Hedgehog (Hh) signaling molecules were overexpressed. Overexpression of Hh signaling molecules and altered expression of EMT-related Hh pathway downstream targets were found in cervix derived from 2- and 7-month-old K14E7+E₂ and K14E7 mice compared with nontransgenic (NT/FvB) mice. Our findings suggest that Hh signaling could be activated during the development of cervical cancer in the K14E7 mice, particularly after E₂ treatment and may modulate the gene expression of EMT in late stages of invasive cervical cancer.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer cervicouterino (CaCu) y su relación con el virus del papiloma humano (VPH)

El cáncer cervico-uterino (CaCu) es un problema importante de salud pública en el mundo, afectando principalmente a los países en desarrollo. En lo que respecta a México, las cifras son alarmantes ya que ocupa la segunda causa de muerte por cáncer, desplazado sólo por el cáncer de mama [1].

El factor de riesgo más común para el desarrollo de CaCu es la infección por papilomavirus humano de alto riesgo (VPH-AR). Se han identificado más de 50 tipos de VPH que infectan el aparato genital, sin embargo, sólo alrededor de 15 de ellos son considerados altamente oncogénicos o más estrechamente relacionados con el desarrollo de CaCu: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82. [2, 3].

Los VPH-AR están asociados con el desarrollo de casi todos los cánceres cervicales (>99%), la mayoría de los cuales se origina en la zona de transformación, así como con más del 90% de los cánceres que se originan en la zona de transformación anal. El mecanismo molecular por el cual los VPHs causan CaCu se explica principalmente por la acción de dos de sus oncoproteínas virales, E6 y E7, que interfieren en vías celulares clave en el control de proliferación y apoptosis. Específicamente E7 se une e inactiva al supresor tumoral Rb, liberando al factor transcripcional E2F y con esto activa el ciclo celular de forma descontrolada. E6 interfiere con p53 e inhibe la apoptosis, la cual normalmente ocurriría en células con proliferación celular descontrolada. [4-6].

Los VPHs son virus mucosotrópicos que infectan las células basales del epitelio cervical, específicamente células madre del tejido epitelial y aprovechan el proceso de diferenciación del epitelio para sintetizar las proteínas que les permitan ensamblar nuevas partículas virales. [4].

Durante el ciclo de vida viral normal, el genoma del VPH existe en la célula huésped como un episoma. Sin embargo, el genoma viral puede ser incorporado en el genoma del huésped en casos raros. La integración del genoma viral está relacionada con el desarrollo de cáncer debido a que la mayoría de los cánceres cervicales inducidos por VPH contienen una forma integrada del genoma del VPH. La ruptura del episoma viral durante la integración frecuentemente ocurre en una zona que incluye los marcos de lectura de los genes E1 y E2. La consecuente pérdida del represor E2 causa la expresión descontrolada de las oncoproteínas E6 y E7 lo cual incrementa la probabilidad de carcinogénesis inducida por VPH [5, 7].

1.2 Mecanismos oncogénicos de la oncoproteína E7

Los estudios biológicos enfocados principalmente en VPH16 y VPH18 (los tipos virales más frecuentemente detectados a nivel mundial) han demostrado claramente que los oncogenes E6 y E7 están directamente involucrados en la transformación celular y alteran procesos celulares clave, teniendo como blanco varias proteínas celulares. Las actividades biológicas de E6 y E7 están relacionadas con su habilidad de asociarse mediante interacciones proteína-proteína con sus blancos celulares, muchas veces esta interacción desestabiliza la proteína celular y finalmente conduce a su degradación. En otras ocasiones, la unión de la proteína viral con la proteína de la célula huésped puede activar la proteína celular [8].

La función mejor estudiada de las proteínas pocket es su habilidad de bloquear la entrada y progresión a la fase G1/S del ciclo celular, mediante su asociación con los factores de transcripción E2F; estos últimos, controlan procesos como son: proliferación, diferenciación, apoptosis, entre otros. Los complejos Rb/E2F específicos de la fase G1, actúan como represores transcripcionales. En células normales, el rompimiento del complejo represor Rb/E2F es llevado a cabo por cdk4/6 y cdk2 que fosforilan a Rb en la fase

G1 tardía. La oncoproteína E7 se une a la forma hipofosforilada de Rb (forma unida a E2F) y promueve su degradación por la vía del proteosoma y la progresión de las células en la fase S. Por lo tanto, la interacción E7/Rb imita la fosforilación por cdk's haciendo a la célula independiente de cualquier tipo de control [8-10].

Por otro lado, E7 de VPH16 puede unirse directamente a E2F1 y aumentar su actividad transcripcional. E2F1 controla la expresión de E2F6 (proteína del complejo represor de la transcripción llamado PRC o polycomb), esta última, promueve la salida del ciclo celular y diferenciación a través de la represión de promotores responsivos a E2F1. De interés ha sido observar que E7 también puede asociarse con E2F6 e inhibir su función, esto asegura que las células permanezcan en un estado proliferativo que es necesario para el ciclo de vida viral. Además, dado el posible papel de E2F6 en mantener la quiescencia, es concebible que la inhibición de E2F6 por E7 ayude a permitir que los VPHs sorteen señales de crecimiento negativas [11, 12].

E7 también contribuye a la desregulación del ciclo celular a través de mecanismos adicionales. Por ejemplo, las cinasas dependientes de ciclinas (cdks) son los motores que manejan el ciclo de división celular, su actividad está regulada por subunidades reguladoras positivas (ciclinas) y reguladores negativos (inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas: CKIs). La expresión de las ciclinas E y A está bajo el control de E2F y ambas ciclinas se expresan en altos niveles en células que expresan E7 [12].

También se ha demostrado que E7 interactúa y anula las actividades inhibitoras de los CKIs, p21^{CIP1} y p27^{KIP1}, los cuales son inducidos por señales antiproliferativas, incluyendo activación de p53. Los niveles de p21 incrementan durante la diferenciación. Interesantemente, los niveles de p21 están incrementados por estabilización de esta proteína en presencia de E7. Dado que cdk2 permanece activa en células que expresan E7, es posible que p21 sea inactivada por E7, la cual también puede asociarse

directamente con los complejos cdk2/ciclina A, cdk2/ciclina E, resultando en un incremento en la actividad de esos complejos [8, 13].

Estudios recientes han indicado que puede haber mecanismos adicionales por los cuales E7 contribuye al desarrollo del cáncer. Por ejemplo, E7 interactúa con desacetilasas de histonas de clase I, las cuales funcionan como co-represores transcripcionales induciendo remodelado de la cromatina, a través de la eliminación de grupos acetilo de residuos lisina de histonas. E7 también puede asociarse con proteínas del grupo polycomb tales como Ring1, Bmi1, Mel18, hpc2 y L3MBTL2 para reprimir la expresión de algunos genes supresores tumorales, así como con acetiltransferasas de histonas (HATs), incluyendo p300, pCAF y SRC1 para inducir la expresión de oncogenes[14, 15].

Hasta ahora, un gran número de blancos moleculares de E7 han sido identificados. Muchas de esas proteínas están involucradas en el control de procesos fundamentales tales como proliferación, senescencia, apoptosis, diferenciación y respuesta inmune [5].

1.3 Vías de señalización inducidas por la oncoproteína E7

La infección persistente por VPH-AR es un evento crucial en la transformación celular, pero eventos adicionales son requeridos para completar el fenotipo maligno en cáncer cervical. Está muy documentado que el oncogén E7 inactiva al supresor tumoral Rb en células infectadas con VPH y con esto activa la vía de señalización Rb-E2F. Diferentes estudios de biología celular y molecular han revelado que alteraciones en vías de señalización adicionales son igualmente importantes para la transformación de células transfectadas con el oncogén E7 [16]. Por ejemplo, algunas vías de señalización que han sido implicadas en el desarrollo del cáncer relacionado al VPH incluyen la activación de múltiples vías de señalización tales como TGF- β , Hedgehog, Erk/MAPK, Notch, Wnt PI3K/Akt/mTOR, las cuales están involucradas en procesos de diferenciación, supervivencia,

proliferación, progresión del ciclo celular y autorrenovación de células madre [16, 17].

1.3.1 La vía de señalización de Hedgehog (Hh) y su participación en cáncer

Estudios previos han demostrado que la expresión de las proteínas de la vía de señalización de Hh están significativamente aumentadas en cáncer CaCu y sus lesiones precursoras y dicho incremento está relacionado con la progresión de las lesiones cervicales a CaCu [18]. En un reciente estudio reciente se analizaron los niveles de expresión de componentes de la vía de señalización de Hh en líneas celulares de CaCu, detectando alta expresión de Shh, Ihh, Ptch, Smo, Gli1, Gli2 y Gli3 en todas las líneas celulares analizadas (HeLa, SiHa y CasKi), lo que sugiere una activación constitutiva de la vía de señalización de Hh en cáncer cervicouterino [19], además, otro estudio encontraron una asociación entre la alta expresión de genes Hh y su relación con el pronóstico de pacientes con CaCu invasivo después de la quimiorradiación [20].

La vía de señalización de Hh es reconocida como un regulador clave durante la embriogénesis, donde controla procesos tales como, proliferación, diferenciación y patrones de tejido [21]. En vertebrados induce la correcta formación de extremidades, esqueleto, músculos, piel, ojos, entre otros órganos. En organismos adultos esta vía tiene funciones importantes en el mantenimiento de las células stem, así como en la regeneración y reparación de tejido. La inactivación de esta vía causa defectos del desarrollo tales como haloprocefalia, mientras que su hiperactivación se ha encontrado en la mayoría de los carcinomas de células basales y muchos cánceres extracutáneos [22-25].

Los ligandos Hh -uno en *Drosophila* y tres en mamíferos-, *indian* (Ihh), *Sonic* (Shh) y *desert* (Dhh), son moléculas secretadas que funcionan como

morfógenos (sustancias que modifican la forma de un órgano o tejido dependiendo de su concentración) [26]. El sistema de recepción de la vía de señalización de Hh consiste de una proteína de 12 dominios transmembranales, Patched (Ptch), la cual funciona como el receptor Hh y una proteína de 7 dominios transmembranales, Smoothened (Smo), como el transductor de señal a través de la membrana plasmática (**Tabla 1**) [27]. En ausencia del ligando, Ptch está localizado en la membrana donde inhibe la actividad de Smo [28], dicha inhibición se debe a que Ptch induce la secreción de vitamina D3, la cual puede inhibir directamente a Smo, de esta manera, el extremo carboxi terminal de Smo adopta una conformación cerrada, enmascarando el dominio de unión a cinasas [34]. Cuando Smo está inactivo, la familia de factores de transcripción Gli son procesados proteolíticamente para generar formas de Gli truncadas que reprimen la expresión de genes blanco de Hh. Durante el procesamiento proteolítico las proteínas Gli en un complejo con SuFu (un regulador negativo de la vía Hh) primero son fosforiladas por las proteínas cinasas PKA, GSK3 y CK1 ϵ , lo cual crea un sitio de unión para la proteína adaptadora β -TrCP. Entonces, el complejo Gli/ β -TrCP sufre ubiquitinación mediada por la ligasa E3, β -TrCP, lo que finalmente resulta en degradación por el proteasoma para dar lugar a una forma represora truncada (GliR) o degradación completa. Dicha forma truncada transloca al núcleo, donde recluta correpresores, tales como SKI o MSIN3A y desacetilasas de histonas (HDACs) e inhibe la transcripción de genes blanco de Hh[29]. (**Figura 1**)(**Tabla 1**).

Genes de la vía de señalización de Hedgehog	
Gen	Función
Sonic (c), indian (c) y desert (c)	Ligandos de la vía de señalización canónica
Ptch (c) y (b)	Proteína de 12 dominios transmembranales encontrada en la superficie de la célula, donde se une Hh para iniciar la señalización dependiente de ligando. En ausencia del ligando, éste mantiene la vía apagada por inhibición de Smo.
Smo (c)	Proteína tipo GPCR de 7 dominios transmembranales que transmite la señal Hh una vez que hay estimulación, conduciendo a la activación de los factores de transcripción Gli.
Gli1 (c, b) y Gli2 y Gli3	Oncogén asociado a glioma. Factor de transcripción de dedos de zinc que media la respuesta transcripcional a la señalización Hh. En mamíferos hay tres homólogos Gli: Gli1 es exclusivamente un activador de la vía, mientras que Gli2 y Gli3 tienen funciones duales, actuando Gli2 principalmente como un activador, mientras que Gli3 actúa principalmente como un represor transcripcional.
Sufu (c)	(Suppressor of fused) es un regulador negativo de la vía de señalización de Hh, que interactúa directamente con los factores de transcripción de la familia Gli para inhibir su actividad transcripcional.
Ciclina D1 (b)	Reguladores positivos del ciclo celular.
Ciclina E2 (b)	

Tabla 1. Genes componentes(c) y blancos transcripcionales (b) de la vía de señalización de Hh.

En presencia del ligando, el receptor Ptch es internalizado y degradado por lisosomas, lo cual trae como consecuencia que Smo sea liberado de la represión y su carboxilo terminal sea altamente fosforilado por el receptor cinasa acoplado a proteína G (GRK2) en los clusters Ser/Thr, lo que induce un cambio conformacional en Smo para favorecer su interacción molecular.

La interacción de Smo con la proteína G llamada Gai, conduce a la activación de smo como un GPCR, lo que permite su estabilización y acumulación en la membrana plasmática [29]. Esto es suficiente para inducir señalización río abajo, inhibir sufu, PKA, CK1 y GSK3 con lo cual permite la estabilización y activación del factor de transcripción Gli que entonces transloca al núcleo, donde recluta activadores transcripcionales tales como la acetiltransferasa de histona p300 y estimula la transcripción de genes de respuesta a Hh [27]. (**Figura 1**).

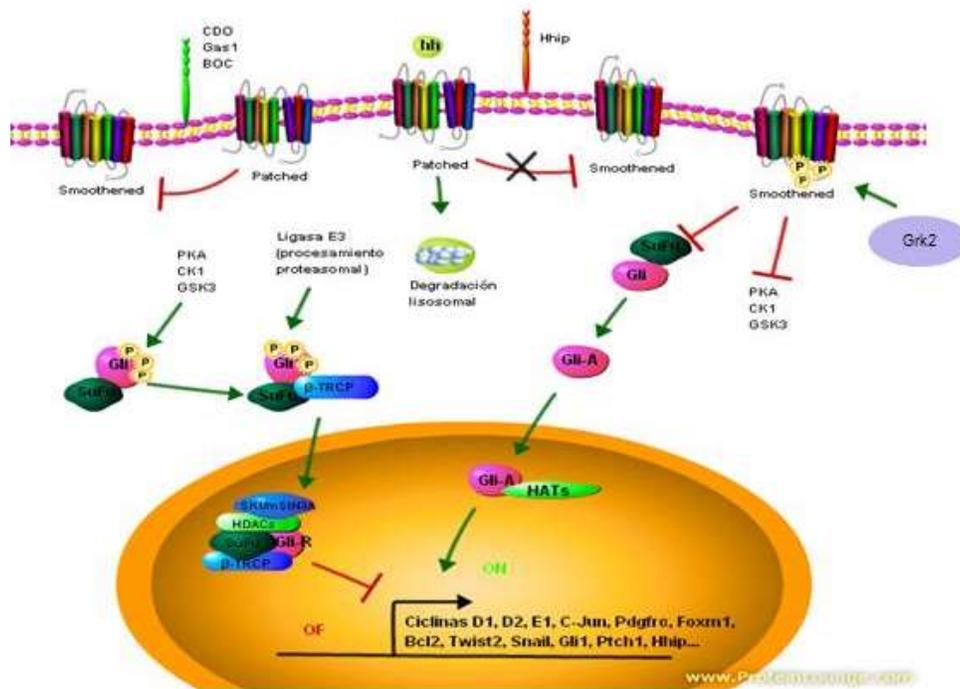


Figura. 1. La vía de señalización de hedgehog. En ausencia del ligando, el receptor Ptch se encuentra inhibiendo la actividad de receptor Smo. Si Smo está inactivo, los factores de transcripción Gli2 y Gli3 son procesados para generar formas represoras truncadas que translocan al núcleo e inhiben la expresión de genes blanco de Hh, gracias a que son capaces de reclutar correpresores tales como SKI, mSIN3A y desacetilasas de histonas (HDACs). Con la unión del ligando, se internaliza Ptch y se degrada por lisosomas, Smo se activa, iniciando una cascada de señalización que permite la estabilización y activación de

los factores de transcripción Gli, que translocan al núcleo y reclutan coactivadores tales como acetiltransferasas de histonas (HATs) con lo cual se estimula la transcripción de genes de respuesta Hh. Modificado de [24, 29, 30].

Al final, la señalización de Hh es transducida río abajo a los factores de transcripción Gli, los cuales pueden regular la expresión de genes blanco por una asociación directa con un sitio de unión consenso localizado en la región promotora de los genes blanco (5-tgggtggtc-3) [30, 31]. Hay varias formas de regular la actividad de los factores de transcripción Gli. Primero, la translocación al núcleo, está altamente regulada [32]; por ejemplo, la proteína cinasa A se ha demostrado que retiene la proteína Gli1 en el citoplasma (a través de un sitio PKA en el péptido señal de localización nuclear) [33], mientras que la señalización activa de ras promueve localización nuclear de Gli [34]. Segundo, la ubiquitinación y degradación de las proteínas Gli está también regulada por varios mecanismos, incluyendo β -Trcp, cul3/BTB y ubiquitinación de Gli mediada por numb/Itch. Tercero, las proteínas Gli2 y Gli3, pueden ser procesadas en represores transcripcionales, lo cual puede ser mediado por la ligasa E3 β -Trcp. Cuarto, la actividad transcripcional de las moléculas Gli es también altamente regulada. Sufu no solo evita la translocación nuclear de las moléculas Gli, sino que también inhibe su actividad transcripcional [32, 35].

Existen varios loops reguladores de retroalimentación en esta vía. Ptch1, Hip, Gas1 y Gli1 son componentes de esta vía pero también son blancos transcripcionales. Hip compete con Ptch por la unión al ligando y de esta manera proveen un mecanismo de retroalimentación negativa para mantener la actividad de la vía en un nivel apropiado. En contraste, Gli1 forma un loop regulador positivo. Otras moléculas tales como Gas1, Cdo, Boc y Glipican 3 actúan como reguladores positivos, ya que son capaces de unirse al ligando Hh y aumentar su unión a Ptch [36]. Reguladores positivos de la función de

Gli también incluyen a la cinasa Dyrk1 la cual fosforila a Gli1 para mantenerla en el núcleo y aumentar su actividad transcripcional [37].

1.3.2 La vía de señalización de Hh y su relación con transición epitelial mesenquimal (TEM)

La vía de señalización de Hh regula un gran número de eventos durante el desarrollo embrionario, durante el cual controla el crecimiento y determina el destino de la célula, actuando como un factor de crecimiento y de supervivencia. Recientemente, se ha encontrado que esta vía se encarga de mantener la autorrenovación de células stem somáticas [38, 39]. Evidencia reciente también sugiere que la activación de la vía de señalización de Hh está relacionada con tumorigénesis, adhesión, migración, invasión, metástasis y angiogénesis tumoral [40-42]. Shh activa a los factores de transcripción Gli para regular la expresión de diversos genes que controlan proliferación celular, diferenciación, invasión y migración. Shh y Gli1 también promueven metástasis al aumentar la expresión de MMP-2 y 9 [41]. Yoo y colaboradores reportaron que la vía de señalización de Hh está directamente involucrada en migración celular y que la inhibición de la vía bloqueó TEM, la activación de MMP-9 y linfangiogénesis [43]. Una correlación negativa entre la expresión de Gli1 y E-cadherina ha sido descrita en varios estudios [40]. Además, el silenciamiento en la expresión de Gli1 suprime motilidad, migración e invasión y reduce la expresión de MMP-2/9, vimentina y el factor de transcripción Snail, mientras que aumenta la expresión de E-cadherina [44]. Así, un gran número de estudios han demostrado que los principales mecanismos de la vía de señalización de Hh en células cancerosas promueven el proceso de TEM y metástasis [45, 46].

Transición epitelial mesenquimal es el proceso por el que las células epiteliales pierden su polaridad apical y adoptan un fenotipo mesenquimal, aumentando de este modo, las propiedades migratorias e invasivas, así como la resistencia apoptótica [47, 48].

La TEM ocurre en estadios tempranos de la invasión tumoral y facilita la migración celular [49]. La expresión de marcadores mesenquimales como la vimentina y la fibronectina, reemplaza los marcadores epiteliales usuales, incluyendo E-cadherina, citoqueratinas, ocludinas y claudinas (**Figura 2**). TEM es fundamental tanto para procesos del desarrollo como para la metástasis en cáncer. La activación de TEM es mediada por represores transcripcionales tales como Snail, un factor de transcripción inducido por la vía de señalización de Hh. El mecanismo primario de inducción de TEM por Snail es mediante la represión de la expresión de E-cadherina, lo que provoca una reducida adhesión celular y promueve capacidades migratorias [49].

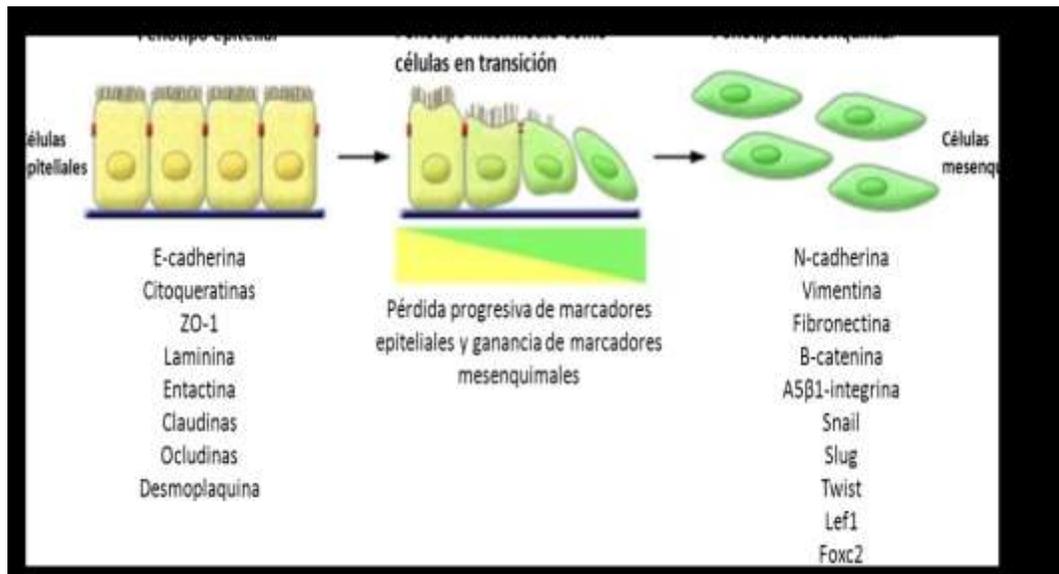


Figura 2. Transición epitelial mesenquimal. Durante la TEM hay una pérdida progresiva de marcadores epiteliales y ganancia de marcadores mesenquimales. Existe un estado intermedio, en el cual existen tanto marcadores epiteliales como mesenquimales, conocido como células en transición. Una vez completo el proceso, las células pierden todos los marcadores epiteliales y expresan sólo marcadores mesenquimales. (Modificado de Lamouille S, 2014 y Jeff H. 2013)

Otros mecanismos de inducción de TEM por la vía de Hh incluyen el cruce con vías de señalización que involucran TGFβ, PI3K, RAS y Wnt [41, 50, 51].

1.4 El ratón transgénico K14E7 como modelo de cáncer cervicouterino

Mediante el uso de la ingeniería genética se generó el ratón transgénico K14E7, con el cual se ha logrado entender la contribución individual de la oncoproteína E7 a la carcinogénesis cervical [52]. Los ratones K14E7 contienen el transgén Hk14HPV16E7 en el cual la expresión de E7 está bajo el control del promotor de keratina 14 humana, un promotor cuya actividad está restringida al estrato basal, que es el sitio natural de la infección por VPH.

Fenotípicamente, los ratones K14E7 presentan retardo en el crecimiento, piel arrugada y engrosada en cuerpo y piernas que comienza a los 3 días de nacidos y persiste hasta la edad adulta. Algunos de esos animales desarrollaron tumores en piel (media de edad 10.6 meses) con baja frecuencia, de 0 a 10%, dependiendo del linaje.

La penetrancia de los fenotipos en los linajes múltiples de ratones K14HPV16E7 correlaciona con los niveles de expresión de E7. La hiperplasia epidermal debida a un incremento en el estado proliferativo es claramente evidente en estos ratones cuando se evalúa la expresión de PCNA, (un componente proteico de la maquinaria de replicación, específicamente detectado en el núcleo durante la fase G1 y S del ciclo celular). Mientras que las células positivas para PCNA están normalmente restringidas al estrato basal, (el cual es una sola capa de células epiteliales no diferenciadas que hacen contacto directo con la membrana basal separando la dermis de la epidermis) en el ratón transgénico fue evidente una expansión de células positivas para PCNA [53-55].

Cuando los ratones K14E7 son tratados con estrógenos por un periodo de 6 meses, se produce displasia cervical de alto grado y cáncer cervical invasivo. Mientras que en los ratones K14E6 tratados con estrógeno por el mismo periodo, únicamente es evidente displasia cervical de bajo grado sin progresión neoplásica [52].

En lo que respecta a piel, el efecto observado en cérvix se invierte, ya que se observa que E6 de forma individual, sin tratamiento estrogénico, induce el desarrollo de tumores malignos en etapas tardías en un 7-14 % dependiendo del linaje y de los niveles de expresión de E6 en ese tejido, mientras que E7 induce tumores benignos en etapas tempranas. Lo cual indica que E6 es un factor de progresión de estadio tardío y que posee una penetrancia baja cuando está expresado solo, pero facilita el desarrollo de un cáncer cervical más agresivo en conjunto con E7 [52, 56]. La coexpresión de ambas oncoproteínas en el ratón K14E6:E7, doble transgénico, reveló que E6 modula el fenotipo maligno producido por E7 y el cáncer cervical en estos ratones fue más grande y extensivo que el producido por E7 solo [54].

II. HIPÓTESIS

En etapas tempranas de la carcinogénesis cervical, la oncoproteína E7 induce cambios en la expresión de genes que participan en procesos biológicos importantes para iniciar y mantener el proceso carcinogénico en etapas tardías.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

- ❖ Analizar cambios globales en la expresión de genes inducidos por la oncoproteína E7 de VPH16 en un modelo murino de cáncer cervicouterino

Objetivos específicos

1. Determinar genes desregulados en su expresión en etapas tempranas del desarrollo del CaCu (1.5 meses) que podrían ser importantes en el desarrollo de esta neoplasia.

2. Identificar procesos celulares afectados por E7 importantes en el desarrollo del cáncer cervicouterino.
3. Con base en el perfil transcripcional afectado, analizar una vía de señalización (vía de Hh) importante en el desarrollo del cáncer cervicouterino.

IV. Materiales y Métodos

Generación de los grupos de ratones

Los ratones K14E7 y FvB han sido descritos previamente [54]. Se realizó la cruce de ratones hembras FvB con ratones machos transgénicos K14E7 heterocigotos. Las crías hembras obtenidas que cumplían con las características fenotípicas (Piel arrugada en neonatos, hiperplasia en las orejas, presencia de cataratas, etc.) fueron genotipificadas utilizando DNA extraído de una muestra de cola. Primero se amplificó el transgén mediante PCR y posteriormente se realizó la genotipificación utilizando la enzima de restricción *Hpa1*, la cual reconoce el TTL presente en la proteína E6 (**Figura suplementaria 1 y 2**).; posteriormente, para verificar que efectivamente la proteína E7 se estuviera expresando en los dos tejidos que íbamos a analizar y así garantizar que los cambios en la expresión que se observaran fueran debidos a la presencia de la oncoproteína y no a otra condición, se realizó una RT-PCR para verificar la presencia del RNAm de E7 en piel y cérvix.

Para los resultados del capítulo II. Se generaron 3 grupos de ratones: FvB/NT, K14E7 y K14E7+E₂ de 2 y 7 meses de edad (1 y 6 meses de tratamiento respectivamente). El tratamiento con estrógenos fue realizado como se indicó previamente [57]. Una vez que alcanzaron la edad

establecida, los ratones fueron sacrificados para la obtención del cérvix el cual fue colocado en *RNA latter* para realizar extracción de RNA, otras muestras fueron fijadas en buffer formalina y embebidos en parafina como se describió anteriormente [58].

Extracción del RNA

Para el análisis del perfil de expresión de genes por microarreglos, las hembras K14E7 y FvB se sacrificaron a las 6 semanas de edad en la etapa de diestro del ciclo estral, obteniéndose el cérvix y piel (aprox. 1 cm²) los cuales se colocaron en un tubo falcon con solución estabilizadora de RNA, RNA latter (aprox. 5 volúmenes de solución por 1 volumen de tejido). Las muestras se dejaron toda la noche a 4°C y al día siguiente se procedió a la extracción de RNA por el método del trizol. La calidad de RNA se midió mediante un corrimiento en gel de agarosa al 1.5 % y la concentración por el método espectrofotométrico.

Marcado e hibridación de RNA complementario (cRNA) para los microarreglos

Una vez extraído todo el RNA, los microarreglos se realizaron en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), donde primero se procedió a medir el número de integridad del RNA (RIN), mediante el chip RNA nano Lab (*Agilent technologies*). Las muestras de RNA con un número de integridad mayor a 8 fueron procesadas para el análisis por microarreglos. El RNA extraído tanto de piel como de cérvix se cuantificó y se hicieron pools de dos muestras colocando la misma cantidad de cada una. En breve, 3 µl del pool de RNA fue convertido a cDNA utilizando la transcriptasa reversa superscript II y el oligómero poly (T). La síntesis de la segunda cadena de cDNA fue seguida de una reacción de transcripción in vitro en la cual se incorporaron CTP y UTP biotinilados para generar transcritos marcados (cRNA). Posteriormente los productos de cRNA fueron fragmentados a 200 nucleótidos o menos y 15 µl del producto de fragmentación fue usado para

preparar 300 μ l de coctel de hibridación (100mM MES, 1M NaCl, 20mM EDTA, 0.01% tween-20, 0.1 mg/ml de HS DNA y 0.5 mg/ml de albúmina de suero bovino acetilado). Los cocteles fueron calentados a 95 °C e hibridados en el Genechip Mouse Exon 1.0 ST Array (Affymetrix Inc.) por 16 horas a 45 °C. Después de la hibridación, los chips se lavaron a baja (6x SSPE) y alta (100mM MES, 0.1M NaCl) astringencia y se marcaron con estreptavidina-ficoeritrina. La fluorescencia fue amplificada adicionando anti-estreptavidina biotinilada y una alícuota adicional de estreptavidina-ficoeritrina. Se utilizó el equipo GeneChip Scanner 300 7G (Affymetrix, Santa Clara CA) para medir la señal fluorescente con una resolución de 11 μ m después de la excitación a 570 nm. Se utilizó el software GCOS (Affymetrix, Santa Clara CA) para obtener la calidad e intensidad de la señal de los datos obtenidos en la lectura de los chips.

Cuantificación de RNAm por RT- PCR tiempo real

Para llevar a cabo la validación de los microarreglos, nuevamente se verificó la calidad del RNA mediante corrimiento en gel de agarosa al 1.5 % y visualización del RNA ribosomal con bromuro de etidio. La cuantificación se realizó por análisis espectrofotométrico a 260 y 280 nm. El cDNA complementario fue sintetizado utilizando 2.5 ng/ μ l de RNA total. Los 20 μ l de la transcripción reversa consisten en 7.5 μ l de H₂O, 4 μ l de Buffer RT 5X, 1 μ l de dNTPs, 1 μ M de primers oligo DT (0.5 μ g/ μ l), 1 μ l de inhibidor de RNAsas y 1 μ l de RT super script II (200U) (Fermentas). La reacción de transcripción reversa fue incubada por 50 min a 42°C y después a 70°C por 17 min. Se realizó un control sin templado para cada experimento para establecer la ausencia de contaminación en las muestras. Para la PCR en tiempo real se utilizó SBYR Green, en donde 1 μ g/ μ l de cada producto de transcripción reversa fue usado en cada reacción y la reacción con SBYR Green se realizó utilizando el kit de reactivos QuantiTect™ SBYR Green (QIAGEN, USA) y el protocolo provisto por el fabricante. La especificidad de cada par de primers fue probada antes de cada experimento de PCR en

tiempo real, mediante PCR punto final amplificando GAPDH como gen constitutivo y utilizando una muestra sin templado y otra sin la polimerasa como controles negativos. La secuencia de primers fue diseñada usando el software primer express 3.0. Cada RNAm fue cuantificado en triplicado y los niveles relativos al gen constitutivo GAPDH fueron calculados para estandarización de los niveles de expresión de las muestras usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se seleccionaron genes involucrados en diferentes procesos y en una amplia variedad de cánceres. Todos los transcritos analizados fueron consistentes con los datos del microarreglo.

Análisis estadístico de los resultados

Se analizaron dos réplicas biológicas por microarreglos de expresión. Un total de 12 microarreglos fueron utilizados, 6 para cérvix y 6 para piel. El análisis de datos de los microarreglos ha sido previamente descrito [57]. El análisis de datos de los microarreglos procesos celulares afectados se hizo utilizando el software Genecodis 2.0. El análisis de los resultados de la RT-PCR en tiempo real se realizó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para la comparación de todos los datos se utilizó la prueba *t de student*. Valores de $p > 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Inmunohistoquímica

Las muestras de cérvix fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, embebidas en parafina y cortadas en secciones de 5 μm . Las secciones seriales fueron usadas para la tinción con hematoxilina-eosina y para la inmunohistoquímica de Dmbt1, Gli1 y E-cadherina. La técnica ha sido previamente descrita [58].

V. RESULTADOS

Capítulo I

La oncoproteína E7 induce cambios en la expresión de genes en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical

Debido a que no existen estudios sobre los efectos de E7 en la expresión de genes in vivo, identificamos genes expresados diferencialmente en piel y en cérvix. Para esto se usaron los microarreglos *GeneChip Mouse Exón 1.0 ST Array* que evalúan los niveles de expresión de 28,853 genes del ratón.

Una vez obtenidos los datos del microarreglo, el primer paso en nuestro análisis fue ver como se distribuían los datos crudos por microarreglo. Esto es muy importante, pues nos permitió decidir los métodos de normalización que deberíamos utilizar. Se observó una distribución uniforme de los datos crudos de los 12 microarreglos, lo que nos indica que los microarreglos son comparables entre sí, sin embargo, fue necesario ajustar un poco por medio de la normalización.

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una herramienta estadística que se utiliza cuando se desea analizar una gran cantidad de datos; su uso en microarreglos permite (de alguna manera) simplificar todos los datos obtenidos representándolos por medio de esferas cuya distribución en la gráfica nos indica las diferencias en los niveles de expresión entre uno y otro tejido. También nos muestra las diferencias entre cepas de ratones que se están comparando. La **Figura suplementaria 3** nos muestra las distribuciones tridimensionales de acuerdo al tipo de tejido y cepa. Se puede observar que la distribución en piel es bastante alejada, lo que indica que las diferencias en los niveles de expresión de genes son muy marcadas. Las diferencias en cérvix no son muy marcadas, pero son significativas. Los porcentajes nos indican la variación en la expresión global.

La oncoproteína E7 tiene un mayor efecto sobre el patrón transcripcional en piel que en cérvix.

Se analizó la expresión de 28, 853 genes usando la plataforma de Affymetrix. Los transcritos considerados en este estudio fueron los que presentaron un fold change ≥ 1.5 para los transcritos aumentados en su expresión y un fold change ≤ -1.5 para los transcritos disminuidos en su expresión con un valor

de $p < 0.05$. (ver lista de genes expresados diferencialmente en GEO ID: GSE36219). Observamos que los cambios más dramáticos en la expresión debido a E7 sucedieron en piel. En cérvix detectamos un total de 324 genes expresados diferencialmente, 98 aumentados en la expresión y 226 disminuidos. En piel hubo un total de 1889 genes expresados diferencialmente, de estos, 1275 estuvieron aumentados en su expresión y 614 disminuidos (**Figura 3**). Al realizar el análisis, nos dimos cuenta de que varios genes tuvieron expresión sobrelapada en ambos tejidos, por lo que construimos un diagrama de Venn para identificar genes alterados en su expresión de forma común o únicamente en cérvix o piel. El diagrama muestra que hubo 55 genes con expresión sobrelapada en piel y cérvix. Dentro de este grupo hubo 8 genes aumentados o disminuidos en su expresión de forma coordinada en ambos tejidos. Algunos de estos genes son blancos transcripcionales de la vía Rb-E2F.

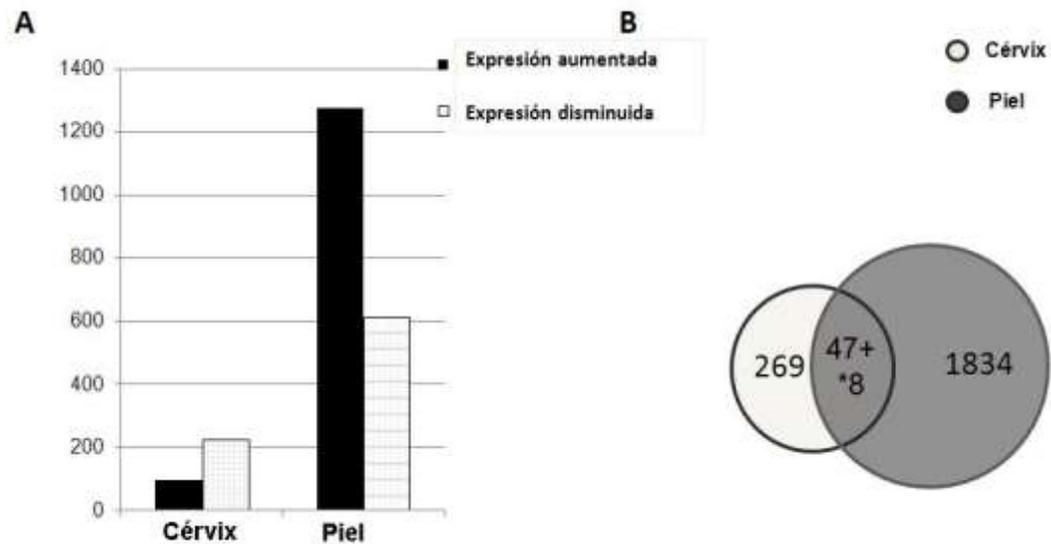


Figura 3. Genes expresados diferencialmente en el ratón K14E7 comparado con ratones FvB/NT. (A) En cérvix, 98 genes mostraron expresión aumentada y 226 expresión disminuida. En contraste, en piel, 1275 genes mostraron expresión aumentada y 614 disminuida. (B) Relación de genes alterados en su expresión en piel vs cérvix. 47+*8 representa genes con expresión diferencial sobrelapada en ambos tejidos. *8 representa

genes aumentados o disminuidos coordinadamente en ambos tejidos. Fold change 1.5 y p -value ≤ 0.05

La expresión del transgén E7 es más alta en piel que en cérvix

Una explicación para las diferencias en la expresión de genes entre piel y cérvix en ratones transgénicos K14E7 podría ser diferencias en la expresión de la oncoproteína E7 en dichos tejidos. Para determinar la expresión del RNAm del transgén, realizamos RT-PCR en tiempo real usando oligos que amplifican E7. Al comparar la expresión en ambos tejidos, encontramos que la expresión del RNAm de E7 fue 3 veces mayor en piel comparada con cérvix (**Figura 4**). Este resultado puede explicar de forma parcial el mayor cambio en la expresión observado en piel. Sin embargo, otras implicaciones al respecto serán discutidas más adelante.

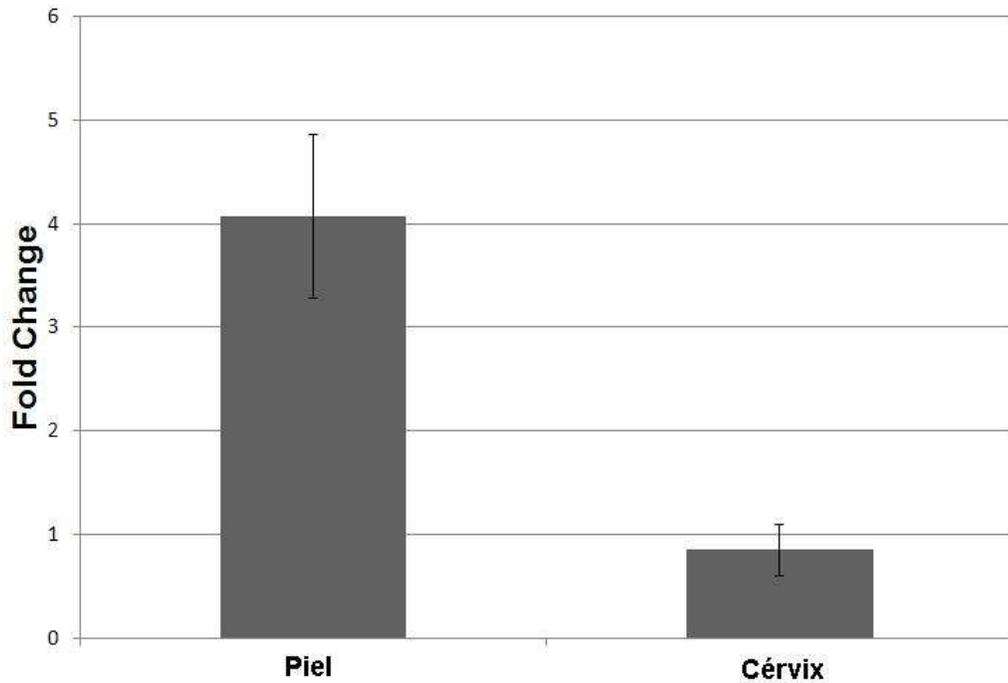


Figura 4. Cuantificación de la expresión del gen E7 usando RT-qPCR en tejido cervical y piel. La expresión del gen E7 fue evaluada en un total de 6 ratones de cada grupo. Los datos representan el fold change del nivel del mRNA normalizado con el GAPDH. Las barras

de error representan la SD. La expresión del mRNA de E7 en piel vs cérvix fue estadísticamente significativa, p-value ≤ 0.05 .

Para clasificar genes expresados diferencialmente con base en su participación en procesos celulares, realizamos un análisis de la ontología génica usando el software Genecodis 2.0. En la **Figura 5** se muestran los 20 procesos más afectados en los dos tejidos. En cérvix, los procesos biológicos con mayor número de genes alterados fueron transducción de señales, transporte, metabolismo, procesos de óxido reducción, apoptosis, respuesta inflamatoria y ciclo celular, mientras que en piel, los procesos biológicos con mayor número de genes afectados fueron transducción de señales, regulación de la transcripción, transporte, proceso metabólico, desarrollo, adhesión celular, etc. Estas categorías contienen una amplia variedad de genes que incluyen los que codifican interleucinas, ciclinas, polimerasas, así como también genes de la familia MCM, relacionadas al inicio y elongación de la horquilla de replicación que estuvieron aumentados en su expresión en ambos tejidos. Encontramos cambios en la expresión en genes que ya han sido reportados en cáncer cervical, así como en genes que no han sido reportados en este tipo de cáncer y que podrían representar marcadores tempranos de transformación celular.

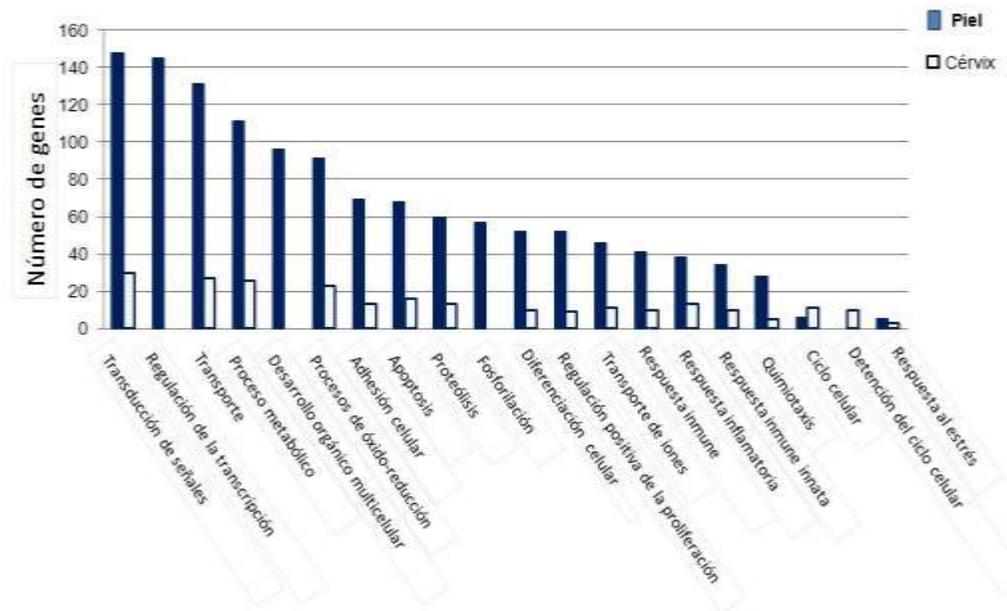


Figura 5. Procesos biológicos afectados en piel y cérvix de ratones transgénicos K14E7. Para conocer los procesos biológicos involucrados en la carcinogénesis temprana de ratones K14E7, se realizó un análisis de los genes expresados diferencialmente usando el software Genecodis 2.0. Se muestran las 20 categorías GO con mayor número de genes alterados.

Validación de los resultados del microarreglo

Se realizó RT-PCR en tiempo real para validar los datos del microarreglo, seleccionamos genes involucrados en diferentes procesos biológicos, algunos previamente reportados en una variedad de cánceres, 11 genes que mostraron expresión alterada en cérvix (4 disminuidos: DMBT1, SESN3, HSD17 β 2 y PPAR γ , y 7 aumentados: ATAD2, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 y LEF1) (**Figura 6**).

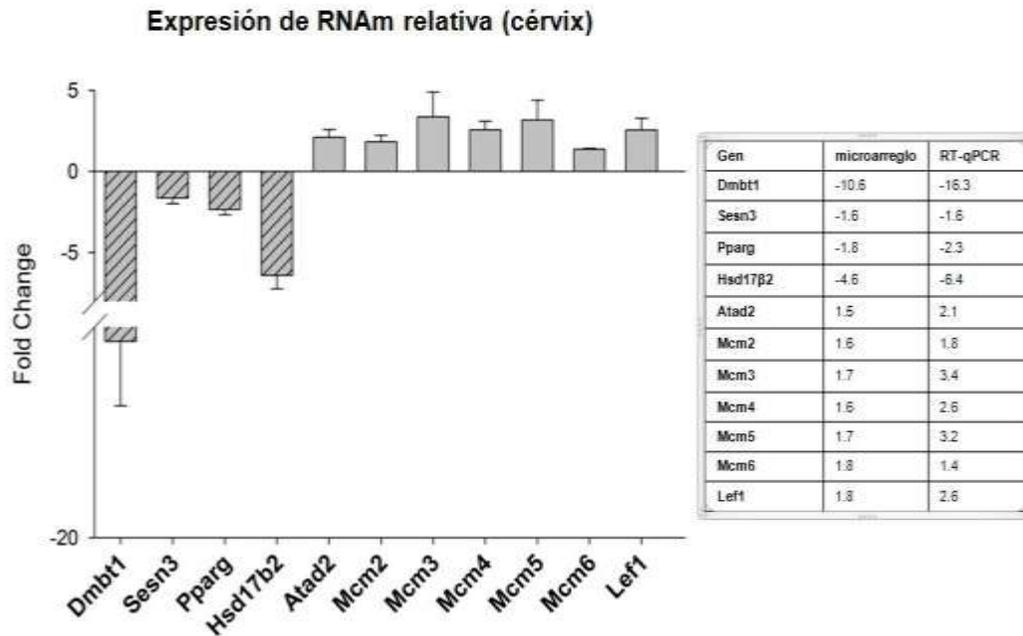


Figura 6. Validación por RT-qPCR de genes seleccionados expresados diferencialmente en tejido cervical de ratones K14E7 comparados con FvB/NT. La expresión de cada gen fue evaluada en un total de 6 ratones de cada grupo (transgénicos y controles). Los datos representan el fold change del nivel del RNAm normalizado con el mRNA del GAPDH (control endógeno). Las barras de error representan la SD. La tabla compara diferencias en los fold change entre microarreglos y RT-qPCR.

De igual manera, en piel fueron validados 5 genes que mostraron expresión alterada (Todos aumentados en su expresión: MCM6, IRF1, MCM4, CASP8 y MMP2) (**Figura 7**) y que han o no sido relacionados con neoplasia cervical. Los resultados de la RT-PCR en tiempo real fueron consistentes con los resultados del microarreglo

Expresión relativa de mRNA (Piel)

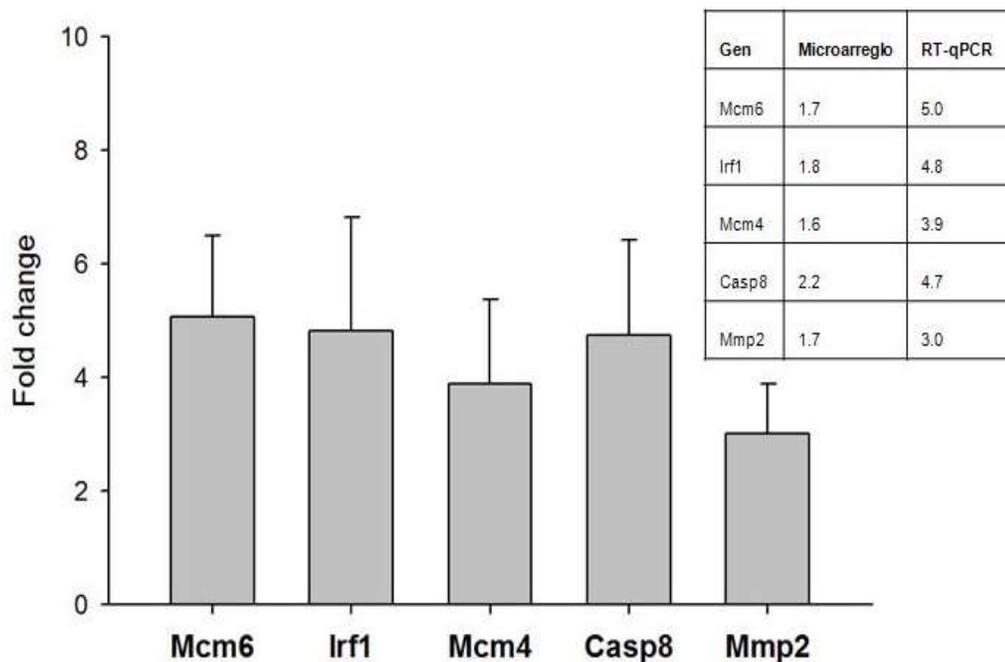


Figura 7. Validación por RT-qPCR de genes seleccionados expresados diferencialmente en piel de ratones K14E7 comparados con FvB/NT. La expresión de cada gen fue evaluada en un total de 6 ratones de cada grupo (transgénicos y controles). Los datos representan el fold change del nivel del RNAm normalizado con el RNAm del GAPDH (control endógeno). Las barras de error representan la SD. La tabla compara diferencias en los fold change entre microarreglos y RT-qPCR.

Análisis de la expresión de la proteína DMBT1

Debido a la importancia de DMBT1 como un gen supresor tumoral en varios tipos de cánceres y dado que fue el gen más fuertemente disminuido en el resultado del microarreglo y PCR en tiempo real, decidimos analizar si la expresión del RNA mensajero de DMBT1 correlacionaba con la expresión de la proteína en cérvix. Como se muestra en la **Figura 8**, observamos una fuerte expresión de DMBT1 en citoplasma y núcleos en cérvix de ratones no

transgénicos FvB/NT, mientras que una expresión débil de DMBT1 fue detectada en citoplasma celular de ratones transgénicos K14E7.

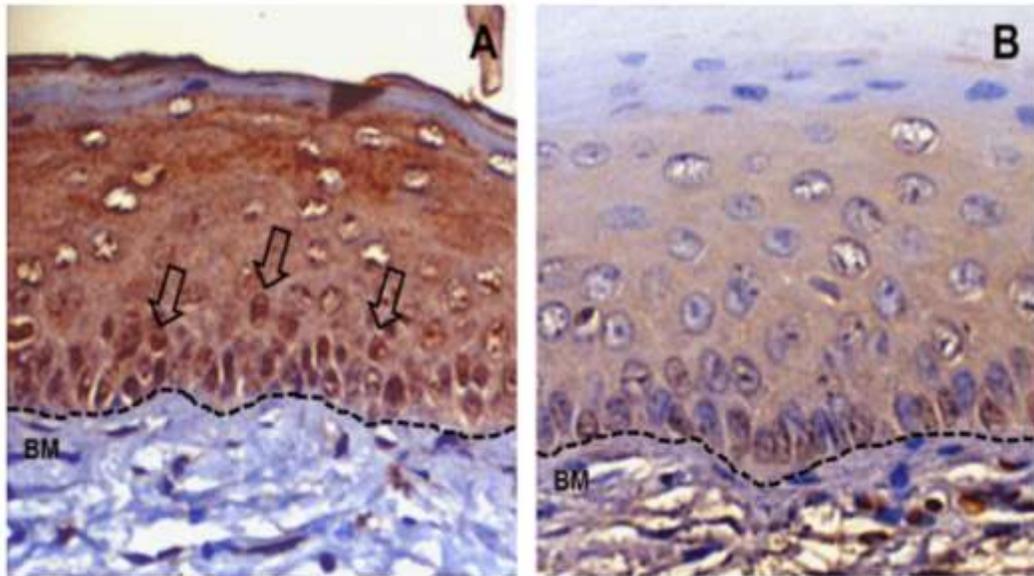


Figura 8. Inmunohistoquímica de la proteína DMBT1 en tejido cervical. Fuerte expresión de DMBT1 en citoplasma y núcleos (flechas) de ratones FvB/NT (A), mientras que débil expresión fue detectada en el citoplasma de ratones K14E7. La inmunohistoquímica fue realizada en ratones K14E7 de 1.5 meses de edad comparada con ratones no transgénicos. Esos experimentos son representativos de tres experimentos independientes (magnificación 40x). BM: Membrana basal.

V. RESULTADOS

Capítulo II

La oncoproteína E7 induce cambios en la expresión de genes inducidos por la vía de señalización de Hh asociados a EMT en el modelo murino K14E7

Debido a que el proceso de transducción de señales fue el que presentó mayor número de genes afectados en su expresión en ambos tejidos, decidimos analizar de forma más profunda cambios transcripcionales en vías de señalización que podrían ser importantes durante la progresión del cáncer cervicouterino. Interesantemente, en cérvix de ratones K14E7 de 1.5 meses de edad, encontramos un aumento en la expresión de genes componentes y blancos transcripcionales de la vía de señalización de Hh (Ptch y Gli1), así como de blancos transcripcionales, aunque no directos (Ciclina E2 y ciclina D1) de la vía de señalización de Hh. Al analizar la información disponible respecto a la vía de señalización de Hh en CaCu. En un reporte previo demostraron que la expresión de genes de la vía de señalización de Hh está aumentada en CaCu, en este trabajo sugieren que la activación de la vía de señalización de Hh podría ser importante en el desarrollo de esta enfermedad [18, 20]. Al realizar RT-PCR en tiempo real de estos genes Hh encontramos que el resultado era consistente con el del microarreglo (**Tabla 2**).

Gen	Función	Fold change Microarreglo	Fold change RT-qPCR
PTCH	Supresor tumoral, en ausencia del ligando, mantiene la vía apagada por inhibición de Smo	2.1	2.5
Gli1	Factor de transcripción de dedos de Zinc que media la respuesta transcripcional de la vía Hh	1.8	6.2
Ciclina E2	Reguladores positivos del ciclo celular	1.7	4.8
Ciclina D1		1,7	4,7

Tabla 2. Genes de la vía de señalización de Hh alterados en el microarreglo en cérvix de ratones K14E7 de 1.5 meses de edad.

Decidimos analizar si estos cambios en la expresión de genes Hh se mantenían en grupos de ratones K14E7 y K14E7+E₂, comparados con ratones FvB/NT de dos meses de edad, y si otros genes de la vía de señalización de Hh también mostraban cambios en la expresión.

Interesantemente, la oncoproteína E7 aumentó los niveles de expresión de genes Hh (SHH, PTCH, SMO, GLI1 y GLI2) en ambos grupos de ratones a la edad de 2 meses. El estrógeno parece contribuir ligeramente a un aumento en la expresión de dichos genes (**Figura 9**).

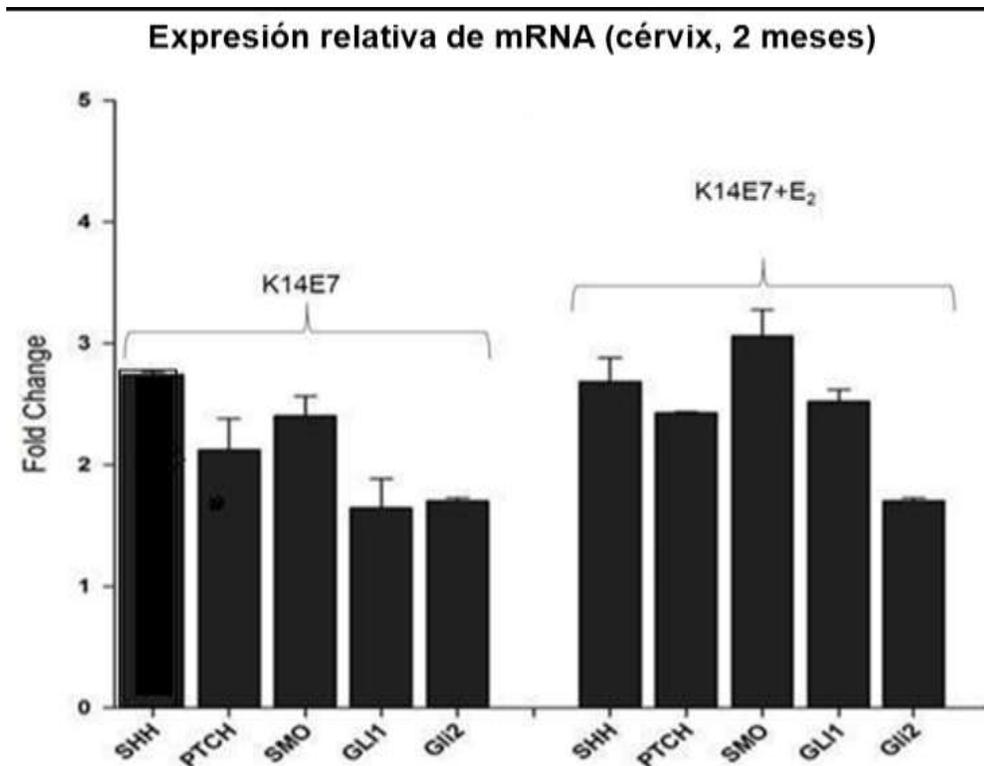


Figura 9. Expresión de genes componentes de la vía de señalización de Hh en ratones K14E7 y K14E7+E₂ de 2 meses de edad comparado con ratones NT/FvB. La expresión de cada gen fue evaluada por RT-qPCR en un total de 6 ratones de cada grupo (transgénicos y controles). Los datos representan el fold change del nivel del RNAm normalizado con el RNAm del GAPDH (control endógeno) y comparado con muestras de NT/FvB. La expresión relativa fue determinada por la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los datos son expresados como la media \pm la SD de tres análisis independientes. Las barras de error representan la SD.

La vía de señalización de Hh regula la transcripción de un gran número de genes implicados en el crecimiento y diferenciación de la célula embrionaria,

mantiene la autorrenovación de células madre somáticas y también ha sido ampliamente implicada en la inducción de EMT por mecanismos directos e indirectos en varios tipos de cánceres, induciendo la expresión de genes que regulan este proceso [40, 41, 45, 59-61]. Una correlación negativa entre la expresión de Gli1 y E-cadherina ha sido descrita en varios estudios [40, 62], sin embargo, el papel de la vía de señalización de Hh en la regulación de TEM no ha sido evaluada en CaCu, por esta razón, analizamos la expresión de genes blanco transcripcionales de la vía de señalización de Hh que han sido reportados como reguladores de TEM en otros tipos de cáncer [62-65]. Un aumento en la expresión de 5 genes reguladores de TEM inducidos por Hh fue evidente en los grupos de ratones K14E7 y K14E7+E₂ comparado con el grupo control FvB/NT de 2 meses de edad (**Figura 10**). Otros genes reguladores de TEM responsivos a Hh tales como Twist2 y Slug fueron evaluados, sin embargo, no mostraron cambio en el nivel de expresión (datos no mostrados). Contrario a lo que esperábamos, observamos un aumento en la expresión del gen que codifica para E-cadherina en los ratones K14E7 y K14E7+E₂ de 2 meses de edad, el cual ha sido previamente reportado como disminuido en su expresión por E7 en líneas celulares transfectadas por este oncogén [66, 67] y en cáncer cervical avanzado [68, 69]. Detalles al respecto serán abordados en la sección de *Discusión*.

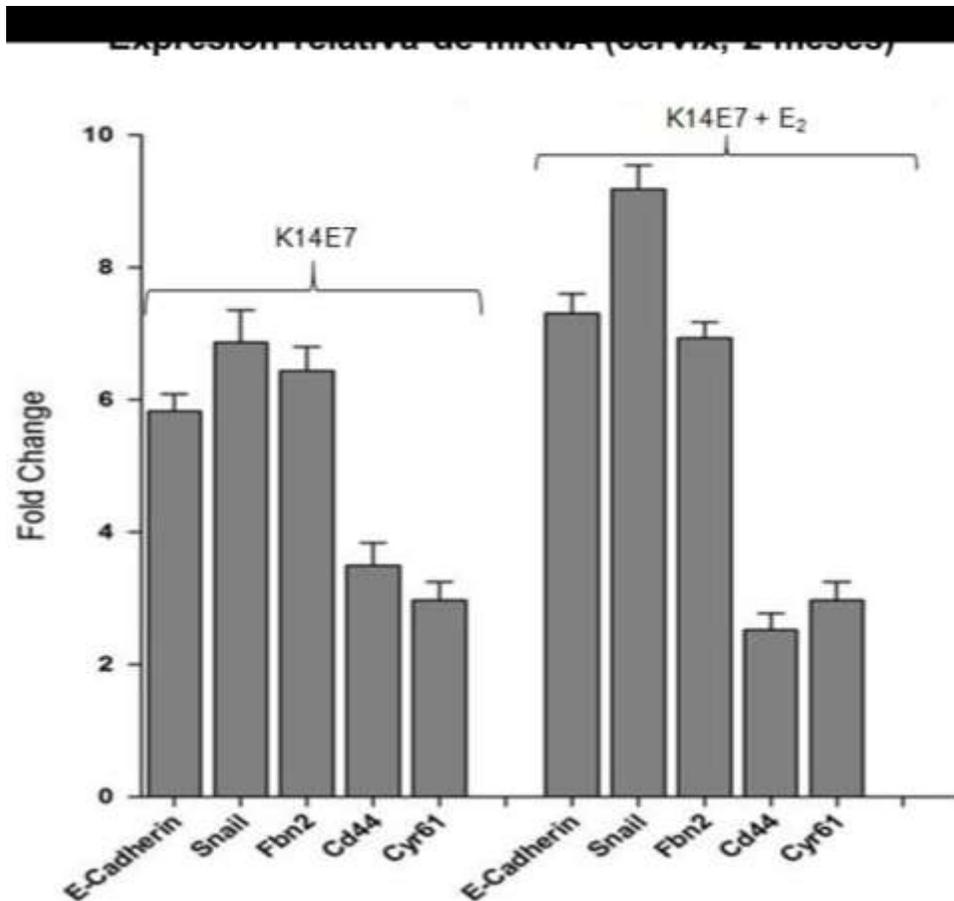


Figura 10. Expresión de genes asociados a EMT inducidos por la vía de señalización de Hh en ratones K14E7 y K14E7+E₂ comparados con NT/FvB de 2 meses de edad. RT-qPCR de genes asociados a EMT expresados en tejido cervical. Todos los datos de la RT-qPCR fueron normalizados con GAPDH. La expresión relativa fue determinada con la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos son expresados como la media \pm la SD de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la SD.

Decidimos analizar si los cambios transcripcionales en estos genes se mantenía en etapas avanzadas de la carcinogénesis cervical, para lo cual se utilizaron los mismos grupos de ratones, K14E7 y K14E7+E₂ (ambos de 7 meses de edad, el segundo con 6 meses de tratamiento con E₂). Los ratones K14E7+E₂ han sido caracterizados previamente y desarrollan CaCu invasivo a los 6 meses de tratamiento con estrógenos [54]. Un aumento en la

expresión de genes componentes de la vía de señalización de Hh fue evidente en los grupos de ratones K14E7 y K14E7+E₂ de 7 meses de edad (**Figura 11**). El tratamiento con estrógenos parece tener un efecto aditivo ligero sobre el aumento en la expresión inducido por E7 en genes como SHH y GLI2.

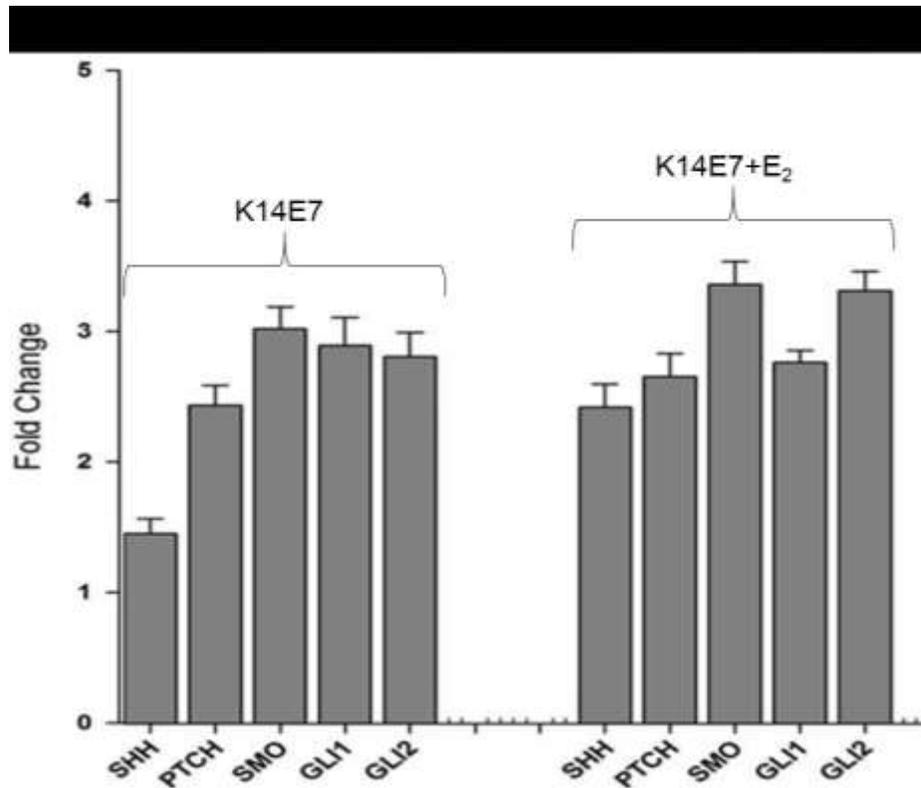


Figura 11. Expresión de genes componentes de la vía de señalización de Hh en ratones K14E7 y K14E7+E₂ de 7 meses de edad comparado con ratones NT/FvB. La expresión de cada gen fue evaluada por RT-qPCR en un total de 6 ratones de cada grupo (transgénicos y controles). Los datos representan el fold change del nivel del RNAm normalizado con el RNAm del GAPDH (control endógeno) y comparado con muestras de NT/FvB. La expresión relativa fue determinada por la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos son expresados como la media \pm la SD de tres análisis independientes. Las barras de error representan la SD.

Los genes reguladores de EMT blanco transcripcionales de Hh, también mostraron cambios en los niveles de expresión cuando fueron analizados por RT-qPCR en los ratones K14E7 y K14E7+E₂ de 7 meses de edad (**Figura 12**). Es importante notar que genes como el de E-cadherina y CD44 que habían mostrado una expresión aumentada en los ratones K14E7 y K14E7+E₂ de 2 meses de edad, a los 7 meses de edad mostraron disminución en la expresión, detalles al respecto serán tratados en la sección de *Discusión*.

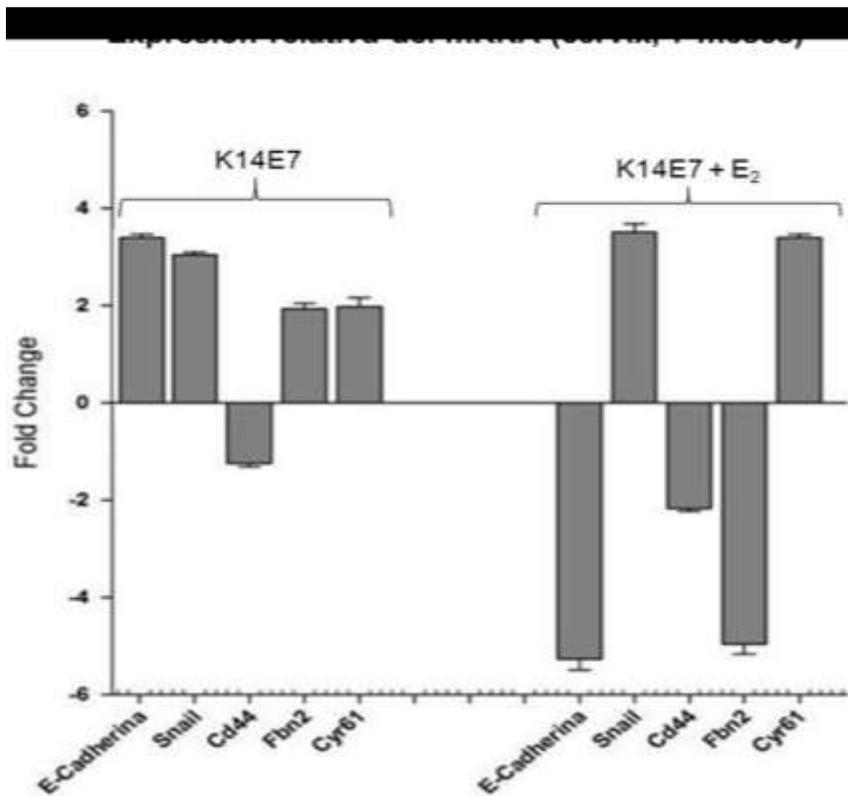


Figura 12. Expresión de genes asociados a EMT inducidos por la vía de señalización de Hh en ratones K14E7 y K14E7+E₂ comparados con NT/FvB de 7 meses de edad. RT-qPCR de genes asociados a EMT expresados en tejido cervical. Todos los datos de la RT-qPCR fueron normalizados con GAPDH. La expresión relativa fue determinada con la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos son expresados como la media \pm la SD de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la SD.

La localización nuclear de Gli1 se considera una característica de la vía de señalización de Hh activa [37, 70], debido en parte a que Gli1 no realiza funciones de represión transcripcional por la carencia del dominio de represión N-terminal en su estructura, por lo cual su localización nuclear indica actividad transcripcional [71-74]. Para analizar si la vía de señalización de Hh se encuentra activa, usamos la técnica de inmunohistoquímica para valorar los niveles de expresión del factor de transcripción Gli1 en los ratones FvB, K14E7, K14E7+E₂ de 7 meses de edad (**Figura 13**). Expresión basal de Gli1 fue observada en cérvix de ratones NT/FvB, mientras que en el epitelio cervical de ratones K14E7, se observó una fuerte expresión de Gli1 en núcleos y moderada expresión en citoplasma. También se observó una fuerte expresión de Gli1 en citoplasma y núcleos en cérvix de ratones K14E7+E₂.

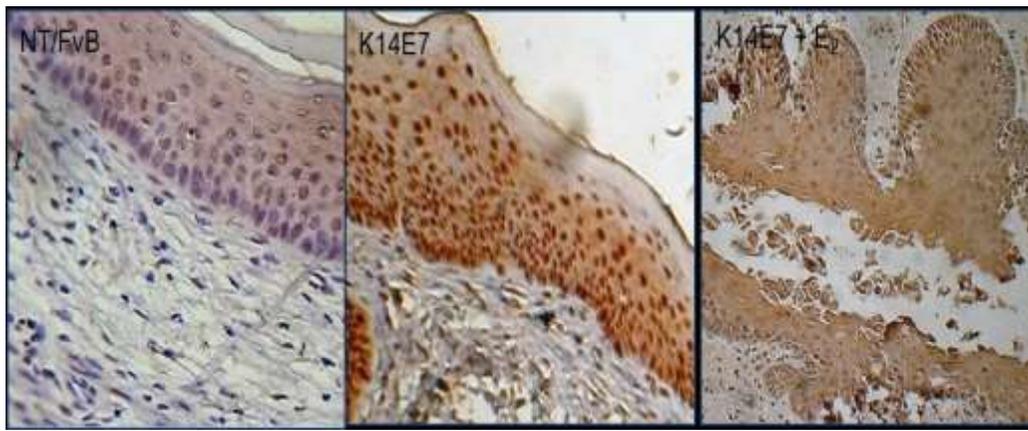


Figura 13. Inmunohistoquímica de la expresión de Gli1 en cérvix de ratones NT/FvB, K14E7 y K14E7+E₂ de 7 meses de edad. Expresión basal de Gli1 en cérvix de ratones NT/FvB, fuerte expresión en núcleos y moderada expresión en citoplasma de ratones K14E7 y fuerte expresión de Gli1 en núcleos y citoplasma de ratones K14E7+E₂. Estos experimentos son representativos de tres experimentos independientes (magnificación 40x).

La alta expresión de Gli1 en núcleos nos indica que la vía de señalización de Hh podría estar activa en el cérvix de los ratones K14E7 y K14E7+E₂ de 7

meses de edad y debido al patrón transcripcional observado en los genes promotores de EMT responsivos a Hh (**Figura 12**), decidimos analizar los niveles de expresión de un gen responsivo de la vía de Hh activa, en este caso elegimos el marcador EMT, E-cadherina para evaluar su expresión en el cérvix de ratones de 7 meses de edad (**Figura 14**). Detectamos moderada expresión de E-cadherina en membrana del epitelio cervical de ratones NT/FvB, mientras que muy fuerte expresión fue observada en el epitelio cervical de ratones transgénicos K14E7. Interesantemente, observamos una expresión muy débil de E-cadherina en epitelio cervical de ratones con cáncer cervical invasivo (K14E7+E₂). Esta pérdida en la expresión podría indicarnos que el proceso de EMT está establecido en este grupo de ratones.

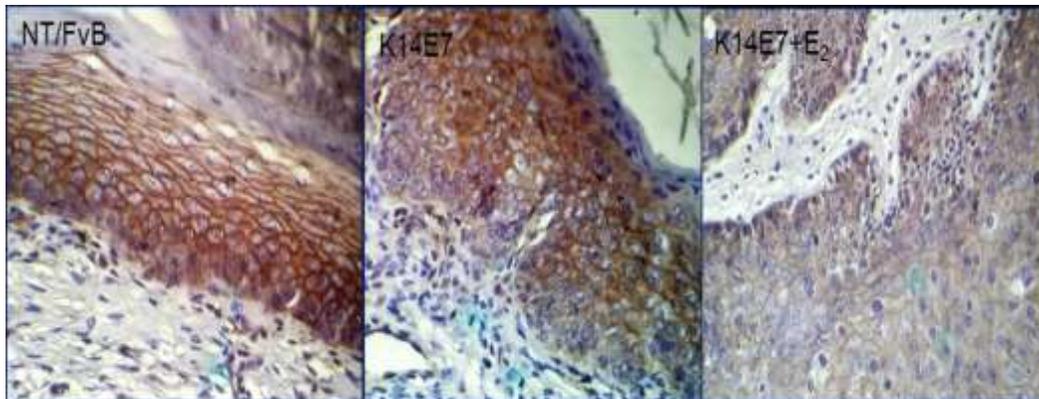


Figura 14. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de E-cadherina en epitelio cervical de ratones NT/FvB, K14E7 y K14E7+E₂ de 7 meses de edad. Se muestra moderada expresión de E-cadherina en cérvix de ratones NT/FvB, mientras que muy fuerte expresión de E-cadherina en ratones K14E7 y muy débil expresión de E-cadherina en ratones con cáncer cervical invasivo (K14E7+E₂). Estos experimentos son representativos de tres experimentos independientes (magnificación 40x).

Los resultados obtenidos en la **Figura 14** nos sugieren que el proceso de TEM podría estar establecido en el cérvix de ratones K14E7+E₂ a la edad de 7 meses debido a la marcada disminución en la expresión del marcador de EMT, E-cadherina, lo cual concuerda con el análisis de su expresión a nivel

transcripcional (**Figura 12**), sin embargo, a la edad de 2 meses, este mismo grupo de ratones (K14E7+E₂) mostró una expresión aumentada en los niveles del transcrito que codifica para E-cadherina (**Figura 10**), por lo anterior, decidimos analizar la expresión de esta proteína en los ratones de 2 meses de edad (**Figura 15**). Se observa una moderada expresión de E-cadherina en membrana del epitelio cervical de ratones NT/FvB, mientras en epitelio cervical de ratones K14E7 se observa una fuerte expresión de E-cadherina y en epitelio cervical de ratones K14E7+E₂ la expresión de E-cadherina es aún más fuerte. Esto nos indica que la vía de señalización de Hh podría estar activa en etapas tempranas en el ratón K14E7+E₂, pero dicha actividad podría estar polarizada para inducir proliferación celular, no TEM. En el caso del ratón K14E7, la vía también podría estar activa y su función también podría ser la de inducir proliferación celular tanto en etapas tempranas como tardías debido a la presencia de E7, dado que estos ratones no desarrollan CaCu por la falta del estímulo estrogénico.

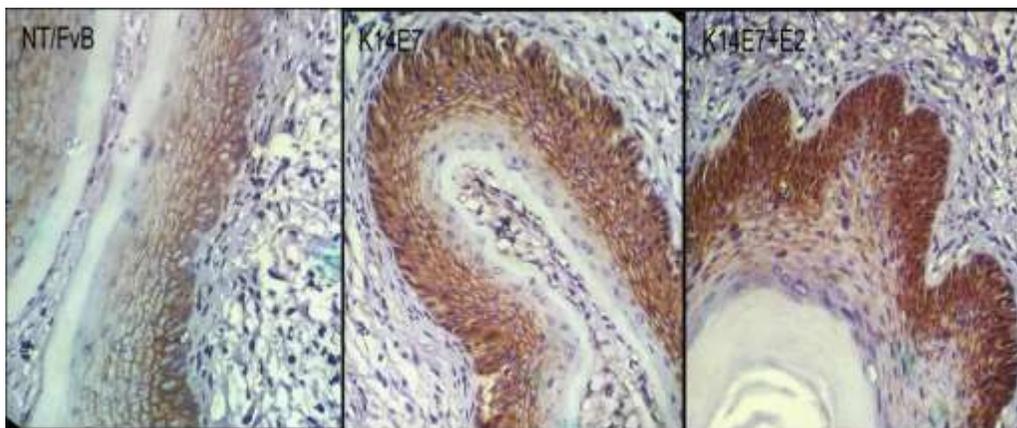


Figura 15. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de E-cadherina en epitelio cervical de ratones NT/FvB, K14E7 y K14E7+E₂ de 2 meses de edad. Se muestra moderada expresión de E-cadherina en membrana del epitelio cervical de ratones NT/FvB, fuerte expresión de E-cadherina en epitelio cervical de ratones K14E7 y K14E7 + E₂. Estos experimentos son representativos de tres experimentos independientes (magnificación 40x).

VI. Discusión

La oncoproteína E7 es considerada la principal proteína transformante del VPH16 debido a su habilidad de inmortalizar células epiteliales humanas [75] y en el contexto de ratones transgénicos K14E7 [76] en los cuales induce lesiones epiteliales escamosas de alto grado y CaCu (en cooperación con 17β -estradiol (E_2)) [77]. Múltiples linajes de ratones que expresan E7 exhibieron hiperplasia epitelial con alta penetrancia y una fracción de estos animales desarrolló tumores en piel en etapas tardías de la vida [54]. Estos hallazgos recalcan el papel potencial de E7 como un oncogén en piel y en cérvix.

Debido a que no existían estudios sobre los cambios en la expresión de genes inducidos por la oncoproteína E7 *in vivo*, quisimos evaluar los patrones de expresión inducidos por esta oncoproteína de forma individual y sin tratamiento con 17β -estradiol en ratones transgénicos K14E7, con el objetivo de definir cambios transcripcionales que podrían ser cruciales en etapas tempranas del desarrollo del cáncer.

Para la primera parte de este estudio, evaluamos el perfil de expresión global de genes en tejido cervical y piel de ratones transgénicos K14E7 adultos jóvenes de 1.5 meses, sin lesiones histopatológicas aparentes, por lo que los resultados obtenidos reflejan los cambios transcripcionales de lo que consideramos el inicio hacia un proceso carcinogénico.

Interesantemente, el resultado del microarreglo mostró mayores cambios en la expresión de genes en piel cuando se comparó con cérvix, esta observación puede ser explicada por dos razones: 1) La expresión de la oncoproteína E7 es más abundante en piel que en cérvix (**Figura. 2**). Esto puede explicarse por el hecho de que la expresión del RNAm de E7 en la epidermis de la piel no está limitada a la capa basal, sino que es expresada en capas suprabasales como resultado de la hiperplasia e hiperqueratosis [76]. 2) La mayor heterogeneidad en tejido cervical podría ser otra de las

razones de los relativamente pocos cambios transcripcionales observados en este tejido. Usamos tejido cervical de ratones estadificados citológicamente en la etapa de diestro para minimizar la influencia de los estrógenos endógenos sobre el patrón de expresión de genes, sin embargo, durante este estadio se han reportado cambios morfológicos tales como útero atrófico. Esto podría conducir a heterogeneidad en los niveles relativos de RNAm entre diferentes muestras cervicales y dar por resultado pocos genes con disminución/incremento significativo sobre el promedio de genes evaluados. Otra explicación podría deberse a que no usamos microdissección láser, el RNA fue extraído del cérvix completo, incluyendo el estroma, sin embargo, existen cambios transcripcionales que correlacionan con la presencia de E7. Algunos trascritos identificados en este trabajo podrían provenir del estroma, sin embargo, existe evidencia de que el microambiente estromal es importante en el desarrollo del cáncer y que genes expresados en etapas tempranas en epitelio y estroma podrían cooperar durante la transición a estadios tardíos del cáncer cervical[78].

Observamos únicamente 55 genes con expresión sobrelapada en ambos tejidos a pesar de que los procesos biológicos afectados por E7 fueron prácticamente los mismos en ambos tejidos (Figura 3). Esto indica que E7 afectó procesos comunes, pero en diferente conjunto de genes en los dos tejidos.

Muchos de los cambios transcripcionales sucedieron en genes responsivos a la vía Rb-E2F, tales como la familia del complejo de mantenimiento de minicromosoma (MCM) que participan en el inicio y en la elongación de la horquilla de replicación. Las proteínas MCM2-7 constituyen el complejo pre-replicativo que se forma en el origen de replicación [79, 80]. Yukio Ishimi en 2003 encontró que el mRNA de mcm2 estuvo aumentado en células HeLa aproximadamente 4 veces el nivel de células normales [81]. Estudios inmunohistoquímicos de material surgido de cérvix uterino humano mostraron que MCM3 y MCM4 están ubicuamente expresadas en células cancerígenas

y se sugiere que estas proteínas pueden ser usadas como marcadores para distinguir dichas células [81]. En concordancia con estos resultados, nosotros encontramos una alta expresión de transcritos MCM4 y MCM6 en piel, así como de MCM2, MCM3, MCM4, MCM5 y MCM6 en cérvix. Por lo cual, los cambios en la expresión de estos genes son de gran utilidad, ya que podrían sugerirse como marcadores de diagnóstico temprano, incluso antes de la aparición de lesiones en una mujer VPH positiva. Otro gen blanco transcripcional de E2F afectado fue ATAD2, cuya expresión es alta en varios tumores humanos. ATAD2 se une a la oncoproteína C-MYC y estimula su actividad transcripcional propiciando un posible link con el proceso de carcinogénesis [82]. En nuestro estudio, encontramos un aumento en la expresión de ATAD2 en ratones transgénicos K14E7, cuando se comparó con FvB/NT y previamente fue demostrado que C-MYC está también sobreexpresado en nuestro modelo [83]. Es importante mencionar que aunque muchos genes responsivos a E2F fueron identificados en nuestro análisis de microarreglo, no detectamos expresión incrementada estadísticamente significativa del gen P16INK4A (el transcrito incrementó 1.7 veces, pero el valor de p fue 0.273). P16INK4A es un marcador de progresión muy conocido de cáncer cervical cuya expresión resulta de la activación transcripcional de la desmetilasa de lisina de histona, KDM6B por E7, dicha desmetilasa controla la activación transcripcional del promotor de P16INK4A al eliminar la marca de trimetilación de la lisina en posición 27 de la histona H3 (H3K27me3), la cual inhibe la transcripción[84]. Este incremento no significativo podría deberse a cuestiones explicadas anteriormente en cuanto a la heterogeneidad del tejido cervical o bien, debido a que los ratones usados para este estudio son adultos jóvenes sin lesiones aparentes, sin embargo, previos estudios en ratones K14E7 que ya presentan CaCu, han reportado un incremento en la expresión de la proteína P16INK4A similar a patrones observados en muestras cervicales malignas humanas [85].

La vía de señalización WNT- β -catenina regula la expresión de varios proto-oncogenes tales como C-MYC, así como también otros genes importantes para el crecimiento y progresión tumoral [86]. La acumulación de β -catenina citoplásmica durante la activación de la vía conduce a su localización nuclear, donde se une a la familia de factores de transcripción TCF/LEF, resultando en la activación transcripcional de genes de la vía [87]. Recientemente se demostró que la oncoproteína E7 está involucrada en la acumulación nuclear de β -catenina [88]. En este estudio, observamos una incrementada expresión de LEF1, sugiriendo que E7 induce la vía de señalización WNT, no sólo por acumulación nuclear de β -catenina, sino también por una incrementada expresión de LEF1.

Genes con funciones en metabolismo también fueron alterados en sus niveles de expresión, entre estos HSD17 β -2, el cual cataliza la conversión de la forma activa del estrógeno, 17 β -estradiol, a una forma inactiva, la estrona [89]. E7 podría incrementar los niveles de estrógeno endógeno a través de la disminución de la expresión de HSD17 β -2, lo cual, como se ha mencionado anteriormente, tiene un efecto co-carcinogénico en el cérvix en este modelo murino de cáncer. PPAR γ es otro gen involucrado en metabolismo y recientemente se le ha relacionado con proliferación, diferenciación y apoptosis [90]. Nosotros encontramos disminución en la expresión del RNAm de este gen, lo que indica que E7 puede regular su expresión.

Otro proceso celular afectado transcripcionalmente por la oncoproteína E7 fue la respuesta inmune; específicamente el gen DMBT1 fue el gen más disminuido en su expresión en cérvix de ratones K14E7, con niveles de RNAm 16 veces más bajos en relación con ratones FvB/NT. Dmbt1 se ha demostrado que juega un papel contra infecciones bacterianas y víricas [91, 92]. También se ha propuesto como un gen supresor tumoral candidato para cáncer de cerebro, próstata, pulmón, esofágico, colorrectal, de piel y mama, dada su disminución tanto a nivel de proteína como de mensajero en esos tipos de cáncer [93-95]. La inactivación de Dmbt1 inhibe la diferenciación de

las células epiteliales y esto conduce al crecimiento del tumor [91]. La disminución en la expresión de DMBT1 en muestras con cáncer de próstata ha sido recientemente atribuida a la metilación del promotor [93]. En nuestro estudio se encontró una notable disminución en su expresión, esto sugiere que DMBT1 podría ser un nuevo biomarcador de etapas tempranas de la carcinogénesis cervical, sin embargo, se requieren estudios más a fondo para saber si este gen podría funcionar como un supresor tumoral y si la expresión disminuida es debida a cambios epigenéticos.

Tomando en cuenta que el proceso de transducción de señales fue el más ampliamente afectado en la expresión de genes en piel y en cérvix, decidimos analizarlo más a fondo, buscando cambios transcripcionales en una vía de señalización importante en el desarrollo del cáncer. Interesantemente, al analizar los datos del microarreglo, encontramos un aumento en la expresión de genes componentes y blancos transcripcionales de la vía de señalización de Hh. Previamente se ha demostrado que la vía de señalización de Hh se encuentra activa en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas [18]. Interesantemente, al evaluar varios componentes de la vía de señalización de Hh (SHH, PCTH, SMO, GLI1 y GLI2), observamos cambios en la expresión de estos genes en los grupos de ratones K14E7 y K14E7+E₂ de dos meses de edad. El estrógeno parece contribuir, aunque de forma ligera a este aumento en la expresión.

La vía de señalización de Hh regula la expresión de un gran número de genes que controlan crecimiento, diferenciación, mantiene la autorrenovación de células madre y ha sido ampliamente implicada en transición epitelial mesenquimal (TEM). TEM es un proceso en el cual la célula pierde su carácter epitelial y adquiere un fenotipo migratorio mesenquimal [47-49]. El papel de la vía de señalización de Hh en la regulación de TEM no ha sido evaluado en cáncer cervicouterino, sin embargo, una correlación negativa entre la expresión de E-cadherina y Gli1 ha sido descrita en varios estudios [44, 45]. Nosotros evaluamos la expresión de 5 genes reguladores de TEM

responsivos a la vía de señalización de Hh. La pérdida de la molécula de adhesión E-cadherina es la principal determinante de TEM [69]. La represión de la expresión de E-cadherina es debida a la unión a su promotor de represores transcripcionales tales como Snail [96, 97]. Nosotros observamos un aumento en la expresión de Snail en ambos grupos de ratones K14E7 y K14E7+E₂ de 2 y 7 meses de edad; sin embargo, los niveles de expresión de E-cadherina son altos en los grupos de ratones K14E7 de 2 y 7 meses de edad, este resultado no correlaciona con reportes previos que indican una disminución en la expresión de E-cadherina en líneas celulares transfectadas con E7 [66, 67, 98-100]. De interés fue observar que al efectuar el análisis de la expresión de E-cadherina tanto por RT-qPCR como por inmunohistoquímica (**Figuras 12 y 14**), sus niveles de expresión están disminuidos en el grupo de ratones K14E7+E₂ de 7 meses de edad; este resultado sugiere que en este grupo de ratones con cáncer cervical invasivo, el proceso de TEM podría estar establecido debido a esta drástica disminución en la expresión de esta proteína de uniones adherentes. El aumento en la expresión de E-cadherina en los grupos de ratones K14E7 y K14E7+E₂ de 2 meses de edad (**Figura 10**) podría ser explicado tomando en cuenta que a esa edad, los ratones transgénicos K14E7 y K14E7+E₂ no presentan lesiones histopatológicas y su expresión aumentada podría constituir una respuesta celular que intenta contrarrestar el efecto mediado por E7 en esta etapa en la que aún no se ha establecido como tal el proceso de TEM, la vía de señalización de Hh podría estar activa, pero su función en ratones a los 2 meses de edad podría estar polarizada para inducir proliferación en lugar de TEM. Otra explicación es que el aumento en la expresión de E-cadherina en los ratones K14E7 y K14E7+E₂ de 2 meses de edad podría reflejar la hiperplasia debida a la hiperproliferación celular ocasionada por E7, por lo cual, la expresión del RNAm y proteína de E-cadherina es más abundante en el tejido cervical de los ratones K14E7 que en los FvB/NT, esto puede ser constatado por el hecho de que en los cortes

de inmunohistoquímica existen zonas con marcada disminución en la expresión de E-cadherina en los ratones K14E7+E₂ de 2 meses de edad.

CD44 es otro gen inductor de TEM responsivo a la vía de señalización de Hh, que fue evaluado en nuestro estudio. CD44 codifica para una glicoproteína transmembranal, multiestructural y multifuncional que participa en procesos patológicos y fisiológicos, incluyendo adhesión celular, angiogénesis, inflamación y desarrollo del tumor. Estudios recientes han evaluado a CD44 como uno de los biomarcadores clave para el aislamiento y caracterización de células madre cancerosas. Los transcritos del gen CD44 sufren splicing alternativo, lo que resulta en isoformas de CD44. Generalmente, la molécula estándar (CD44s) es expresada en epitelio normal, mientras que las isoformas variables (CD44v) son principalmente expresadas en células durante la inflamación o en células tumorales. Al evaluar los niveles del transcrito para CD44s observamos un aumento ligero en la expresión en los ratones K14E7 y K14E7+E₂ a la edad de 2 meses. De interés fue observar que este comportamiento en la expresión se invirtió cuando se analizó la expresión en los mismos grupos de ratones a los 7 meses de edad. Esto concuerda con estudios previos que reportan una expresión reducida de CD44s durante el desarrollo y progresión del cáncer CaCu [101, 102], por lo que su baja expresión podría considerarse como un indicador de invasividad del tumor debido a las funciones en adhesión celular de CD44. CIR61 es una proteína asociada a matriz extracelular, funciona como un factor de crecimiento que aumenta proliferación, invasión, migración, angiogénesis, sobrevida, TEM y stemness en cáncer, gracias a su afinidad a varios factores que incluyen proteínas de superficie celular y proteínas de matriz [103-105]. Al analizar los niveles de expresión de CYR61 encontramos niveles aumentados del transcrito en ratones K14E7 y K14E7+E₂ de 2 y 7 meses de edad, lo cual concuerda con reportes previos que indican que CYR61 es un gen de respuesta temprana y que su expresión se intensifica con la progresión del cáncer.

FBN2 es una glicoproteína de matriz extracelular involucrada en la estructura y función de las microfibrillas, la pérdida de su expresión debida a metilación del promotor ha sido reportada en cáncer de pulmón, hepático y colorrectal[106-108]. En nuestro análisis, la expresión de FBN2 es alta en grupos de ratones K14E7 y K14E7+E₂ de 2 meses de edad. A la edad de 7 meses, el aumento en la expresión se mantiene en los ratones K14E7, sin embargo, en ratones que ya presentan CaCu debido a tratamiento con estrógenos (K14E7+E₂), la expresión de FBN2 se encuentra disminuida. No existen estudios sobre el efecto de los estrógenos en la expresión de FBN2, sin embargo, la disminución en la expresión en ratones K14E7+E₂, podría indicar que este gen funciona como un supresor tumoral en este tipo de cáncer.

VII. Conclusión

La oncoproteína E7 induce cambios en la expresión de genes en etapas tempranas del desarrollo del CaCu que podrían ser cruciales en etapas más avanzadas. Entre los procesos más afectados por la oncoproteína E7 se encontró transducción de señales; específicamente la vía de señalización de Hh mostró cambios en la expresión de genes, así como actividad en la vía. La activación de esta vía podría ser importante para inducir EMT en etapas avanzadas de la carcinogénesis cervical.

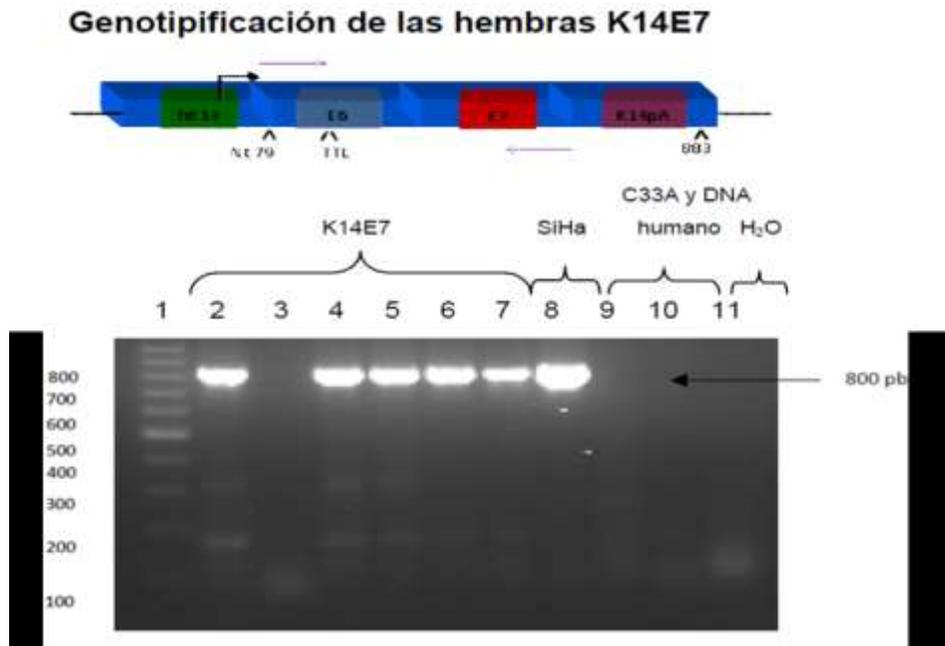
VIII. Perspectivas

1. Evaluar la expresión de otros marcadores de TEM (Snail y N-cadherina) en tejido cervical de ratones FvB, K14E7 y K14E7+E₂ de 2 y 7 meses de edad.
2. Analizar la expresión de Gli1, E-cadherina, N-cadherina y Snail en biopsias de mujeres en diferentes etapas del CaCu (Epitelio normal,

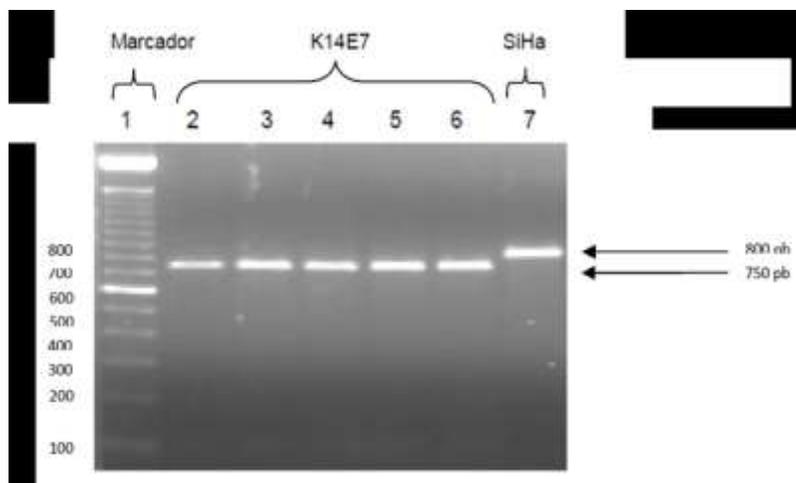
lesión de bajo grado, lesión de alto grado, cáncer *in situ* y cáncer invasor).

3. Evaluar la expresión de marcadores de EMT en biopsias de mujeres (E-cadherina, N-cadherina y Snail) y correlacionarlos con la expresión de proteínas de la vía de señalización de Hh (Gli1, Shh).
4. Escribir el artículo y publicarlo

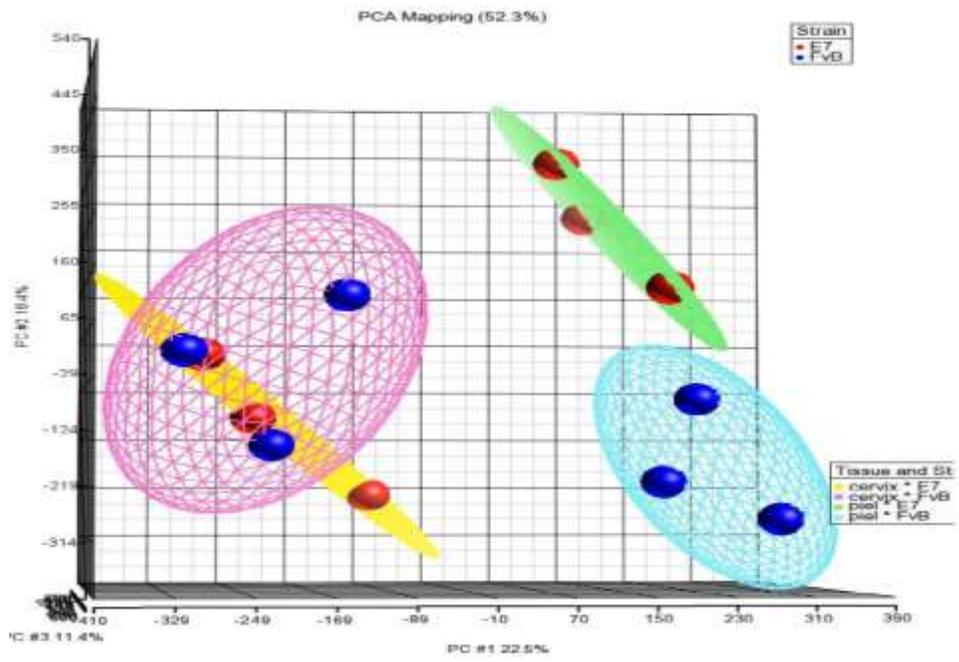
IX. Figuras suplementarias



Suplementaria 1. Detección del transgén K14E6/E7 mediante PCR. Corrimiento electroforético en gel de agarosa 1.5% de los productos de PCR para el transgén E6/E7 de VPH-16. Línea 1, marcador de 100 pb; línea 2-7, DNA de ratones K14E7; línea 8, SiHa; línea 9, C33A; línea 10, DNA humano y línea 11, H₂O.



Suplementaria 2. Tipificación de ratones K14E7. Corrimiento electroforético en gel de agarosa 1.5% de los productos de PCR digeridos con Hpa1 para el transgén E6/E7 de VPH-16. Líneas 1, marcador de 100 pb; línea 2-6, K14E7 y línea 7 SiHa.



Suplementaria 3. Distribución de acuerdo al PCA

X. Anexos

Artículos publicados

Virology 433 (2012) 337–345



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yviro



Differential gene expression between skin and cervix induced by the E7 oncoprotein in a transgenic mouse model

E. Ibarra Sierra^{a,1}, J. Díaz Chávez^{b,1}, E.M. Cortés-Malagón^c, L. Uribe-Figueroa^d, A. Hidalgo-Miranda^d, P.F. Lambert^e, P. Gariglio^{1,*}

^a Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, México D.F., México

^b Unidad de Investigación biomédica en cáncer, UNAM/Instituto Nacional de Cancerología, México D.F., México

^c Unidad de Investigación, Laboratorio de Genética y Diagnóstico Molecular, Hospital Juárez de México, Mexico City, México

^d Instituto Nacional de Medicina Genómica, México D.F., México

^e University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, Madison, Wisconsin, USA

ARTICLE INFO

Article history

Received 11 May 2012

Returned to author for revisions

20 June 2012

Accepted 17 August 2012

Available online 11 September 2012

Keywords

HPV16

K14E7

Transgenic mice

Cervical cancer

Microarrays

ABSTRACT

HPV16 E7 oncoprotein expression in K14E7 transgenic mice induces cervical cancer after 6 months of treatment with the co-carcinogen 17 β -estradiol. In untreated mice, E7 also induces skin tumors late in life albeit at low penetrance. These findings indicate that E7 alters cellular functions in cervix and skin so as to predispose these organs to tumorigenesis. Using microarrays, we determined the global gene expression profile in cervical and skin tissue of young adult K14E7 transgenic mice without estrogen treatment. In these tissues, the E7 oncoprotein altered the transcriptional pattern of genes involved in several biological processes including signal transduction, transport, metabolic process, cell adhesion, apoptosis, cell differentiation, immune response and inflammatory response. Among the E7-dysregulated genes were ones not previously known to be involved in cervical neoplasia including DMBT1, GLI1 and 17 β HSD2 in cervix, as well as MMP2, 12, 14, 19 and 27 in skin.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

"High risk" human papillomaviruses (HPVs) genotypes of greatest frequency, HPV16 and HPV18, are the causative agents of the majority of cervical and other anogenital cancers and a subset of head and neck cancers (Munoz et al., 2003; zur Hausen, 1996). The transforming potential of oncogenic HPVs is closely linked to the expression of the viral E6 and E7 genes, which encode oncoproteins best known for their ability to inactivate the cellular tumor suppressors p53 and RB, respectively (McLaughlin-Drubin and Munger, 2009). These viral oncoproteins also are known to bind to and modify the activity of many other cellular proteins, thereby compromising multiple processes involved in cellular homeostasis and transformation (McLaughlin-Drubin and Munger, 2009; Munger et al., 2001).

Extensive studies on the oncogenic properties of HPV16 E6 and E7 have been carried out in vivo using genetically engineered HPV16 transgenic mice, in which expression of E6 and/or E7 were

targeted to the basal cells of the squamous epithelium under the control of the human keratin 14 (K14) transcriptional promoter (Herber et al., 1996b). E6 and E7 oncoproteins, together, induced cancers in multiple epithelial tissues in which they were expressed, including squamous cell carcinoma of the skin (Herber et al., 1996a; Song et al., 1999), the cervix (Arbeit et al., 1994; Riley et al., 2003), the head/neck region (Strati et al., 2006) and the anus (Stelzer et al., 2010; Thomas et al., 2011). Importantly, in the cervix, head/neck and the anus, three sites in which HPV16 causes cancer in humans, E7 was clearly the more potent viral oncogene (Shai et al., 2007; Strati et al., 2006; Thomas et al., 2011).

Based on this knowledge, we set out to define the global changes in the expression of cellular genes caused specifically by E7. We used high-density oligonucleotide microarrays to compare the expression profile in the cervix and skin of K14E7 transgenic compared to that of nontransgenic mice. We focused our analyses on young adult mice in which neoplastic progression had yet to have occurred, thereby attempting to define acute effects of E7 that might contribute early on to the process of carcinogenesis. Among the biological processes that we found most affected by HPV16 E7 in both tissues were signal transduction, transport, metabolic process, cell adhesion, apoptosis, cell differentiation, immune response and inflammatory response.

* Corresponding author. Fax: +52 555 061 3931.

E-mail address: vida@investav.mx (P. Gariglio).

¹ These authors contributed equally



Gene expression profile regulated by the HPV16 E7 oncoprotein and estradiol in cervical tissue

Enoc M. Cortés-Malagón^{a,c}, José Bonilla-Delgado^c, José Díaz-Chávez^d, Alfredo Hidalgo-Miranda^e, Sandra Romero-Cordoba^e, Aykut Üren^f, Haydar Çelik^{f,1}, Matthew McCormick^f, José A. Munguia-Moreno^g, Eloisa Ibarra-Sierra^g, Jaime Escobar-Herrera^h, Paul F. Lambert^h, Daniel Mendoza-Villanuevaⁱ, Rosa M. Bermudez-Cruz^a, and Patricio Gariglio^{a,*}

Enoc M. Cortés-Malagón: enoc.cortes@salud.gob.mx; José Bonilla-Delgado: jose.bonilla@salud.gob.mx; José Díaz-Chávez: josediaz030178@hotmail.com; Alfredo Hidalgo-Miranda: ahidalgo@inmegen.gob.mx; Sandra Romero-Cordoba: sromero_cordoba@hotmail.com; Aykut Üren: au26@georgetown.edu; Haydar Çelik: hc547@georgetown.edu; Matthew McCormick: mjm444@georgetown.edu; José A. Munguia-Moreno: antoniomgeninis@yahoo.com.mx; Eloisa Ibarra-Sierra: eibarra@cinvestav.mx; Jaime Escobar-Herrera: moemas@yahoo.com; Paul F. Lambert: plambert@wisc.edu; Daniel Mendoza-Villanueva: daniel.mendoza.villanueva@nih.gov; Rosa M. Bermudez-Cruz: roberm@cinvestav.mx; Patricio Gariglio: vidal@cinvestav.mx

^aDepartment of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Mexico City 07360, Mexico

^bDepartment of Cell Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Mexico City 07360, Mexico

^cResearch Unit, Hospital Juárez de México, Mexico City 07760, Mexico

^dUnit of Biomedical Research in Cancer, UNAM/Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Mexico City 14080, Mexico

^eOncogenomic Department, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Mexico City 14610, Mexico

^fDepartment of Oncology, Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University Medical Center, Washington, DC 20057-1469, USA

^gResearch Laboratory, Instituto Estatal de Cancerología, Acapulco 39570, Guerrero, Mexico

^hMcArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, Madison, WI 53706, USA

ⁱLaboratory of Cell and Developmental Signaling, National Cancer Institute-Frederick, PO Box B, Frederick, MD 21702-1201, USA

Abstract

The HPV16 E7 oncoprotein and 17 β -estradiol are important factors for the induction of premalignant lesions and cervical cancer. The study of these factors is crucial for a better understanding of cervical tumorigenesis. Here, we assessed the global gene expression profiles induced by the HPV 16 E7 oncoprotein and/or 17 β -estradiol in cervical tissue of FvB and K14E7 transgenic mice. We found that the most dramatic changes in gene expression occurred in K14E7 and FvB groups treated with 17 β -estradiol. A large number of differentially expressed genes involved in the immune response were observed in 17 β -estradiol treated groups. The E7

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Correspondence to: Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, 07360 México D.F. México. Fax: +52 55 5061 3931.

¹Permanent address: Department of Pharmaceutical Basic Sciences, Faculty of Pharmacy, Erciyes University, 38039 Kayseri, Turkey.

XI. Referencias

1. Hernandez-Hernandez, D.M., T. Apresa-Garcia, and R.M. Patlan-Perez, [Epidemiological overview of uterine cervical cancer]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 2015. **53 Suppl 2**: p. S154-61.
2. Egawa, N., et al., *Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia*. *Viruses*, 2015. **7(7)**: p. 3863-90.
3. Munoz, N., et al., *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. *N Engl J Med*, 2003. **348(6)**: p. 518-27.
4. Doorbar, J., et al., *Human papillomavirus molecular biology and disease association*. *Rev Med Virol*, 2015. **25 Suppl 1**: p. 2-23.
5. Ghittoni, R., et al., *Role of human papillomaviruses in carcinogenesis*. *Ecancermedalscience*, 2015. **9**: p. 526.
6. Munger, K., et al., *Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis*. *J Virol*, 2004. **78(21)**: p. 11451-60.
7. Grabowska, A.K. and A.B. Riemer, *The invisible enemy - how human papillomaviruses avoid recognition and clearance by the host immune system*. *Open Virol J*, 2012. **6**: p. 249-56.
8. McLaughlin-Drubin, M.E. and K. Munger, *The human papillomavirus E7 oncoprotein*. *Virology*, 2009. **384(2)**: p. 335-44.
9. Balsitis, S., et al., *Examination of the pRb-dependent and pRb-independent functions of E7 in vivo*. *J Virol*, 2005. **79(17)**: p. 11392-402.
10. Collins, A.S., et al., *Interactions with pocket proteins contribute to the role of human papillomavirus type 16 E7 in the papillomavirus life cycle*. *J Virol*, 2005. **79(23)**: p. 14769-80.
11. McLaughlin-Drubin, M.E., K.W. Huh, and K. Munger, *Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6*. *J Virol*, 2008. **82(17)**: p. 8695-705.
12. Zeffass, K., et al., *Cell cycle-dependent disruption of E2F-p107 complexes by human papillomavirus type 16 E7*. *J Gen Virol*, 1995. **76 (Pt 7)**: p. 1815-20.
13. Shin, M.K., et al., *Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21Cip1 in cervical carcinogenesis*. *Cancer Res*, 2009. **69(14)**: p. 5656-63.
14. Chalertpet, K., et al., *Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein mediates CCNA1 promoter methylation*. *Cancer Sci*, 2015. **106(10)**: p. 1333-40.
15. Johannsen, E. and P.F. Lambert, *Epigenetics of human papillomaviruses*. *Virology*, 2013. **445(1-2)**: p. 205-12.
16. Zhang, L., et al., *The role of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in human cancers induced by infection with human papillomaviruses*. *Mol Cancer*, 2015. **14**: p. 87.
17. Bello, J.O., et al., *Regulation of the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway by Human Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins*. *Viruses*, 2015. **7(8)**: p. 4734-55.
18. Xuan, Y.H., et al., *Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions*. *Mod Pathol*, 2006. **19(8)**: p. 1139-47.
19. Petrovic, I., et al., *SOX18 Is a Novel Target Gene of Hedgehog Signaling in Cervical Carcinoma Cell Lines*. *PLoS One*, 2015. **10(11)**: p. e0143591.

20. Chaudary, N., et al., *Hedgehog pathway signaling in cervical carcinoma and outcome after chemoradiation*. *Cancer*, 2012. **118**(12): p. 3105-15.
21. Ingham, P.W. and M. Placzek, *Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog*. *Nat Rev Genet*, 2006. **7**(11): p. 841-50.
22. Peng, Y.C. and A.L. Joyner, *Hedgehog signaling in prostate epithelial-mesenchymal growth regulation*. *Dev Biol*, 2015. **400**(1): p. 94-104.
23. Xie, J., *Hedgehog signaling pathway: development of antagonists for cancer therapy*. *Curr Oncol Rep*, 2008. **10**(2): p. 107-13.
24. Epstein, E.H., *Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(10): p. 743-54.
25. Bale, A.E., *Hedgehog signaling and human disease*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2002. **3**: p. 47-65.
26. Lee, J.J., et al., *Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis*. *Science*, 1994. **266**(5190): p. 1528-37.
27. Ingham, P.W. and A.P. McMahon, *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles*. *Genes Dev*, 2001. **15**(23): p. 3059-87.
28. Taipale, J., et al., *Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened*. *Nature*, 2002. **418**(6900): p. 892-7.
29. Cohen, M.M., Jr., *Hedgehog signaling update*. *Am J Med Genet A*, 2010. **152A**(8): p. 1875-914.
30. Ruppert, J.M., et al., *The GLI-Kruppel family of human genes*. *Mol Cell Biol*, 1988. **8**(8): p. 3104-13.
31. Sasaki, H., et al., *A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro*. *Development*, 1997. **124**(7): p. 1313-22.
32. Kogerman, P., et al., *Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1*. *Nat Cell Biol*, 1999. **1**(5): p. 312-9.
33. Sheng, T., et al., *Regulation of Gli1 localization by the cAMP/protein kinase A signaling axis through a site near the nuclear localization signal*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(1): p. 9-12.
34. Stecca, B., et al., *Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(14): p. 5895-900.
35. Huntzicker, E.G., et al., *Dual degradation signals control Gli protein stability and tumor formation*. *Genes Dev*, 2006. **20**(3): p. 276-81.
36. Yang, L., et al., *Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications*. *Oncogene*, 2010. **29**(4): p. 469-81.
37. Mao, J., et al., *Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(38): p. 35156-61.
38. Yan, G.N., et al., *Endothelial cells promote stem-like phenotype of glioma cells through activating the Hedgehog pathway*. *J Pathol*, 2014. **234**(1): p. 11-22.
39. Liu, S., et al., *Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells*. *Cancer Res*, 2006. **66**(12): p. 6063-71.
40. Fan, H.X., et al., *Sonic hedgehog signaling may promote invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma by activating MMP-9 and E-cadherin expression*. *Med Oncol*, 2014. **31**(7): p. 41.

41. Chen, J.S., et al., *Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/AKT signaling-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in liver cancer*. *Carcinogenesis*, 2013. **34**(1): p. 10-9.
42. Im, S., et al., *Hedgehog related protein expression in breast cancer: gli-2 is associated with poor overall survival*. *Korean J Pathol*, 2013. **47**(2): p. 116-23.
43. Yoo, Y.A., et al., *Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer*. *Cancer Res*, 2011. **71**(22): p. 7061-70.
44. Chen, J.S., et al., *Down-regulation of Gli-1 inhibits hepatocellular carcinoma cell migration and invasion*. *Mol Cell Biochem*, 2014. **393**(1-2): p. 283-91.
45. Xu, X., et al., *Sonic hedgehog-Gli1 signaling pathway regulates the epithelial mesenchymal transition (EMT) by mediating a new target gene, S100A4, in pancreatic cancer cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(7): p. e96441.
46. Tang, S.N., et al., *Inhibition of sonic hedgehog pathway and pluripotency maintaining factors regulate human pancreatic cancer stem cell characteristics*. *Int J Cancer*, 2012. **131**(1): p. 30-40.
47. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(3): p. 178-96.
48. Wang, S.S., et al., *Links between cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition*. *Onco Targets Ther*, 2015. **8**: p. 2973-80.
49. Huber, M.A., N. Kraut, and H. Beug, *Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression*. *Curr Opin Cell Biol*, 2005. **17**(5): p. 548-58.
50. Liu, Q., et al., *Gli1 promotes transforming growth factor-beta1- and epidermal growth factor-induced epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer cells*. *Surgery*, 2015. **158**(1): p. 211-24.
51. Zhang, J., X.J. Tian, and J. Xing, *Signal Transduction Pathways of EMT Induced by TGF-beta, SHH, and WNT and Their Crosstalks*. *J Clin Med*, 2016. **5**(4).
52. Song, S., et al., *Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis*. *Virology*, 2000. **267**(2): p. 141-50.
53. Arbeit, J.M., et al., *Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice*. *J Virol*, 1994. **68**(7): p. 4358-68.
54. Riley, R.R., et al., *Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis*. *Cancer Res*, 2003. **63**(16): p. 4862-71.
55. Schaeffer, A.J., et al., *E6 and E7 oncoproteins induce distinct patterns of chromosomal aneuploidy in skin tumors from transgenic mice*. *Cancer Res*, 2004. **64**(2): p. 538-46.
56. Song, S., H.C. Pitot, and P.F. Lambert, *The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals*. *J Virol*, 1999. **73**(7): p. 5887-93.
57. Cortes-Malagon, E.M., et al., *Gene expression profile regulated by the HPV16 E7 oncoprotein and estradiol in cervical tissue*. *Virology*, 2013. **447**(1-2): p. 155-65.
58. Ibarra Sierra, E., et al., *Differential gene expression between skin and cervix induced by the E7 oncoprotein in a transgenic mouse model*. *Virology*, 2012. **433**(2): p. 337-45.

59. Li, X., et al., *Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation*. *Oncogene*, 2006. **25**(4): p. 609-21.
60. Katoh, Y. and M. Katoh, *Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation*. *Curr Mol Med*, 2009. **9**(7): p. 873-86.
61. Isohata, N., et al., *Hedgehog and epithelial-mesenchymal transition signaling in normal and malignant epithelial cells of the esophagus*. *Int J Cancer*, 2009. **125**(5): p. 1212-21.
62. Zheng, X., et al., *Evaluation of glioma-associated oncogene 1 expression and its correlation with the expression of sonic hedgehog, E-cadherin and S100a4 in human hepatocellular carcinoma*. *Mol Med Rep*, 2010. **3**(6): p. 965-70.
63. Tang, C., et al., *Hedgehog signaling through GLI1 and GLI2 is required for epithelial-mesenchymal transition in human trophoblasts*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1850**(7): p. 1438-48.
64. Ding, H., et al., *Sonic hedgehog signaling mediates epithelial-mesenchymal communication and promotes renal fibrosis*. *J Am Soc Nephrol*, 2012. **23**(5): p. 801-13.
65. Wang, F., et al., *Hedgehog Signaling Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Stem-Like Cells*. *J Cancer*, 2016. **7**(4): p. 408-17.
66. Caberg, J.H., et al., *Silencing of E7 oncogene restores functional E-cadherin expression in human papillomavirus 16-transformed keratinocytes*. *Carcinogenesis*, 2008. **29**(7): p. 1441-7.
67. Laurson, J., et al., *Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein*. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(5): p. 918-26.
68. Peng, J., et al., *Meta-analysis of downregulated E-cadherin as a poor prognostic biomarker for cervical cancer*. *Future Oncol*, 2016. **12**(5): p. 715-26.
69. Myong, N.H., *Loss of E-cadherin and Acquisition of Vimentin in Epithelial-Mesenchymal Transition are Noble Indicators of Uterine Cervix Cancer Progression*. *Korean J Pathol*, 2012. **46**(4): p. 341-8.
70. Chan, D.W., et al., *Zic2 synergistically enhances Hedgehog signalling through nuclear retention of Gli1 in cervical cancer cells*. *J Pathol*, 2011. **225**(4): p. 525-34.
71. Yoon, J.W., et al., *GLI activates transcription through a herpes simplex viral protein 16-like activation domain*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(6): p. 3496-501.
72. Sasaki, H., et al., *Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling*. *Development*, 1999. **126**(17): p. 3915-24.
73. Dai, P., et al., *Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(12): p. 8143-52.
74. Bai, C.B. and A.L. Joyner, *Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2*. *Development*, 2001. **128**(24): p. 5161-72.
75. Halbert, C.L., G.W. Demers, and D.A. Galloway, *The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells*. *J Virol*, 1991. **65**(1): p. 473-8.
76. Herber, R., et al., *Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene*. *J Virol*, 1996. **70**(3): p. 1873-81.

77. Arbeit, J.M., P.M. Howley, and D. Hanahan, *Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 2930-5.
78. Murphy, N., et al., *p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer*. J Clin Pathol, 2005. **58**(5): p. 525-34.
79. Deegan, T.D. and J.F. Diffley, *MCM: one ring to rule them all*. Curr Opin Struct Biol, 2016. **37**: p. 145-151.
80. Tachibana, K.E., M.A. Gonzalez, and N. Coleman, *Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology*. J Pathol, 2005. **205**(2): p. 123-9.
81. Ishimi, Y., et al., *Enhanced expression of Mcm proteins in cancer cells derived from uterine cervix*. Eur J Biochem, 2003. **270**(6): p. 1089-101.
82. Ciro, M., et al., *ATAD2 is a novel cofactor for MYC, overexpressed and amplified in aggressive tumors*. Cancer Res, 2009. **69**(21): p. 8491-8.
83. Diaz-Chavez, J., et al., *Down-regulation of transforming growth factor-beta type II receptor (TGF-betaRII) protein and mRNA expression in cervical cancer*. Mol Cancer, 2008. **7**: p. 3.
84. McLaughlin-Drubin, M.E., C.P. Crum, and K. Munger, *Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(5): p. 2130-5.
85. Brake, T., et al., *Comparative analysis of cervical cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: identification of minichromosome maintenance protein 7 as an informative biomarker for human cervical cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8173-80.
86. Kolligs, F.T., G. Bommer, and B. Goke, *Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis*. Digestion, 2002. **66**(3): p. 131-44.
87. Lucero, O.M., et al., *A re-evaluation of the "oncogenic" nature of Wnt/beta-catenin signaling in melanoma and other cancers*. Curr Oncol Rep, 2010. **12**(5): p. 314-8.
88. Rampias, T., et al., *Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(3): p. 433-43.
89. Kitawaki, J., et al., *Progesterone induction of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 during the secretory phase occurs in the endometrium of estrogen-dependent benign diseases but not in normal endometrium*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(9): p. 3292-6.
90. Jung, T.I., et al., *Down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human cervical carcinoma*. Gynecol Oncol, 2005. **97**(2): p. 365-73.
91. Hartshorn, K.L., et al., *Lung and salivary scavenger receptor glycoprotein-340 contribute to the host defense against influenza A viruses*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(5): p. L1066-76.
92. Rosenstiel, P., et al., *Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 8203-11.
93. Du, J., et al., *Loss of DMBT1 expression in human prostate cancer and its correlation with clinical progressive features*. Urology, 2011. **77**(2): p. 509 e9-13.
94. Helmke, B.M., et al., *DMBT1 expression distinguishes anorectal from cutaneous melanoma*. Histopathology, 2009. **54**(2): p. 233-40.

95. Mollenhauer, J., et al., *Sequential changes of the DMBT1 expression and location in normal lung tissue and lung carcinomas*. Genes Chromosomes Cancer, 2002. **35**(2): p. 164-9.
96. Batlle, E., et al., *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 84-9.
97. Barrallo-Gimeno, A. and M.A. Nieto, *The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer*. Development, 2005. **132**(14): p. 3151-61.
98. Liu, Y., et al., *The indicative function of Twist2 and E-cadherin in HPV oncogene-induced epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer cells*. Oncol Rep, 2015. **33**(2): p. 639-50.
99. Cavalcante, J.R., et al., *Progressive loss of E-cadherin immunoexpression during cervical carcinogenesis*. Acta Cir Bras, 2014. **29**(10): p. 667-74.
100. Kaplanis, K., et al., *E-cadherin expression during progression of squamous intraepithelial lesions in the uterine cervix*. Eur J Gynaecol Oncol, 2005. **26**(6): p. 608-10.
101. Callagy, G., et al., *Expression of CD44 in uterine cervical squamous neoplasia: a predictor of microinvasion?* Gynecol Oncol, 2000. **76**(1): p. 73-9.
102. Saegusa, M., et al., *Down-regulation of CD44 standard and variant isoforms during the development and progression of uterine cervical tumours*. J Pathol, 1999. **187**(2): p. 173-83.
103. Bork, P., *The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor*. FEBS Lett, 1993. **327**(2): p. 125-30.
104. Brigstock, D.R., *The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family*. Endocr Rev, 1999. **20**(2): p. 189-206.
105. Lau, L.F. and S.C. Lam, *The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection*. Exp Cell Res, 1999. **248**(1): p. 44-57.
106. Chen, H., et al., *Aberrant methylation of FBN2 in human non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2005. **50**(1): p. 43-9.
107. Hibi, K., et al., *FBN2 methylation is detected in the serum of colorectal cancer patients with hepatic metastasis*. Anticancer Res, 2012. **32**(10): p. 4371-4.
108. Tsunoda, S., et al., *Methylation of CLDN6, FBN2, RBP1, RBP4, TFPI2, and TMEFF2 in esophageal squamous cell carcinoma*. Oncol Rep, 2009. **21**(4): p. 1067-73.