



CENTRO DE INVESTIGACIONES Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.

UNIDAD ZACATENCO.

DEPARTAMENTO DE

GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR.

**LA INTERACCION SINERGICA ENTRE LA ONCOPROTEINA E7 DE VPH 16 Y 17 β -
ESTRADIOL INHIBE LA EXPRESION DE LA FAMILIA DE GRANZIMA B EN
ETAPAS TEMPRANAS EN UN MODELO DE CANCER CERVICAL.**

TESIS

Que presenta

M. en C. JOSE ANTONIO MUNGUIA MORENO.

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS.

EN LA ESPECIALIDAD DE

Genética y Biología Molecular

Directores de la Tesis:

CO-DIRECTOR DE TESIS DR. PATRICIO GARIGLIO VIDAL DEPARTAMENTO DE
GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR, CINVESTAV.

CO-DIRECTOR DE TESIS DR. JOSE DE LA LUZ DIAZ CHAVEZ INSTITUTO
NACIONAL DE CANCEROLOGIA.

Ciudad de México

Septiembre, 2018

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el proyecto CONACYT, número 168896. Y fue apoyado de forma personal por la Beca Numero 164202 y Número de Apoyo 28728.

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Tipos de VPH y su poder oncogénico (PH. and KV. 1995).....	11
Tabla 2. Genes y función de sus productos (PH. and KV. 1995).....	13
Tabla 3. Lista de oligonucleótidos usados en RT-qPCR para la validación de resultados de microarreglos.....	43
Figura 1. Organización genómica del VPH-16.....	12
Figura 2. Desarrollo de la infección viral.....	15
Figura 3. Esquema estructural de la oncoproteína E7.	16
Figura 4. Un modelo basado en la endocitosis mediada por perforina y granzima matando a células diana.....	29
Figura 5. Vías de entrada de perforinas y granzimas a la célula blanco.....	32
Figura 6. La vía citotóxica granzima-B-perforina.....	34
Figura 7. Inhibición de las granzimas, mediada por PI-9.....	35
Figura 8. Regulación de los factores de transcripción de la memoria efectora y diferenciación de células T.	37
Figura 9. Histopatología del tejido cervical de ratón que detecta la expresión de biomarcadores p16INK4a y Ki-67.....	48
Figura 10. Perfil de expresión global de ratones FVB no tratados frente a ratones FVB+E2, K14E7 y K14E7+E2.	50
Figura 11. Ontología génica basada en procesos biológicos.	51
Figura 12. Sinergia del 17β-estradiol y E7 para expresar varios genes relacionados con el cáncer.	52
Figura 13. Sinergia entre el 17β-estradiol y la oncoproteína E7 para reprimir la expresión de la familia de la granzima B.	53
Figura 14. Sinergia entre el 17β-estradiol y la oncoproteína E7 para expresar los factores de transcripción e inhibidor de granzima B, Serpin9b (PI-9).....	54
Figura 15. Inmunofluorescencia de Granzima B y PI-9 en exocervix de tejido de ratones.	55
Figura 16. E7 aumenta la expresión del inhibidor PI-9 en cultivos in vitro.	56

Tabla de contenido

I. ABREVIATURAS.....	6
II. RESUMEN	7
Abstract.....	8
III. INTRODUCCIÓN.....	9
3.1. CÁNCER CÉRVICO UTERINO (CaCU).....	9
3.2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH).....	9
3.3. GENOMA DEL VPH	11
3.4. CICLO DE VIDA DEL VPH.	13
3.4.1. ONCOPROTEÍNA E7.....	15
3.4.1.1. REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA MEDIADA POR E7 VPH16.....	18
3.4.1.2. ESTABILIZACIÓN Y SECUESTRO DE p53 POR E7 VPH-16.....	18
3.4.1.3. VPH16 E7 EVITA LA MUERTE CELULAR.....	19
3.4.1.4. VPH16 E7 PUEDE MODULAR CITOCINAS CITOSTÁTICAS.....	20
3.4.1.5. METABOLISMO CELULAR Y E7.	21
3.4.1.6. INESTABILIDAD CROMOSÓMICA Y E7.....	21
3.5. MODELO MURINO TRANSGENICO PARA EL ESTUDIO DE LA CARCINOGENESIS MEDIADA POR LA ONCOPROTEINA E7 DE VPH16 Y EL ESTIMULO HORMONAL.	22
3.6. FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES A ESTRÓGENOS.....	24
3.6.1. RECEPTORES A ESTRÓGENOS EN EL TRACTO REPRODUCTIVO.	26
3.6.2. RECEPTOR A ESTRÓGENOS EN LA PIEL.....	27
3.7. SISTEMA INMUNE.....	27
3.7.1. PERFORINA	28
3.7.2. GRANZIMAS	29
3.7.3. VÍA PERFORINA/GRANZIMA	30
3.7.4. LA GRANZIMA B Y SUS DIFERENTES RUTAS DE ACTIVACIÓN DE LA APOPTOSIS.....	33
3.7.5. ACTIVIDAD EXTRACELULAR DE LAS GRANZIMAS.....	34
IV. JUSTIFICACIÓN.....	38

V. OBJETIVOS	39
VI. DIAGRAMA DE TRABAJO	40
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	41
7.1. USO DE RATONES TRANSGÉNICOS Y TRATAMIENTO CON E ₂	41
7.2. OBTECIÓN DE TEJIDOS E HISTOPATOLOGÍA.	41
7.3. EXTRACCIÓN DE RNA E HIBRIDACIÓN EN MICROARREGLOS.	42
7.4. ANÁLISIS DE DATOS DE MICROARREGLOS.	42
7.5. RT-PCR EN TIEMPO REAL.....	43
7.6. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA.....	44
7.7. CULTIVO CELULAR.....	45
7.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
VIII. RESULTADOS.....	46
8.1. CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LESIONES CERVICALES DE BAJO GRADO EN EL RATÓN TRANSGÉNICO K14E7.....	46
8.2. EFECTO DE LA ONCOPROTEÍNA VPH16E7 Y 17β-ESTRADIOL EN LA EXPRESIÓN GLOBAL DE GENES EN ETAPAS TEMPRANAS DE CARCINOGENESIS.	49
8.3. VALIDACIÓN DE DATOS DEL MICROARREGLO MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR).	52
8.4. EXPRESIÓN PROTEICA DE GRB Y SU INHIBIDOR, PI-9, EN EXOCERVIX MURINO COMO DETERMINADO POR INMUNOFLUORESCENCIA.	54
8.5 La oncoproteína VPH16-E7 aumenta la expresión del inhibidor de proteasas PI-9 en queratinocitos humanos.....	56
IX. DISCUSIÓN.....	57
X. CONCLUSIONES.....	61
XI.PERSPECTIVAS.....	62
XII. REFERENCIAS.....	63

I. ABREVIATURAS

VPH16	Virus del papiloma humano tipo 16	mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
VPH-AR	Virus del papiloma humano de alto riesgo	PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
VPH-BR	Virus del papiloma humano de bajo riesgo	p16-INK4a	p16 miembro de la familia de inhibidores de cinasas dependientes de ciclina
E7	Oncogén E7	NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
K14E7	Modelo murino que expresa E7, dirigido por el promotor de citoqueratina 14	TZ	Zona de Transformación Cervical
URR	Región larga de control del VPH	RT-qPCR	Retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
DNA	Ácido desoxirribonucleico	CaCU	Cáncer cérvico-uterino
RNA	Ácido ribonucleico	Eomes	Eomesodermin
CR	Región conservada del VPH	GrA	Granzima A
CXXC	Motivo de dedos de zinc	GrB	Granzima B
LXCXE	Motivo de unión a pRB	GrC	Granzima C
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida con dodecil sulfato sódico	GrD	Granzima D
EREs	Elementos de respuesta a estrógenos	GrE	Granzima E
ER α	Receptor a estrógenos alfa	GrF	Granzima F
ER β	Receptor a estrógenos beta	GrG	Granzima G
E ₂	17 β -estradiol	Pfp	Perforina
		pRB	Retinoblastoma
		PI-9	SerpinB9

II. RESUMEN

Los datos epidemiológicos y los modelos animales sugieren que a pesar del papel predominante de la infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), las hormonas esteroides sexuales también están implicadas en la etiología del carcinoma cervical invasivo, sin embargo, el papel del estrógeno en la cooperación con el VPH en la fase temprana de la carcinogénesis cervical es poco conocido. Curiosamente, el 17β -estradiol (E₂) y la oncoproteína VPH16E7 inducen lesiones premalignas y el cáncer de cuello uterino en ratones transgénicos. Además, la retirada prolongada del estrógeno exógeno resulta en la regresión completa o parcial de tumores en este modelo de ratón. En este estudio, se realizó un análisis de microarreglos para obtener un perfil global de expresión génica de dos meses de edad FVB (no transgénicos) y K14E7 ratones transgénicos, no tratados o tratados con E₂. Se encontró un efecto cooperativo entre E7 y E₂ para regular genes y procesos biológicos relacionados con el cáncer, crecimiento celular, apoptosis, metabolismo, proliferación y movimiento. Los datos del microarreglo muestran 527 genes expresados diferencialmente en los ratones K14E7+E₂ en comparación con los ratones control. Encontramos una sobreexpresión de Gdpd3, Il1r2, Nppc, Mgat4c, Lrat, Gyxlt2, SerpinB9 y la inhibición de la familia de genes de Granzima B aparentemente por efecto sinérgico entre E7 y E₂, estos genes no fueron reportados previamente en cáncer cervical. Curiosamente, la represión de los genes de la familia Granzyme B sugiere un posible mecanismo para la evasión de la apoptosis. Este trabajo proporcionaría la base para estudios adicionales sobre el papel de la regulación negativa de Granzima B en la carcinogénesis cervical temprana y el efecto sinérgico entre HR-VPH y estrógeno.

Palabras clave: VPH16E7, 17β -estradiol, microarreglo, carcinogénesis, K14E7, sinergizar, Granzyme.

Abstract

Epidemiologic data and animal models suggest that, despite the predominant role of high-risk human papillomavirus (VPH-AR) infection, sex steroid hormones are also involved in the etiology of invasive cervical carcinoma. However the role of estrogen in cooperation with VPH-AR in the early stage of cervical carcinogenesis is poorly understood. Interestingly, the combined action of 17β -estradiol (E_2) and the VPH16E7 oncoprotein induces premalignant lesions and cervical cancer in transgenic mice. Besides, prolonged withdrawal of exogenous estrogen results in complete or partial regression of tumors in this mouse model. In this study, we performed a microarray analysis to obtain a global gene expression profile of two-month-old FVB (Non-Transgenic) and K14E7 transgenic mice, untreated or treated with E_2 . We found a cooperative effect between E7 and E_2 to regulate genes and biological processes related to cancer, such as cellular growth, apoptosis, metabolism, proliferation and movement. The microarray data show 527 genes differentially expressed in the K14E7+ E_2 mice compared to control mice. We found activation in the expression of *Gdpd3*, *Il1r2*, *Nppc*, *Mgat4c*, *Lrat*, *Gyxt2*, *SerpinB9* and downregulation of Granzyme B gene family expression apparently by a synergistic effect between E7 and E_2 . These genes were not previously reported in cervical cancer. Interestingly, the repression of the Granzyme B family genes suggests a possible mechanism for apoptosis evasion. We think that this work provides a basis for further studies on the role of Granzyme B downregulation in early cervical carcinogenesis and the synergistic effect between VPH-AR and estrogen.

Key words: VPH16E7, 17β -estradiol, microarrays, carcinogenesis

III. INTRODUCCIÓN

3.1. CÁNCER CÉRVICO UTERINO (CaCU).

El cáncer cervical es una de las causas más frecuentes de decesos en mujeres ocupando el segundo lugar a nivel mundial y surgen aproximadamente medio millón de nuevos casos cada año. Hoy en día existen herramientas muy útiles para su diagnóstico; sin embargo, en muchos países no tienen acceso adecuado a pruebas regulares. El cáncer cervical surge en países subdesarrollados a consecuencia de diagnósticos deficientes pacientes con cáncer cervical de alto grado tienen una baja probabilidad de sobrevivencia (Parkin, Bray et al. 2001)

La mayoría de los casos ocurren en países en vía de desarrollo, donde la malignidad constituye alrededor del 24% de todos los canceres en la mujer (Howley and Sharh 1996).

El cáncer cervical se origina en la zona de transformación, la cual está localizada en la capa basal del cérvix en donde las células columnares del endocervix se unen con el epitelio escamoso estratificado de la vagina. Las células que forman la zona de transformación tienen la particularidad de ser más vulnerables a la acción de carcinógeno (Howley and Sharh 1996).

El cáncer cervical invasivo está precedido por un amplio espectro de anormalidades progresivas en el epitelio cervical. Estas anormalidades están clasificadas como lesiones intraepiteliales escamosas (SIL, Squamous Intraepithelial Lesions) de bajo-grado y de alto-grado. Las lesiones preinvasivas son clasificadas como neoplasia intraepitelial cervical (CIN) grado 1, 2 y carcinoma in situ (CIS). El grado de severidad de la lesión se mide por la extensión de epitelio cervical normalmente diferenciado que es remplazado por células de la lámina basal (Howley and Sharh 1996).

3.2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

Casi todos (más del 90 %) los casos de CaCU se deben a tipos específicos de un virus DNA tumoral transmitido por vía sexual, que se denomina virus del papiloma humano (VPH) (Soberón and Saavedra 2006).

El VPH se considera el agente de transmisión sexual más común en todo el mundo. Múltiples estudios han asociado la infección causada por el VPH con el desarrollo de CaCU y lo han considerado como el principal factor etiológico de este tipo de cáncer (Barrie 2004) y (Barrientos, Lasala et al. 2004).

Los VPHs son un grupo de virus de ADN de doble cadena que pertenecen a la familia *Papovaviridae*, no poseen envoltura, y tienen un diámetro aproximado de 52-55 nm (Baumert, Faure et al. 2004).

Las partículas virales están compuestas por una cápside proteica la cual está conformada por dos proteínas, la proteína L1 que es el elemento estructural primario, ya que cada partícula viral contiene 360 copias de la misma, organizada en 72 capsómeros. La proteína L2, que se encuentra en menor proporción (5%) que L1 (95%), se encuentra al centro de cada capsómero pentavalente en los vértices del virión (Barrier, Barc-Pain et al. 2004) y (Torres, Barrier et al. 2004)

Hacia el interior de la cápside se encuentra un DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases, constituido por ocho genes y una región regulatoria no codificante, la cual contiene sitios de unión para factores proteicos y hormonales del hospedero, necesarios para que el virus pueda completar su ciclo de replicación. (Sanabria Negrín 2009)

Los papilomavirus humano han sido agrupados de acuerdo a su asociación con lesiones benignas o con tumores malignos, en virus de bajo y alto riesgo, respectivamente. Dentro de los VPH de alto riesgo se encuentran los tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67, 68 y 70, entre los cuales los tipos 16 y 18 son los de mayor prevalencia en lesiones malignas de cérvix. Por otro lado los tipos 6, 11, 13, 44 y 74 se consideran de bajo riesgo, ya que generalmente se encuentran asociados a lesiones benignas (Barrientos, Lasala et al. 2004; Velázquez-Márquez, Paredes-Tello et al. 2009). Tabla 1 (Lacroix, Mian et al. 2004).

Tabla 1. Tipos de VPH y su poder oncogénico (Lacroix, Mian et al. 2004).

Tipo de VPH	Oncogenicidad	Relación con el tipo de lesión
6,11,42,43,44	Baja	Bajo riesgo (condilomas, precancerosas)
16 y 18	Alta	Alto riesgo (precancerosas, invasoras)
31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68	Intermedia	Alto riesgo (lesiones de tránsito rápido)

3.3. GENOMA DEL VPH

El genoma del VPH es una molécula circular de ADN de doble cadena que está dividida en tres regiones: una región reguladora no codificante, que abarca cerca del 10% del genoma y se denomina región larga de control (LCR; Long control región); la región de genes de expresión temprana (E; Early), denominados así porque codifican las proteínas no estructurales E1, E2, E4, E5, E6 y E7, que se expresan al inicio de la infección y están involucradas en la regulación de la replicación viral y en la oncogénesis; por último, se encuentra la región que contiene los genes de expresión tardía (L; late) que codifica las proteínas estructurales L1 y L2, las cuales conforman la cápside viral. Tabla 2. Figura 1.

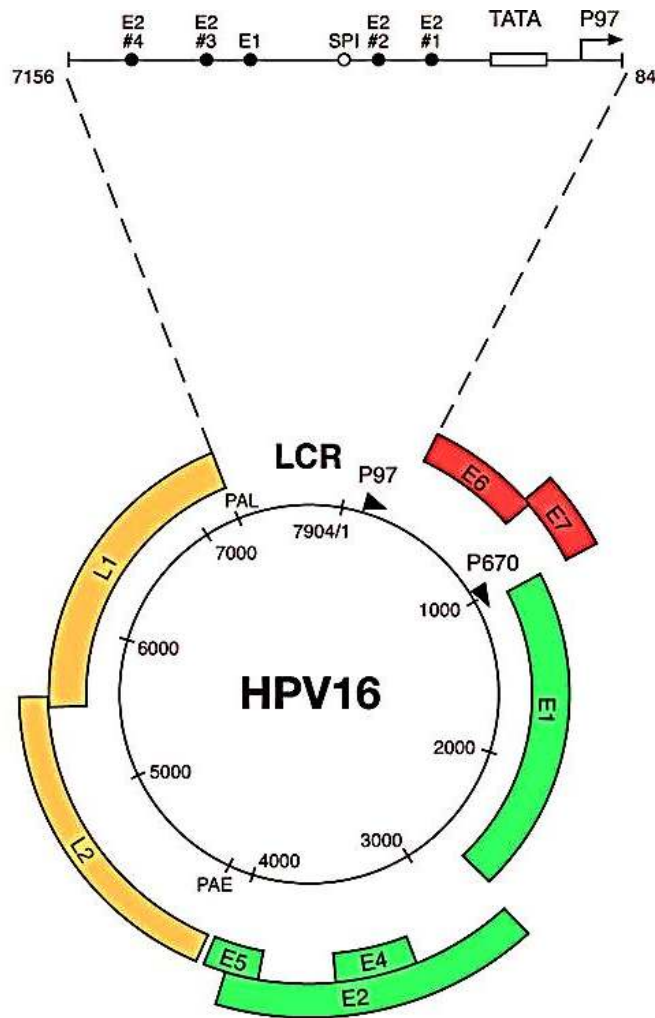


Figura 1. Organización genómica del VPH-16. El genoma del VPH-16 de 7904 pb. Es mostrado en un círculo negro, los números indican la posición de nucleótidos. Los ORFs tempranos y tardíos están representados afuera del genoma de doble cadena circular, los seis ORFs tempranos E1, E2, E4 y E5 (color verde) y E6 y E7 (color rojo) son expresados por el promotor p97. Los ORFs tardíos L1 y L2 (color amarillo) son expresados por el promotor p670. Se encuentran dos sitios de poliadenilación PAE (sitio de poliadenilación temprana) y PAL (sitio de poliadenilación tardía). Todos los genes virales se codifican en una cadena del genoma de ADN de doble cadena circular. La región larga de control (LCR 7156-7184) se amplía para permitir la visualización de los sitios de unión de E2 y el elemento TATA del promotor p97. También se muestra la ubicación de la proteína E1 y sitios de unión SP1 (Doorbar 2006).

Tabla 2. Genes y función de sus productos (Howley and Sharh 1996).

Gen	Función
E1	Participa en el inicio de la replicación y transcripción del DNA viral
E2	Proteína reguladora negativa de la transcripción y auxiliar en el proceso de la replicación del DNA viral.
E4	Rompe la citoqueratina de la célula.
E5	Proteína de transformación de membrana; interactúa con receptores del factor de crecimiento
E6	Proteína de transformación, tiene como blanco de degradación a p53
E7	Proteínas de transformación, se une a la proteína de retinoblastoma
L1	Proteína L1, proteínas de la cápside mayor
L2	Proteína L2, proteína de la cápside menor.

La transcripción de genes tempranos y tardíos es controlada por la región LCR y las proteínas son traducidas de un ARNm policistrónico que contiene marcos de lectura abiertos sobrelapados (Ganguly and Parihar 2009).

3.4. CICLO DE VIDA DEL VPH.

El ciclo de vida del VPH, depende de la biología de la célula hospedera. Las células del epitelio escamoso normal crecen de manera estratificada y en la capa basal se dividen en células madre y de amplificación transitoria (AT) que migran a las capas externas para diferenciarse, mientras las primeras permanecen en la capa basal como una población de baja replicación y autorrenovable, mediante una mitosis asimétrica (Watt 1998). En un epitelio normal, la síntesis de ADN en las células diferenciadas es muy baja, por lo que no puede sostener la replicación del virus; en consecuencia, los papilomavirus tienen que desacoplar los procesos de diferenciación y proliferación; en otras palabras, bloquean la diferenciación de las células AT, las cuáles proliferan descontroladamente. Los viriones de VPH son transmitidos sexualmente al tracto genital donde infectan la capa basal por medio de microlesiones y entran a la célula mediante la interacción con receptores alfa 6

integrina para el caso de VPH16 (Yoon, Kim et al. 2001). El ciclo viral puede ser dividido en dos etapas, una productiva y otra no productiva. En la infección persistente en la capa basal, el ADN viral se sintetiza extracromosomalmente dentro del núcleo de la célula hospedera con un número de entre 50 a 100 genomas por célula; cuando la diferenciación de la célula hospedera ocurre, los nuevos viriones son liberados al medio extracelular. Las proteínas virales E1 y E2 que son las primeras en expresarse, son necesarias para la replicación (Motoyama, Ladines-Llave et al. 2004). Estas dos proteínas forman un complejo que se une al origen de replicación del genoma viral y recluta a la maquinaria de replicación del hospedero. E1 tiene función de helicasa mientras que E2 regula la transcripción de las proteínas tempranas del virus. Niveles altos de E2 reprimen la transcripción de E6 y E7 bloqueando la unión de los factores de transcripción del hospedero al promotor viral (Longworth and Laimins 2004). E4 se expresa solo en las etapas tardías del ciclo de vida viral cuando las partículas virales están ensambladas. E5 en etapas tempranas se expresa en la infección primaria, pero en etapas avanzadas baja la expresión debido a la pérdida del marco de lectura abierto post-integración al genoma del hospedero. Por último, los genes E6 y E7 codifican a las oncoproteínas que causan la transformación de la célula hospedera y están involucradas en mantener al genoma del virus extracromosomal. Las oncoproteínas E7 mantienen un ambiente apropiado para la replicación de ADN y E6 previene la apoptosis. El paso determinante (o cuello de botella) en el desarrollo de cáncer cervical es la integración accidental del ADN viral al genoma celular; cuando se rompe el genoma viral (circular) con una sola región promotora (LCR) en E1 o en E2, baja la expresión del represor transcripcional E2 de la célula y que resulta en la sobreexpresión de E6 y E7 (Jeon and Lambert 1995). Esta integración ocurre cerca de sitios frágiles del genoma humano (Thorland, Myers et al. 2003).

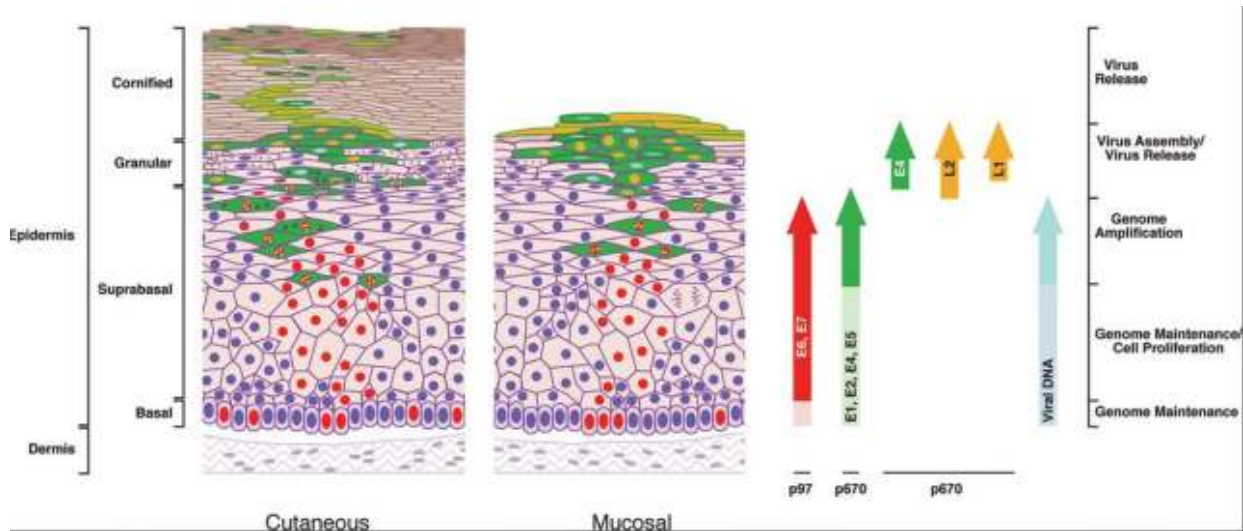


Figura 2. Desarrollo de la infección viral.

La diferenciación del epitelio es representada en el diagrama de la izquierda, y los marcadores expresados son representados en flechas a la derecha. El VPH gana acceso a la lámina basal, estableciéndose con un número bajo de copias en forma episomal. Las proteínas E6 y E7 (puntos rojos) son expresadas por el promotor temprano, p97 en el VPH-16 en las láminas epiteliales bajas (flecha verde). Es activada después de que termina la expresión de E6 y E7. La expresión de las proteínas de la cápside L1 y L2 (flechas color naranja) seguida de la terminación de la amplificación del genoma que ocurre en un subgrupo de células que expresan E4, E1, E2, E5 (células en color verde) (Doorbar 2006).

3.4.1. ONCOPROTEÍNA E7

La proteína E7 es una fosfoproteína compuesta por 98 aminoácidos (a.a), con un peso molecular predicho de 11 kDa, (Smotkin and Wettstein 1986); sin embargo, esta presenta una movilidad electroforética anormal en geles SDS-PAGE con pesos de entre 14 y 21 kDa reportados por varios grupos de investigación. La causa de este efecto es la secuencia acídica en el extremo amino terminal en conjunto con una gran hidrofobicidad y la capacidad para formar oligómeros (Armstrong and Roman 1993). Se sabe que E7 tiene las isoformas E7a1 (17.5 kDa and IEP of 4.68), E7a (17 kDa and IEP of 6.18) y E7b (16 kDa and IEP of 6.96), reveladas mediante el uso de anticuerpos monoclonales y policlonales. La isoforma E7a1 está fosforilada en los residuos 31 y 32 con otro sitio potencial de fosforilación en el

residuo 71. El extremo amino terminal contiene una porción similar a la región conservada de CR1 y la región CR2 completa de la proteína E1A de adenovirus (Ad), dominio donde también se encuentra el antígeno TAg de SV40. (Figue, Webster et al. 1988; Phelps, Yee et al. 1988). Estas dos regiones conservadas contribuyen significativamente a la capacidad transformante de la oncoproteína E7 de alto riesgo (Watanabe, Kanda et al. 1990; Phelps, Munger et al. 1992). Un motivo conservado Leu-X-Cys-X-Glu (LXCXE) en CR2 es necesario y suficiente para la asociación de E7 con la proteína supresora de tumores retinoblastoma (pRB) (Munger, Werness et al. 1989). Adyacentemente a este motivo existe un sitio consenso de fosforilación caseína quinasa II (Barbosa, Edmonds et al. 1990).

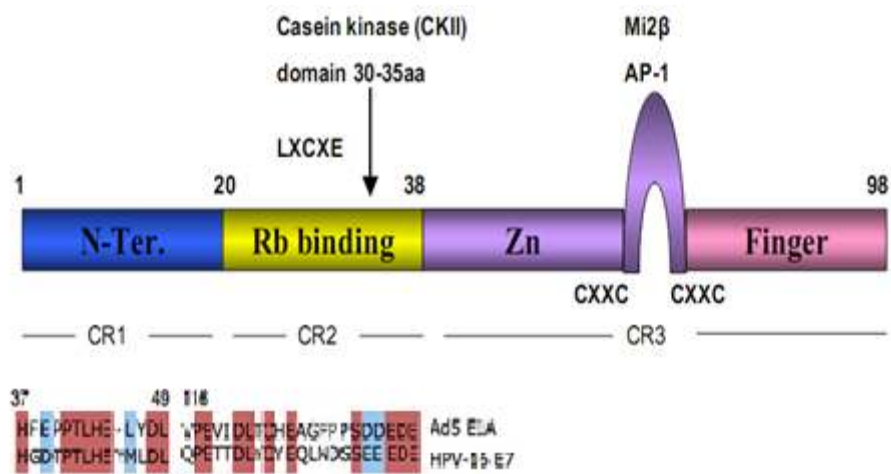


Figura 3. Esquema estructural de la oncoproteína E7 (detalles en texto).

El extremo carboxilo terminal de E7 contiene un dominio de unión a Zn compuesto por dos motivos Cys-X-X-Cys (Barbosa, Lowy et al. 1989), que funciona como un dominio de dimerización, aunque no existe información de que E7 exista como un dímero o si esto es importante para su función (Ohlenschlager, Seiboth et al. 2006). Este motivo también está presente en el carboxilo terminal de E6 en dos copias en tándem, lo que indica, entre muchas otras propiedades, que las dos oncoproteínas virales tienen un ancestro común (Cole and Danos 1987). Los estudios de NMR y cristalografía por rayos x con los que se ha resuelto la estructura tridimensional de la proteína E7 revelan que el amino terminal permanece desplegado mientras que

el carboxilo terminal forma un paquete estrechamente plegado (Liu, Clements et al. 2006; Ohlenschlager, Seiboth et al. 2006).

E7 se localiza principalmente en el citoplasma aunque también existen acumulaciones en el núcleo (Greenfield, Nickerson et al. 1991; Huh, DeMasi et al. 2005). E7 no tiene una secuencia prototipo de importe nuclear pero es transportada activamente por un novedoso sistema dependiente de Ran que no involucra al receptor de importe Kap β (Angeline, Merle et al. 2003). Los ensayos de centrifugación en gradiente de glicerol demuestran que E7 es parte de complejos de alto peso molecular; por lo tanto, a falta de una actividad enzimática propia o de unión específica al ADN, es aceptado que su actividad biológica se debe a su unión a complejos regulatorios celulares (Smotkin and Wettstein 1986), tales como pRB.

E7 VPH-16 se asocia con pRB y con proteínas relacionadas como p107 y p130, a través del motivo LXCXE en el dominio CR2 (Dyson, Guida et al. 1992). La función más estudiada de las proteínas pocket es la habilidad de regular la entrada de G1 a S y su progresión modulando la actividad transcripcional de los factores E2F que son heterodímeros que contienen un E2F (de 1 a 8) y una subunidad DP1 o DP2 (Dyson 1998). La función principal de E7 es inactivar a la proteína supresora de tumores pRB mediante el corte en el carboxilo terminal a través de una cisteína proteasa dependiente de calcio (calpaina) y su eliminación por proteosoma 26S, desestabilizando al complejo supresor transcripcional pRB/E2F1. De forma normal la fosforilación de pRB por la cinasa dependiente de ciclina de G1 libera a E2F1 promoviendo la progresión del ciclo a la fase S del ciclo celular; E7 puede unirse a pRB defosforilado (activo) provocando el paso a S sin control a pesar de la sobre expresión del inhibidor de cinasa p16^{ink4a} que en condiciones normales llevaría al arresto del ciclo celular (Dyson 1998). Esto causa un aumento en la expresión de reguladores del ciclo celular que responden a E2F como cdc25A, ciclina E y ciclina A. Otros blancos de E2F son enzimas de la replicación como dehidrofolato reductasa, timidina cinasa y la DNA polimerasa alfa. E7 también puede inhibir a los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas; por ejemplo, p21^{cip1} que es un blanco transcripcional de p53 y p27^{KIP1} que pueden ser activadas por otros

estímulos inhibitorios del crecimiento TGF- β o TNF- α . De esta manera la replicación del virus se da en células epiteliales diferenciadas en las capas externas que normalmente no realizan ciclo celular (Zerfass-Thome, Zwerschke et al. 1996; Funk, Waga et al. 1997).

3.4.1.1. REPROGRAMACION EPIGENETICA MEDIADA POR E7 VPH16

La proteína E7 también puede asociarse directa o indirectamente a Histonas Acetil Transferasa (HATs) como p300, pCAF, SRC1 (Avvakumov, Torchia et al. 2003); a esta última le impide su actividad (Baldwin, Huh et al. 2006). Se ha demostrado por ensayos de purificación por afinidad que E7 VPH-16 está asociada con las proteínas del grupo polycomb Ring1, Bmi1, Mel18, hpc2 y L3MBTL2 así como a DP1 y 2 (McLaughlin-Drubin, Huh et al. 2008). Por lo que se asume que E7 se une a los complejos E2F6/DP, así como a E2F/PcG. E2F6 es un componente del complejo policomb que en mamíferos actúa como un represor transcripcional que contiene histonas metiltransferasas (HMT) (Attwooll, Oddi et al. 2005). Las HMT modulan la estructura de la cromatina; sin embargo, no se conocen todas las implicaciones que estas asociaciones puedan tener. VPH E7 puede interactuar con histona desacetilasas de clase 1 (HDACs) (Longworth and Laimins 2004), que funcionan como correpresores transcripcionales induciendo la remodelación de la cromatina al eliminar grupos acetilos en los residuos de lisina en las histonas; esta asociación resulta en el incremento del nivel de transcripción mediado por E2F2 en células diferenciadas promoviendo el paso de G1-S (Longworth, Wilson et al. 2005).

3.4.1.2. ESTABILIZACION Y SECUESTRO DE p53 POR E7 VPH-16

La vida media de p53 se incrementa en células que expresan a E7 (Demers, Foster et al. 1994). Esto ocurre por un mecanismo independiente de p14^{ARF}, un inhibidor de la degradación de p53 mediada por mdm2 (Bates, Phillips et al. 1998). Al parecer la ubiquitin ligasa específica de p53 (mdm2) no se une a p53 en células que expresan a E7 en comparación con lo que ocurre en células normales (Seavey, Holubar et al. 1999). Se piensa que existe una correlación entre la degradación de

pRB por E7 y la estabilización de p53, ya que a pesar de los niveles altos de p53 en presencia de E7, (Jones, Thompson et al. 1997) la actividad transcripcional de p53 no funciona, lo cual ha sido verificado en ensayos con reporteros (Eichten, Westfall et al. 2002); además E7 interfiere con el arresto en G1 mediado por p53 en respuesta al daño en ADN (Hickman, Picksley et al. 1994), es posible que esto se deba en parte al secuestro de p21 por E7.

3.4.1.3. VPH16 E7 EVITA LA MUERTE CELULAR

La intervención de VPH-16 E7 en la muerte celular fue revelada inicialmente en ensayos con fibroblastos humanos en cultivo primario, los cuales son predispuestos a la apoptosis cuando crecen privados de factores de crecimiento o cuando alcanzan la confluencia (White, Cipriani et al. 1991; Evan, Wyllie et al. 1992). Este efecto proapoptótico se llama respuesta trófica centinela y representa una vía supresora de tumores que se activa por señales oncogénicas, causa proliferación aberrante y entra en conflicto con una señal inhibitoria del crecimiento por falta de estimulación mitogénica. Se sabe que es importante la vía de p53 para este efecto, pero no es necesaria la sobre expresión de los genes que responden a p53 (Eichten, Westfall et al. 2002). Además, la respuesta no es dependiente de las caspasas ya que no está relacionada directamente con apoptosis (Abarbanel, Gibb et al. 2004). Una forma de apoptosis llamada anoikis es desencadenada cuando las células intentan entrar a la fase S a pesar de la falta de una matriz para adherirse (Frisch and Screatton 2001). Al factor p600, asociado a retinoblastoma, se le relaciona a este fenómeno gracias a experimentos recientes con ARNi (DeMasi, Huh et al. 2005). Se ha demostrado que E7 de VPH de alto riesgo se une a p600 a través del dominio CR1, desregulando la anoikis, lo que evita la apoptosis, y contribuyen a la transformación celular (DeMasi, Chao et al. 2007).

3.4.1.4. VPH16 E7 PUEDE MODULAR CITOCINAS CITOSTATICAS.

El factor TGF β es un potente inhibidor del crecimiento epitelial. La resistencia a su efecto es un marcador de tumores epiteliales (Polyak 1996), resistencia que es característica de las líneas celulares de carcinoma cervical (De Geest, Bergman et al. 1994). La capacidad de E7 para inactivar a p21^{CIP1} y p27^{KIP1}, que están implicadas en la inhibición del crecimiento mediado por TGF- β , es fundamental para conseguir la resistencia (Datto, Li et al. 1995). TGF β induce principalmente a cdk4 y cdk6 así como a p15^{INKB}; sin embargo, la inhibición del crecimiento mediado por este factor requiere de pRB funcional, condición que es evitada por E7 (Hannon and Beach 1994).

Las líneas celulares de carcinoma cervical también adquieren resistencia al factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Villa, Vieira et al. 1992), que es un mediador del sistema inmune producido en las células T citotóxicas en respuesta a las infecciones virales. Los keratinocitos sufren un arresto en G1 y se diferencian como respuesta a TNF α a través de la inducción de p21^{CIP1} por NF- $\kappa\beta$; sin embargo, las células que expresan E7 continúan proliferando (Vieira, Goldstein et al. 1996).

La expresión de E7 también afecta la respuesta a los interferones, uniéndose e inhibiendo la translocación nuclear de p48 y el factor regulador de la expresión de interferón (IRF-1) (Barnard and McMillan 1999; Park, Kim et al. 2000). E7 evita su actividad transcripcional. Por otra parte, se sabe que el interferón- γ inhibe la expresión de E7 e induce a SOCS-1/JAB que se asocia a la degradación (Kamio, Yoshida et al. 2004).

Por último, la señalización por el factor de crecimiento insulínico (IGF) también se ve afectada ya que E7 se une y degrada a IGFBP-3, proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina.(Mannhardt, Weinzimer et al. 2000; Santer, Moser et al. 2007).

3.4.1.5. METABOLISMO CELULAR Y E7.

Las células cancerosas, generan energía vía glicólisis y respiración mitocondrial (Aisenberg 1961). E7 se puede asociar y aumentar la expresión de la Piruvato cinasa (PK) (Zwerschke, Mazurek et al. 1999). Las células que expresan E7 tienen una cantidad mayor de PK en forma de dímero relativamente inactivo que desvía la generación de energía a la glicólisis y no a la fosforilación oxidativa. Así también se puede asociar a glucosidasa α activa alostéricamente y altera el catabolismo del glucógeno; se ha descrito que los cánceres cervicales tienen bajo glucógeno (Mazurek, Zwerschke et al. 2001).

3.4.1.6. INESTABILIDAD CROMOSOMICA Y E7

La expresión de los oncogenes de VPH es necesaria y suficiente para iniciar la carcinogénesis; sin embargo, mutaciones en el genoma del hospedero son necesarias para la progresión maligna. Es claro que las células tumorales tienen una serie de anomalías numéricas y estructurales. El desarrollo de aneuploidías está específicamente asociado con VPH de alto riesgo in vivo (Rihet, Lorenzato et al. 1996), que pueden ser detectadas en lesiones premalignas antes de la integración del genoma viral al genoma del hospedero. Se ha demostrado experimentalmente que E6 y/o E7 en cultivos primarios de células humanas inducen inestabilidad genómica (Hashida and Yasumoto 1991).

La aneuploidia en células que expresan a E6 y/o E7 resulta como consecuencia de la ganancia o pérdida de cromosomas durante la mitosis (Duensing and Munger 2002).

La síntesis de centrosomas está ligada al ciclo celular. Después de cada división las células hijas sólo tienen un centrosoma, que consiste en dos centriolos; al entrar a la fase S los centriolos se dividen y sirven de templado para formar dos centriolos nuevos y complementarios a los de origen; así, la célula queda con dos centrosomas que forman los polos de un huso mitótico bipolar, lo que asegura que cada hija quede con el mismo número de cromosomas (Bettencourt-Dias and Glover 2007).

La proteína E7 induce este fenómeno de una manera dependiente de cdk2 y de forma independiente de Prb/p107/p130 (Duensing and Munger 2003). E7 se asocia con γ -tubulina que es un regulador centrosomal e inhibe significativamente la unión de γ -tubulina al centrosoma (Nguyen, Eichwald et al. 2007).

VPH16 E7 deslocaliza a la proteína motor del micro túbulo, la dineína, del huso mitótico, fenómeno que correlaciona con la pérdida de la coalescencia cromosomal. Esta función de E7 se localiza en el carboxilo terminal en una secuencia diferente al dominio LXCXE que es importante para inducir aneuploidia (Nguyen, McLaughlin-Drubin et al. 2008).

La expresión de E7 también puede causar otras anomalías mitóticas como la pérdida de material cromosomal y fusiones cromosomales causadas por rupturas de doble cadena y por interferencia con los mecanismos de reparación, por lo que no es descabellado pensar que E7 puede facilitar la integración del genoma viral a los cromosomas del hospedero (Kesis, Connolly et al. 1996).

3.5. MODELO MURINO TRANSGENICO PARA EL ESTUDIO DE LA CARCINOGENESIS MEDIADA POR LA ONCOPROTEINA E7 DE VPH16 Y EL ESTIMULO HORMONAL.

Una de las evidencias más fuertes que relacionan a las hormonas como cofactores en el desarrollo del cáncer cervical se ha originado de estudios que utilizan modelos de ratones transgénicos, en los cuales múltiples (E6, E7, E1, E2, E4 y E5) u oncogenes individuales (E6 ó E7) del VPH16 son expresados bajo el control de la citoqueratina 14 (K14) en epitelio escamoso estratificado (piel, cavidad oral, ano, vagina y cérvix). Aunque estos ratones transgénicos pueden desarrollar espontáneamente tumores en la piel, ellos raramente desarrolla espontáneamente cáncer cervical; sin embargo, si son tratados con 17β -estradiol (E_2) eficientemente desarrollaran cáncer cervical. (Song, Liem et al. 2000; Riley, Duensing et al. 2003). Por ejemplo, se ha demostrado que los ratones transgénicos para la región temprana del VPH16 (K14VPH16) no desarrollan espontáneamente cáncer cervical

(independientemente del número de embarazos), mientras que el 100% desarrollan cáncer cervical cuando son expuestos a dosis de 0.25 mg/60 días de E₂ durante seis meses. Para el caso del tratamiento con E₂ en los ratones no transgénicos, se observa una capacidad incrementada de proliferación en el epitelio del tracto reproductivo, que resulta en una zona hiperplásica que retiene la habilidad de diferenciarse (Arbeit, Howley et al. 1996). En otro estudio se descubrió que la reducción en 5 veces de la dosis de la hormona (0.05 mg/60 días) indujo carcinogénesis escamosa únicamente en la zona de transformación cervical; además encontraron que la metaplasia escamosa se originaba en las células de reserva glandulares. Por lo tanto, proponen que una combinación de dosis bajas de estrógenos y bajos niveles de expresión oncogénica del VPH predisponen a las células de reserva glandulares de la zona de transformación hacia el epitelio escamoso, más que al columnar (Elson, Riley et al. 2000). Para investigar el papel individual de la oncoproteína E6 o E7 en sinergismo con E₂ se usaron los modelos K14E6 y K14E7, respectivamente. Este estudio demostró que la oncoproteína E7 del VPH16 y el E₂ son capaces de producir displasia en alto grado y cáncer invasivo a los seis meses, sin embargo, la expresión de E6 solamente induce displasia cervical de bajo grado, sin progresión adicional durante los seis meses de tratamiento con E₂. No obstante, la coexpresión de E6 y E7 en ratones dobles transgénicos (K14E6E7) tratados con estrógenos genera tumores mucho más agresivos, llevando a la conclusión de que E6 contribuye tardíamente a la carcinogénesis cervical (Riley, Duensing et al. 2003). En base a estas evidencias, surge la interrogante de saber en qué etapas del cáncer cervical los estrógenos desempeñan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. En un trabajo en el cual utilizan modelos murinos K14E7 y K14E6E7, se demostró que tras el tratamiento con E₂ durante nueve meses se originaban tumores cervicales más grandes en comparación con el tratamiento de seis meses, los cuales producía tumores menos agresivos. Además, observaron que cuando cesó el tratamiento con el estrógeno a los seis meses y se dio seguimiento por tres meses más, los modelos murinos tuvieron regresión de los tumores, particularmente del cérvix. De lo anterior concluyen que el E₂ contribuyen no sólo al inicio, sino a la persistencia y al desarrollo

continuo del cáncer cervical de los modelos K14E7 y K14E6E7 (Brake and Lambert 2005). Dada la importancia del E₂ en inducir cáncer cervical, también se ha investigado el papel de su receptor nuclear alfa. En un estudio se demostró que el tratamiento con E₂ en modelos K14E7 deficientes al receptor de estrógenos alfa (K14E7/ER $\alpha^{-/-}$) falla en producir displasia o cáncer cervical (Chung, Wiedmeyer et al. 2008) y que es el dominio de unión al DNA del receptor alfa (DBD) el importante para la carcinogénesis cervical en estos modelos (Son, Park et al. 2014). Además, se ha demostrado que el fulvestrant, un modulador selectivo del receptor a estrógeno, promueve la regresión de displasias de alto grado y cáncer cervical en el modelo K14E6E7 (Chung and Lambert 2009).

Los mecanismos por los cuales los estrógenos contribuyen al cáncer no son totalmente claros, pero se ha demostrado que sus metabolitos dañan al DNA y de esta manera podrían contribuir al inicio de lesiones cervicales. También se ha reconocido que son potentes mitógenos y por lo tanto podrían contribuir a la promoción del tumor

Una de las consecuencias más notables de la expresión de la oncoproteína E7 es la inducción de la síntesis de DNA en una tasa más alta que en los ratones no transgénicos. Además, la expresión de E7 en la capa basal del epitelio escamoso estratificado causa hiperplasia en las orejas, en la piel del dorso, en el paladar, en el esófago, en el estómago aglandular y en el exocérvix (Herber, Liem et al. 1996). El estudio del ratón K14E7, también ha revelado que E7 VPH16 inhibe la respuesta inducida por daño al DNA. Este efecto puede acelerar la acumulación de mutaciones necesarias para que las células infectadas con VPH-AR lleguen a ser malignas (Song, Gulliver et al. 1998).

3.6. FUNCION DE LOS RECEPTORES A ESTROGENOS.

Los estrógenos inducen cambios celulares mediante diferentes mecanismos. En especial el 17 β -estradiol (E₂) tiene un rol central en la proliferación y diferenciación de células responsivas a través del cambio en el patrón de expresión de genes blanco en un tejido responsivo. La proteína central, en la vía activada por E₂, es el

receptor a estrógenos (ER) que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares (Feigelson and Henderson 1996). El estrógeno se une a sus receptores en el citoplasma e induce homodimerización y es translocado al núcleo, donde activa o reprime genes por medio de dos mecanismos: Clásico, donde estrógeno-ER se une a elementos de respuesta a estrógenos (ERE, del inglés Estrogen Receptor Element) y regula la expresión de sus genes diana, y No-clásica, donde el estrógeno-ER se une a los factores de transcripción AP1 y SP1 para modificar la función de estos factores. El estrógeno también puede unirse al receptor de membrana GPR30, el cual es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G. La unión estrógeno-GPR30 conduce a la activación de varias vías de señalización, incluidas pero no limitadas a las vías fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la señalización por Ca^{2+} (vía no genómica) .

En ausencia de E_2 , el receptor de estrógenos se une a corepresores y se inicia la formación de heterocromatina inactiva en transcripción de los genes blanco de esta vía. En los últimos años se han identificado factores involucrados en la transactivación mediada por ER; entre ellos encontramos al complejo SWI/SNF que altera la disposición espacial de los nucleosomas en forma dependiente de ATP (Belandia, Orford et al. 2002), y las histonas acetil transferasas, así como a miembros de la subfamilia p160, a SCR1 o p300/CBP y p/CAF (Onate, Tsai et al. 1995). Al mencionado complejo coactivador se pueden unir histonas metil transferasas como CARM1 o PRMT1 que metilan argininas en las histonas (Marmorstein 2001) con la finalidad de modificar la arquitectura nucleosomal. La inducción de la transcripción requiere la formación del complejo de preinicio (PIC) que comprende seis complejos TFII del A al F y la ARN polimerasa II (Berk 1999). En algunos promotores primero se une TBP, una sub unidad de TFIID, a la caja TATA y el complejo se estabiliza por TFIIA. Después se une TFIIIB para asistir en la selección del sitio de inicio, seguido por la ARN pol II completando el proceso de preiniciación. Más tarde, el inicio involucra la unión de remodeladores estructurales del complejo mediador TRAP, los cuales estimulan la fosforilación del extremo carboxiterminal (CTD) de la subunidad larga de la Pol II por TFIIH (Malik and Roeder

2000), cambiando el complejo mediador por el elongador. Se ha demostrado experimentalmente que ER α tiene contacto con TFIIB, TFIIE y TFIIIF y con subunidades de TFIID, TAFs y TBP lo que sugiere un papel directo en la activación transcripcional (Sabbah, Kang et al. 1998), con lo que se incrementa o disminuye el nivel de ARNm y por ende la producción de proteína de los genes blanco de E₂. La respuesta fisiológica a E₂ se induce por un mecanismo que tiene lugar en horas; sin embargo, los estrógenos pueden tener un efecto más rápido por un mecanismo no genómico a través de receptores en la membrana o adyacentes a ella; también al interactuar con proteínas no miembros de la familia de receptores, que se unen a estrógenos e incrementan los niveles de Ca²⁺, NO y activa cinasas. Los ER pueden estar acoplados a la membrana por medio de proteínas adaptadoras como caveolina 1 o Shc (Deroo and Korach 2006). Son codificados por dos genes; ER α y ER β los cuales tienen diferentes patrones de expresión tisular. Tanto en ratones como en humanos (Mueller and Korach 2001), ER α y ER β son codificados en distintos genes ESR1 y ESR2 localizados en diferentes cromosomas; existe un número importante de variantes derivadas de corte y empalme, en el caso de tejidos sanos o enfermos, pero la función exacta de las variantes no se conoce (Herynk and Fuqua 2004).

3.6.1. RECEPTORES A ESTROGENOS EN EL TRACTO REPRODUCTIVO.

La producción de ratones Knock out para los receptores ER α y ER β ayudó a ilustrar el mecanismo de ambos receptores. Normalmente en las hembras el tracto reproductor crece y madura en respuesta al ciclo de las hormonas ováricas incluidas el estradiol. Esta maduración y crecimiento de la porción epitelial y la preparación de la capa estromal es muy importante para la implantación del embrión y el embarazo. La infertilidad de las hembras ER α KO está determinada por la insensibilidad del útero al estímulo mitógeno y de diferenciación de los estrógenos. El análisis microscópico revela que el tejido cervical de los animales ER α (-/-) aparece inmaduro con un número reducido de glándulas en el endometrio. Por tanto se puede concluir que los receptores α no son necesarios para el desarrollo del útero

pero si para su maduración y función. En contraste, el tracto reproductor de las hembras ER β KO es indistinguible del proveniente de hembras silvestres, en el desarrollo y organización del estroma, así como de las capas miométricas y epiteliales, y las estructuras glandulares. Aparentemente ER β no es requerido para el desarrollo normal del aparato reproductor (Curtis Hewitt, Couse et al. 2000).

3.6.2. RECEPTOR A ESTROGENOS EN LA PIEL

La piel es un tejido responsivo a los estrógenos y se ha demostrado mediante inmunohistoquímicas que el ER β es el receptor predominante en el cuero cabelludo de los humanos donde es expresado en el estrato basal y en el estrato espinoso (Thornton, Taylor et al. 2003). Otra evidencia que avala esta observación es que los keratinocitos epidermales humanos expresan sólo el mensajero y la proteína de ER β (Kanda and Watanabe 2003); sin embargo, si los queratinocitos son cultivados en medio con un compuesto estrogénico, también pueden expresar al receptor ER α (Verdier-Sevrain, Yaar et al. 2004). En ratones, los datos de la expresión en piel de ambos receptores no son suficientes, pero podemos mencionar que en los folículos pilosos de ratón también la expresión dominante es del receptor ER β .

3.7. SISTEMA INMUNE

La defensa inmunológica contra infecciones virales y células malignas depende de la acción de los linfocitos T citotóxicos (CTL) y las células *natural killer* (NK). Éstos utilizan dos rutas para lisar células blanco que se activan una vez que los receptores de membrana han reconocido determinados antígenos en estas células. La primera se relaciona con un mecanismo secretor de granulos, que implica procesos de exocitosis del contenido de gránulos ya maduros (granzimas y perforinas) que poseen los CTL y las NK en su citoplasma, mientras que la segunda está mediada por la expresión del ligando FAS (FasL), que interactúa con los receptores Fas (FasR) de la célula blanco. (Ginns and Barrie 2004).

La sinapsis inmunitaria se genera durante la comunicación íntima entre la célula efectora y la célula blanco. Como se mencionó anteriormente, una vez establecido el contacto, las células efectoras liberan gránulos que contienen perforinas (Pfp) y granzimas (Gzms) dentro de la célula que se va a destruir (Rabinovich 2004).

3.7.1. PERFORINA

La perforina, es una proteína de 70 kDa que se encuentra en forma de monómeros en el interior de los gránulos y cuando se secreta, se inserta dentro del núcleo hidrofóbico de la membrana de la célula diana, y se polimeriza con otras moléculas de Pfps, lo que requiere la presencia de concentraciones de Ca^{2+} de alrededor de 1-2 mM, valores que coinciden con los de la concentración citoplasmática. La Pfps polimerizada actúa como un poro transmembranal hidrofílico anfifílico en la célula diana, que permite el acceso de iones y de las Gzms al interior de la célula (Kagi, Ledermann et al. 1996). El modelo de endocitosis mediado por Pfps y Gzms se explica en la Figura 4.

La perforina puede originar tal número de poros, que a la célula diana le resulta imposible restablecer el incremento en iones y agua en su interior; por tal aumento de la permeabilidad esto produce hinchazón osmótica y posteriormente lisis celular (Kagi, Ledermann et al. 1996).

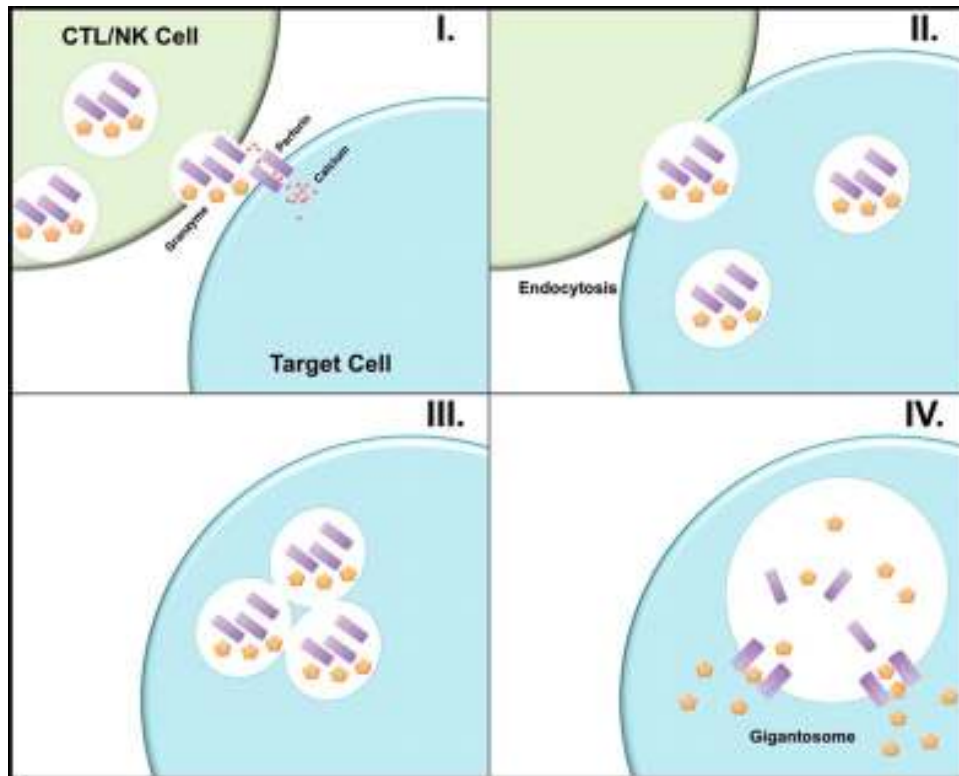


Figura 4. Un modelo basado en la endocitosis mediada por perforina y granzima matando a células diana.

La Perforina forma pequeños poros en la membrana, lo que permite la entrada de Ca^{2+} en la célula diana. II. El influjo de Ca^{2+} desencadena una respuesta al daño a la membrana, lo que resulta en la endocitosis de las membranas celulares de CTL/NK y los contenidos de los gránulos asociados (endosomas). III. Endosomas tempranos se fusionan para formar grandes vesículas denominadas gigantosomas. IV. Gigantosomas fallan en acidificar al endosoma lo que impide la destrucción del contenido de los gránulos que se liberan al citosol de la célula blanco y en un proceso mediado por Pfps, se forman grandes poros en la membrana del gigantosoma permite la liberación de granzima. (Navarro-Lerida, Corvi et al. 2004).

3.7.2. GRANZIMAS

Las granzimas (enzimas granulares) son una familia de serin-proteasas altamente homólogas contenidas en los gránulos citotóxicos de las células de la inmunidad

innata y adaptativa. Su principal tarea es inducir la muerte de células infectadas por virus y células tumorales (Chowdhury and Lieberman 2008).

Hay 5 granzimas expresadas en humanos: granzimas A, B, H, K y M, y 11 en ratones (A, B, C, D, E, F, G, K, L, M y N). Las granzimas A y B son las más abundantes. (Barriere, Mellen et al. 2004).

3.7.3. VÍA PERFORINA/GRANZIMA

Como ya mencionamos, esta vía es importante en diferentes situaciones de relevancia biológica como el rechazo alógeno, la muerte de células tumorales, la eliminación de algunos virus y en la homeostasis de los linfocitos. Tanto en los CTL CD8⁺ activados como en las células NK, ocurre la exocitosis de los gránulos para inducir la muerte de las células blanco. En las células NK, los gránulos se encuentran preformados, pero estímulos como la IL-2 y el IFN- γ pueden inducir su neoformación.

Por otro lado, los pre-CTL requieren un proceso de activación previa que puede durar de uno a tres días para la formación de los gránulos. Los CTL pueden eliminar múltiples células blanco gracias a que pueden reorientar sus gránulos hacia otras regiones de contacto; en contraste, las células NK requieren organizar de nuevo su maquinaria lítica en respuesta al estímulo con IL-2 antes de ser efectivas contra su blanco.

Cuando los CTL reciben por TCR (Receptores de Célula T) señales específicas para su activación y proliferación, se disparan mecanismos transcripcionales que llevan a la síntesis de las proteínas que constituyen los gránulos. En el transcurso de uno a dos días, los genes para perforina, granzima A, granzima B y otras granzimas tienen alta actividad transcripcional, y estas proteínas sintetizadas de *novo* son luego transportadas y ensambladas en los gránulos funcionales. Tanto las granzimas como las perforinas sufren modificaciones postranscripcionales para asumir una conformación activa.

Las granzimas son glicosiladas y seleccionadas por el receptor de manosa-6-fosfatos en el aparato de Golgi en su camino hacia los gránulos especializados. Después de la interacción del linfocito efector con las células diana, los gránulos que permanecían en el citoplasma son orientados rápidamente hacia el sitio de contacto, se fusionan con la membrana plasmática de la célula y secretan su contenido en la sinapsis entre la célula efectora y la célula diana.

La perforina, en presencia de calcio se polimeriza y forma una estructura en forma de anillo que se inserta en la membrana de la célula diana; actúa de manera sinérgica con las granzimas proapoptóticas para facilitar su acción sobre la célula blanco, pero el mecanismo de esa sinergia no está totalmente esclarecido. Durante mucho tiempo se aceptó que la perforina formaba poros o canales en la célula blanco similares a los del complejo de ataque de membrana del complemento, los cuales llevaban por un lado a la muerte de la célula blanco por daño en la membrana y alteración osmótica, y por otro actuaban como puerta de entrada para otras proteínas citotóxicas como la granzima B (Gzm B) que inducían la muerte apoptótica. Esta última explicación ha sido reconsiderada porque se ha demostrado que el tamaño de los canales creados por la perforina es pequeño, alrededor de 16nm, lo cual no permite el ingreso de proteínas como las granzimas cuyo peso molecular oscila entre 30 y 65 kDa.

La perforina es una proteína muy conservada entre las especies, no tiene isoformas conocidas y tiene muy poca similitud estructural con los componentes del complejo de ataque a membrana del complemento. La perforina funcional es una proteína esencial para el funcionamiento de los CTL y las células NK. Aunque tiene una potente actividad citotóxica en la célula blanco, es completamente inocua para la célula efectora que la secreta. Una explicación para esta dualidad es que la perforina es incapaz de unirse a fosfolípidos de membrana cuando hay bajas concentraciones de calcio, como las que se encuentran en el ambiente intracelular, además para ser activada, la perforina requiere pH mayor de 6.2, y en los gránulos citolíticos hay un pH ácido de 4.9 a 5.2. Sin embargo, en el retículo endoplásmico se encuentra pH neutro y altas concentraciones de calcio, que lo harían susceptible

al daño por las perforinas; para explicar su inactividad en este compartimento, se ha postulado que la glicosilación de la perforina la mantiene inactiva al interior de la célula, y cuando es liberada de los gránulos citolíticos sufre deglicosilación directa o una excisión proteolítica de 12 a 20 aminoácidos, que la convierten en la forma activa que produce la muerte de la célula blanco.

Un mecanismo alternativo que se ha planteado para explicar la entrada de las granzimas a la célula blanco es la “endocitosis reparativa”: la ubicación de la perforina en la membrana de la célula blanco genera una señal de reparar el daño, lo que permite la endocitosis de la perforina y granzimas liberadas al citoplasma y transportadas al núcleo de la célula blanco, donde inducen apoptosis. (Figura 5)

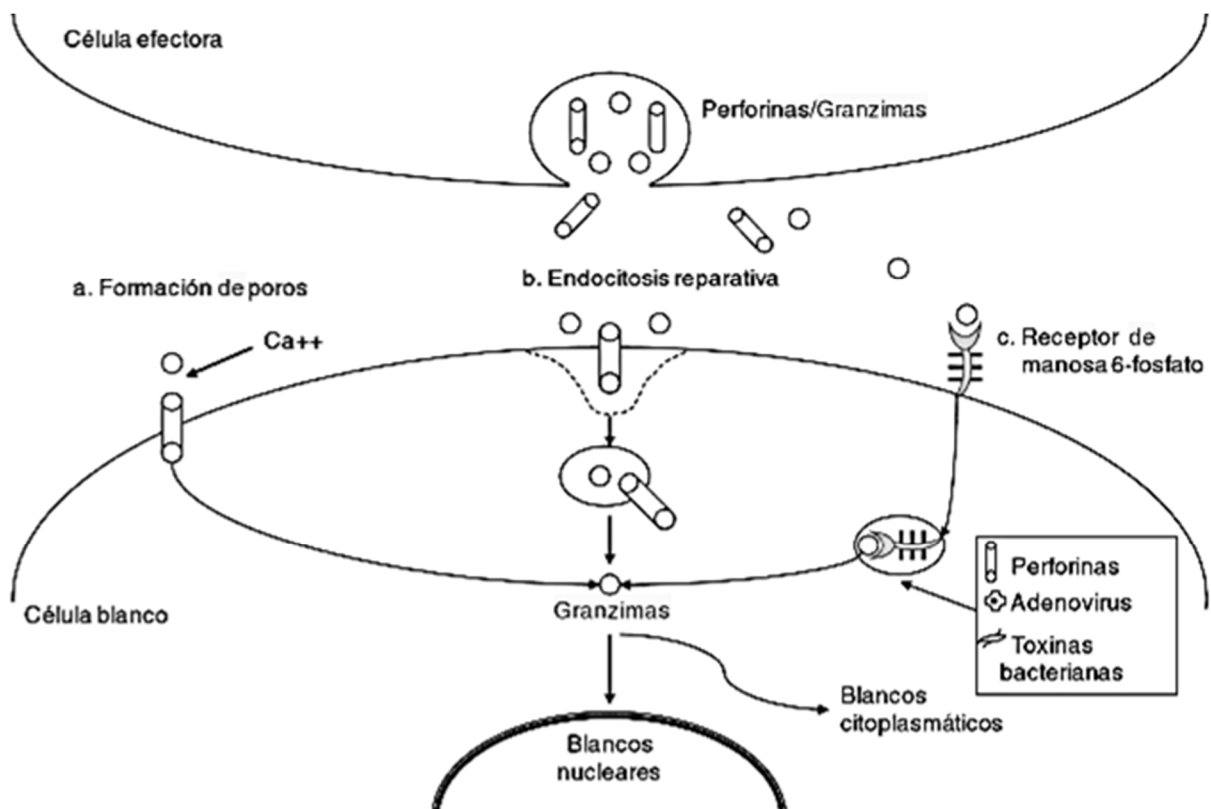


Figura 5. Vías de entrada de perforinas y granzimas a la célula blanco.

- La perforina se polimeriza en presencia de calcio y se inserta en la membrana de la célula blanco, formando unos poros a través de los cuales podrían entrar las granzimas (hipótesis inicial que ha sido revaluada).
- El daño que provoca la perforina en la membrana induce una respuesta de

endocitosis reparativa, por medio de la cual entran las perforinas que están incrustadas en la membrana y las granzimas que están en la vecindad. c. La granzima B, particularmente, puede entrar a la célula blanco como consecuencia de la unión al receptor de manosa-6-fostafo; después de ser internalizada, se libera del endosoma por acción de diferentes agentes como las perforinas, algunos adenovirus o toxinas bacteriana. La granzima B induce la apoptosis por acción sobre sustratos de la vía extrínseca e intrínseca (caspasas y Bid) en el citoplasma y el núcleo (Rugeles, Patiño et al. 2009).

3.7.4. LA GRANZIMA B Y SUS DIFERENTES RUTAS DE ACTIVACIÓN DE LA APOPTOSIS.

La GzmB inicia la cascada proteolítica de las caspasas, activando las caspasas-3 y -8, cruciales en la inducción de apoptosis, previa activación a través de la escisión de residuos internos de ácido aspártico. Por otro lado, GzmB es capaz de activar la apoptosis por una vía independiente de las caspasas, a través de la mitocondria; este organelo posee un papel central en la inducción de la apoptosis y sufre importantes alteraciones fisiológicas durante este proceso, como interrupción de la cadena de transporte de electrones y modulación de la energía metabólica (ATP), producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y liberación de proteínas proapoptóticas, como el citocromo c. Figura 6.

La Gzm B activa una proteína citosólica denominada BID, la cual induce cambios en el potencial de membrana de la mitocondria y la activación de genes proapoptóticos como Bax y Bak. Este cambio de potencial genera la liberación de productos como el citocromo c, que activa el apoptosoma y la procaspasa 9 causando la apoptosis de la célula agredida. Durante la inducción de apoptosis ocurre la fragmentación del DNA por dos endonucleasas: la endonucleasa G (que es liberada en la mitocondria) y la CAD (*caspase-activated deoxynuclease*). La enzima CAD se halla presente en el citoplasma en forma inactiva, acoplada a su inhibidor ICAD. Luego de la inducción de la cascada apoptótica, ICAD es escindida e inactivada por la caspasa-3. Recientemente, se ha demostrado que ICAD también es sustrato de GzmB, lo que da como resultado la fragmentación del DNA independientemente de la activación de las caspasas. Los linfocitos no son

susceptibles a las granzimas y perforinas que ellos mismos liberan porque expresan un inhibidor de proteasas llamado PI-9 que los protege de la activación de la GzmB (Rabinovich 2004).

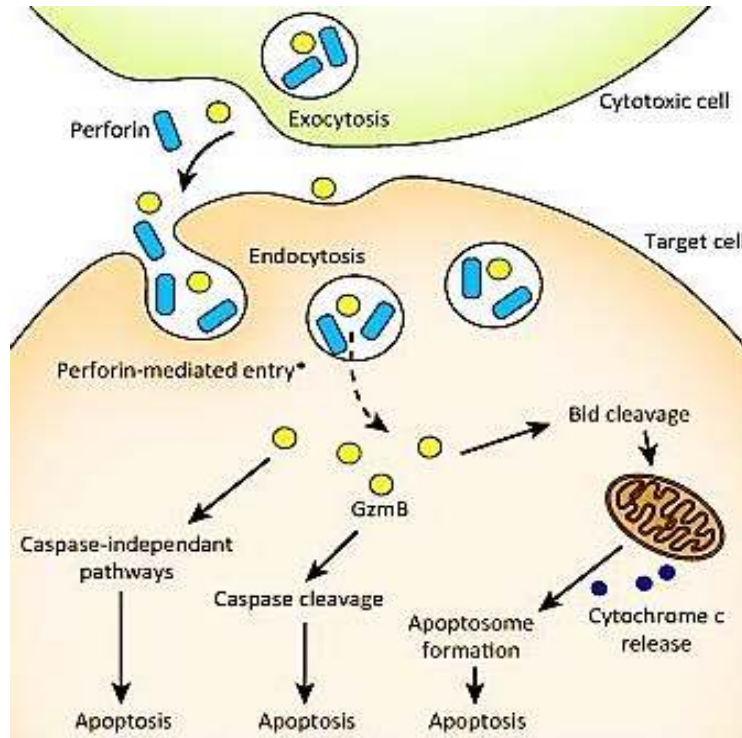


Figura 6. La vía citotóxica granzima-B-perforina.

3.7.5. ACTIVIDAD EXTRACELULAR DE LAS GRANZIMAS

La GzmB puede actuar fuera de la célula y degradar componentes de la matriz extracelular (EMC); se libera de forma constitutiva y no específicamente por las células NK y linfocitos en los espacios extracelulares durante la inflamación crónica. Interesantemente, también se ha descrito la expresión y actividad de la granzima B en células que no pertenecen al sistema inmune, cuyas funciones pueden ir desde la reparación de daño a la epidermis hasta un mecanismo de defensa epidermal. En estudios anteriores se ha descrito que los rayos UVB inducen la expresión y secreción de granzima B en queratinocitos humanos pudiendo estos degradar componentes de la matriz extracelular después de la irradiación con UVB. Por otro lado, se ha observado que la expresión de la granzima B por los queratinocitos

puede ser un sistema de defensa contra agentes patógenos. En el mismo sentido, la fibronectina es un sustrato extracelular de la GzmB, y de manera interesante se ha descrito que los fragmentos de fibronectina exhiben potencial de quimiotaxis y promueven el reclutamiento de monocitos, fibroblastos y células endoteliales. Fragmentos de fibronectina también estimulan la migración trans-endotelial de leucocitos mononucleares mediante la promoción de la producción del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y funcionan como "señales de peligro" que promueven la inflamación y el daño mediante la estimulación de los receptores tipo Toll (TLR) (Parkinson, Toro et al. 2015).

Es importante mencionar también que la inducción por estrógenos del inhibidor de la granzima B, inhibidor de proteinasa 9 (PI-9), protege a las células blanco contra la apoptosis mediada por los linfocitos T citotóxicos y las células Natural Killer (Jiang, Orr et al. 2006).

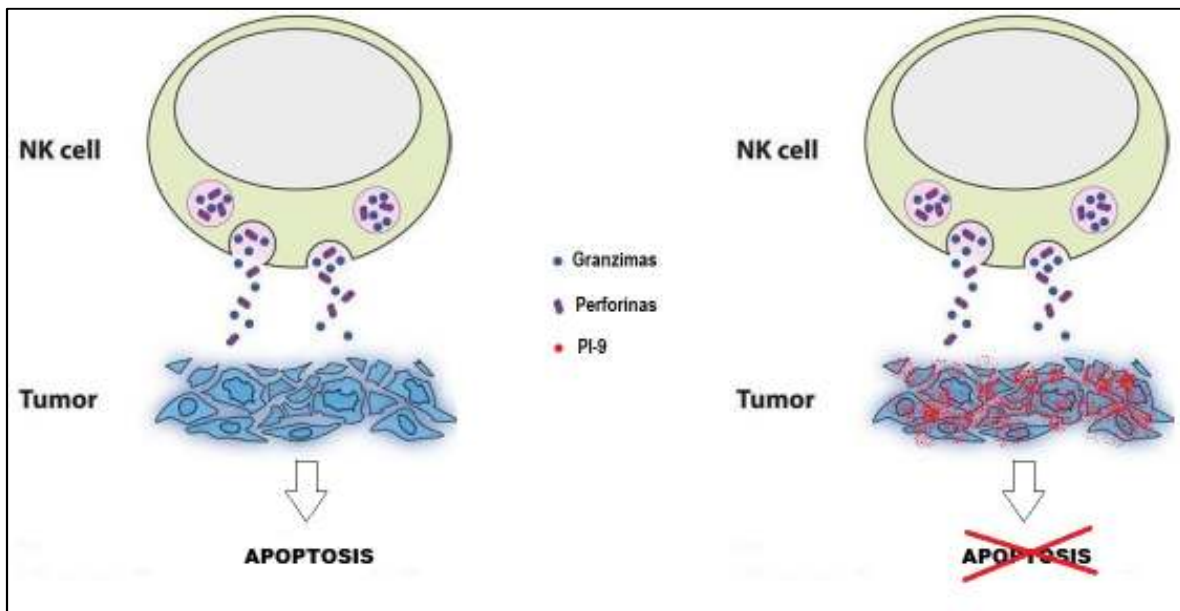


Figura 7. Inhibición de las granzimas, mediada por PI-9.

Para que el TCR se una a la molécula MHC de clase I, el primero debe ir acompañado de una glicoproteína llamada CD8, que se une a la parte constante de la molécula MHC clase I. Por lo tanto, estas células T se llaman células T CD8+.

Los factores de transcripción más importantes que participan en la expresión de granzimas son T-bet y eomesodermina (EOMES). Estos factores de transcripción se comportan como reguladores clave de programas de genes involucrados en la citotoxicidad de CTL y de NK.

T-bet, factor de transcripción de T-box, es expresado no sólo por células comprometidas hacia un perfil Th1 (Linfocito T helper 1), sino también por linajes de células citotóxicas, como células T CD8⁺, células NK y células NKT (Natural Killer con marcadores de células T). El blanco mejor definido de la activación de T-bet es el gen IFN- γ , pero este factor también cumple un papel protagónico en la transcripción de los genes que codifican granzima B y perforinas.

Por lo tanto, T-bet posee una importante función en la citotoxicidad al favorecer tanto la producción de IFN- γ , como la de GzmB/Pfp y suministra a la célula citotóxica la capacidad necesaria para ejercer citotoxicidad sobre células infectadas por virus y sobre células tumorales.

EOMES se expresa en forma selectiva en células T CD8⁺ y células NK pero no en células T CD4⁺. La expresión de EOMES es también importante para la producción de IFN- γ , granzima B y perforinas (Fainboim and Geffner 2005).

Se conoce bien que las células NK son menos citotóxicas en ausencia de T-bet, lo cual es posiblemente causado por una producción decreciente de perforina y granzima B.

Estudios en murinos sugieren que T-bet, pero no EOMES, es directamente involucrado en la producción de moléculas citotóxicas.

Reducción en niveles de T-bet y EOMES en células NK ocurre durante el envejecimiento y es asociada con un deterioro de la citotoxicidad de células NK (Simonetta, Pradier et al. 2016).

Por otro lado, la interleucina-2 (IL-2) es una citocina clave necesaria para la inducción de la proliferación y supervivencia de las células T activadas. Es importante destacar que los altos niveles de señalización de IL-2 en el momento de

la activación de los CTL contribuyen a la expresión característica de genes efectores incluyendo la expresión de GzmB y Pfp. La regulación dependiente de IL-2 para la diferenciación de los efectores de CTL es principalmente por la vía de señalización de IL-2RB (Fracción beta del receptor de interleucina 2) y la posterior activación de STAT5. Esto resulta en la unión de STAT5 activado al promotor GzmB, ayudando así a promover la transcripción de genes. En contraste, el aumento de la expresión de Pfp requiere en primer lugar STAT5 para unirse a elementos reguladores dentro del promotor del gen Eomes y posteriormente la expresión de Eomes regula positivamente el promotor de Pfp (Mitchell and Williams 2013) (Figura 8).

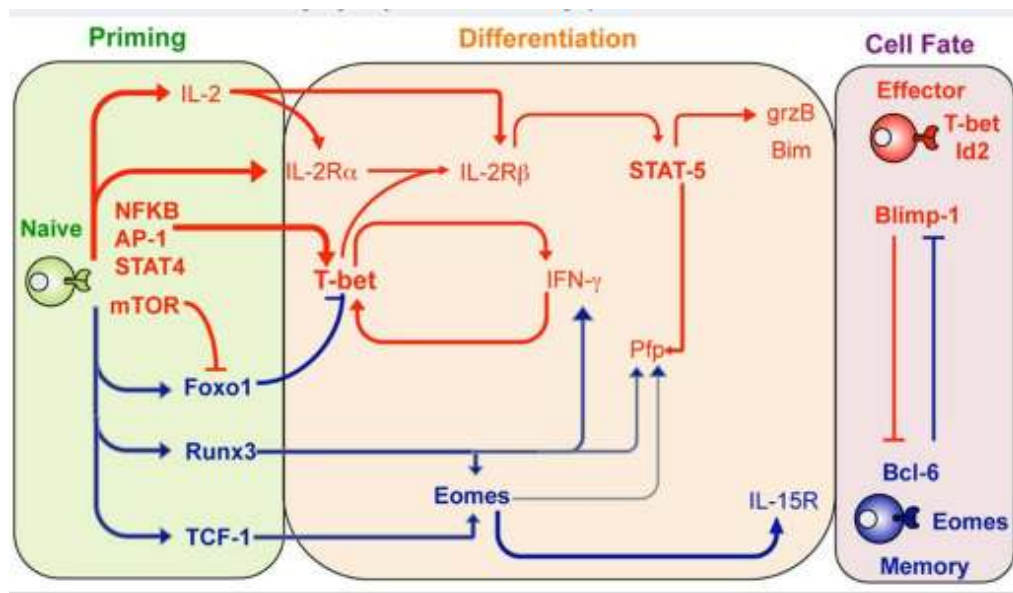


Figura 8. Regulación de los factores de transcripción de la memoria efectora y diferenciación de células T.

Basándonos en el antecedente de los perfiles globales de expresión realizado por nuestro grupo en un modelo murino de cáncer cervical conocido como K14E7 VPH16, en este proyecto proponemos estudiar cómo la oncoproteína E7 sola o en presencia de estrógenos disminuye la expresión de granzimas y aumenta a su

inhibidor PI-9 como un posible mecanismo para evadir apoptosis en las etapas tempranas de la carcinogénesis.

IV. JUSTIFICACIÓN.

El desarrollo de cáncer cervical en el modelo murino K14E7 es muy similar al cáncer cervical en humanos, progresando en etapas y partiendo de una hiperplasia que da lugar a lesiones de bajo grado CIN I, CIN II y hasta lesiones de alto grado CIN III, cáncer *in situ* y cáncer invasor, incluso se han identificado biomarcadores que correlacionan con los encontrados en casos clínicos. Por otro lado, la tecnología de microarreglos de cDNA es una herramienta valiosa que permite conocer cambios de expresión global en genes involucrados en una patología como el cáncer; por ejemplo, ha sido útil para hacer nuevas clasificaciones del cáncer de mama y para identificar genes marcadores de mal pronóstico o respuesta a un tratamiento. La combinación del uso del modelo murino de cáncer cervical y la aplicación de los microarreglos de cDNA nos ayudará a comprender cómo cooperan las hormonas con la oncoproteína E7 en la progresión de lesiones de bajo grado a cáncer.

V. OBJETIVOS

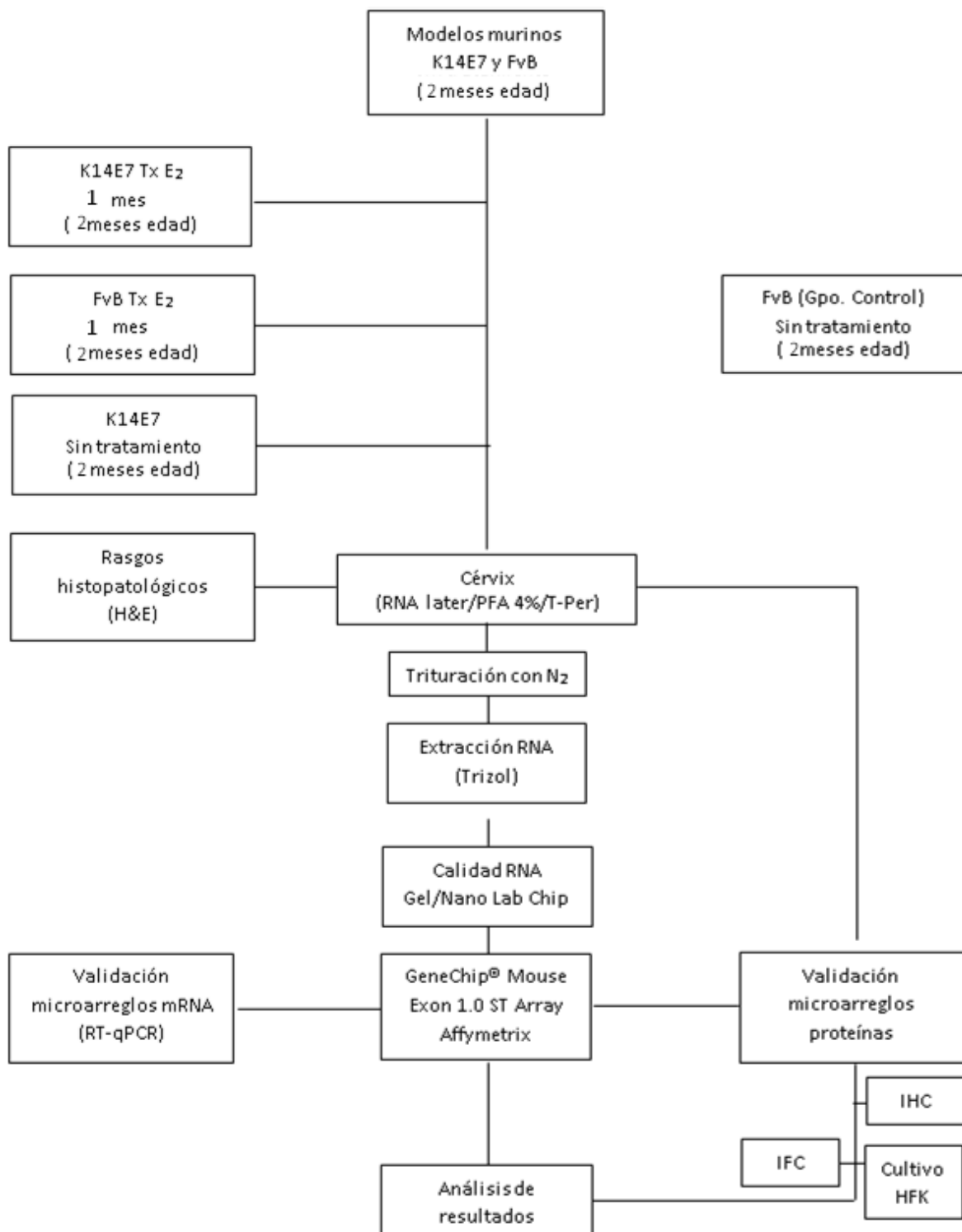
GENERAL

Identificar, mediante el uso de perfiles de expresión global de genes, nuevos procesos o genes inducidos por la cooperación de estrógenos y la oncoproteína E7 del VPH16 que sirvan como marcadores en etapas tempranas de la carcinogénesis en el modelo murino K14E7.

PARTICULARES

1. Propagación y genotipificación de los machos, producto de las cruzas, para identificar que posean el transgén E7 de VPH16 para cruza.
2. Obtención de hembras transgénicas para la oncoproteína E7 de VPH16
3. Tratar con 17β -estradiol durante 1 mes los grupos de hembras transgénicas K14E7 y no transgénicas (FVB).
4. Obtención de tejido cervical para histopatología e inmunohistoquímica.
5. Extraer el RNA mensajero de las muestras de los grupos control y tratados con 17β -estradiol durante 1 mes.
6. Realizar la hibridación de los microarreglos, lectura y análisis estadístico de los resultados.
7. Analizar mediante software especializados los resultados del microarreglo para obtener la organización ontológica de los genes encontrados.
8. Validar los resultados de los microarreglos por RT-PCR en tiempo real, así como la expresión de proteínas por inmunofluorescencia.

VI. DIAGRAMA DE TRABAJO



Tx: Tratamiento, PFA; Paraformaldehído, IHC: Inmunohistoquímica, IFC: Inmunofluorescencia

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. USO DE RATONES TRANSGÉNICOS Y TRATAMIENTO CON E₂.

Como grupos problema se utilizaron los modelos K14E7 tratado con E₂, K14E7 sin tratamiento (en estro) y FVB tratado con estradiol, Como grupo control se usaron ratones FVB no transgénicos (en estro). El modelo K14E7, se caracteriza por usar el promotor transcripcional de la citoqueratina 14 para expresar la proteína E7 de VPH16 en las células basales del epitelio estratificado de piel y cérvix. Para realizar los experimentos de microarreglos se utilizaron 4 grupos: 6 ratones K14E7 con tratamiento hormonal (E₂), 6 ratones K14E7 sin tratamiento, 6 ratones FVB con tratamiento hormonal, y 6 ratones FVB sin tratamiento. El tratamiento se inició al mes de edad y se mantuvo durante un mes (2 meses de edad); éste consistió en la inserción, en la zona dorsal, de “pellets” que liberan 833 ng de E₂ durante 1 mes; por lo tanto, el tratamiento consistió en la inserción de un pellet al mes de edad para sacrificarlos a los 2 meses de edad. Todos los ratones fueron mantenidos y tratados de acuerdo a la “American Association of Laboratory Animal Care” (AAALAC), y todos los experimentos y procedimientos fueron aprobados por el comité de la Unidad de Investigación para el Cuidado de Animales de Laboratorio (UPEAL-CINVESTAV-IPN, México; NOM-062-ZOO-1999).

7.2. OBTECIÓN DE TEJIDOS E HISTOPATOLOGÍA.

Los ratones K14E7 y FVB fueron sacrificados por dislocación cervical, inmediatamente se removió el tracto reproductivo y se lavó con PBS 1X para eliminar el exceso en sangre. A éste se le eliminó la parte vaginal endometrial para conservar la parte cervical. Las muestras de tejido cervical se almacenaron en RNA later (Ambion®) o fueron fijadas en paraformaldehído 4% y embebidas en parafina. Para analizar los rasgos histopatológicos, se cortaron secciones seriadas de 5 µm de espesor, se desparafinaron y se hidrataron de acuerdo a indicaciones previamente descritas (Ibarra Sierra, Diaz Chavez et al. 2012); posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina.

7.3. EXTRACCIÓN DE RNA E HIBRIDACIÓN EN MICROARREGLOS.

Las muestras cervicales almacenadas en RNA later fueron utilizadas para la extracción del RNA total. Brevemente, el procedimiento consistió en marcar el cérvix con nitrógeno líquido para posteriormente extraer el RNA usando un procedimiento estándar (Trizol, Ambion®). La calidad y cantidad de RNA fueron evaluadas en “Agilent 2100 Bioanalyzer” (Agilent Technologies®) que reporta un número de RIN (Integridad de RNA); un algoritmo que se basa en la selección de rasgos que contribuyen a dar información acerca de la integridad del RNA, el RIN se reporta en una escala del 0-10, siendo las escalas mayores números de RIN que reportan una buena integridad del RNA. Únicamente las muestras con un número de integridad ≥ 8 fueron utilizadas para su uso en los microarreglos de Affymetrix. La síntesis de cDNA, amplificación y el análisis de expresión se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Affymetrix WT Sense Target labeling assay Manual). Se usaron 6 ratones por variable y se mezcló el RNA de 2 ratones diferentes (es decir 3 biológicos) y por cada mezcla se utilizaron tres alicuotas independientes. Para el proceso de hibridación se usó el GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Array® (el cual evalúa la expresión de 26,166 transcritos).

7.4. ANÁLISIS DE DATOS DE MICROARREGLOS.

Se usó el software Partek Genomic Suite versión 6.4 (Partek®) para analizar la intensidad de señal de cada microarreglo (3 réplicas biológicas/grupo). Los valores de intensidad fueron normalizados usando el análisis de corrección RMA. Se utilizó un análisis estadístico de ANOVA de dos colas para identificar los genes diferencialmente expresados. En el análisis de datos solamente se incluyeron los genes con diferencias estadísticamente significativas (un valor de $p < 0.05$) y un criterio de “Fold change” ≥ 2 y ≤ -2 . Los datos de microarreglos fueron depositados en la base de datos del NCBI GEO [GEOID:GSE46890]. Para identificar los procesos biológicos modificados por E7 y/o el E₂ se usó el software Ingenuity Pathway

(Ingenuity Systems®). Se usó HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) y UniProtKB para escribir correctamente los símbolos de los genes y proteínas de humano y ratón.

7.5. RT-PCR EN TIEMPO REAL.

Se aisló RNA total de 6 ratones (diferentes a los utilizados en los microarreglos) por grupo de trabajo (K14E7, FVB, K14E7+E₂ y FVB+E₂) y su calidad fue determinada usando electroforesis en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. El RNA fue cuantificado por análisis de espectrometría a 260 nm/280 nm. La síntesis de cDNA se hizo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen®). La amplificación por qPCR se hizo utilizando el DNA Master SYBR Green I Kit (Roche®) y el equipo 7300 Real Time PCR system.

Los moldes de cDNA fueron amplificados durante 45 ciclos en procesos de 3 pasos. Brevemente: un paso de 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, una fase de alineamiento de 30 segundos a 60 °C y una fase de elongación de 30 segundos a 72 °C. Cada gen fue cuantificado por triplicación y normalizado por HPRT como gen de referencia, y la expresión diferencial se calculó usando el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Schmittgen and Livak, 2008). Todas las secuencias de los primers y productos de PCR son descritos en la Tabla 3.

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos usados en RT-qPCR para la validación de resultados de microarreglos.

Nombre del gen	Primer 1	Primer 2
Gapdh	5'-GTG GAG TCA TAC TGG AAC ATG TAG-3'	5'-AAT GGT GAA GGT CGG TGT G-3'
Gzmb	5'-CAT GTC CCC CGA TGA TCT C-3'	5'-AAG AGA GCA AGG ACA ACA CTC-3'
Gzmc	5'-CTC CTC CTT AGC CTT GAT GTT G-3'	5'-CGA GAC AAA TTC GTG CTA ACA G-3'
Gzmd	5'-GAA GCC TCC ACA GTA TAT CCT G-3'	5'-CCT GAT TCT CCT GAC CCT ACT-3'
Gzme	5'-CCT CCA CAG TAT CTC CTA TTA CCT-3'	5'-ACC AGT CCT GAT TCT CCT GA-3'

Gzmf	5'-CCA TTA TCT TTC ACA AAC CTC ACA C-3'	5'-TGG AGC AGA GGA GAT CAT CG-3'
Gzmg	5'-ACT CCA TAA GCT AGG TTG TCA C-3'	5'-CTA TTC CAA GAC CAC GCA GAT-3'
Gdpd3	5'-GTT CAT CCA TCC ACA GCG AA-3'	5'-CCT TTT GTC TCC ATC CCT GA-3'
Lrat	5'-AAG ACA GCC GAA GCA AGA C-3'	5'-GCG AAC ACT TTG TGA CTT ACT G-3'
Nppc	5'-CAT TGC GTT GGA GGT GTT TC-3'	5'-GGT CTG GGA TGT TAG TGC AG-3'
Mgat4c	5'-ACT GAT GAA AGT CCA ATT GTG AG-3'	5'-CAC CAA CTT AAT TCT GAA CGC T3'
Cyp2e1	5'-GCC TCA TTA CCC TGT TTC CC-3'	5'-TTC CAG GAG TAC AAG AAC AAG G-3'
Il1r2	5'-CCT TCC AGC CTC AAT TCA GAT-3'	5'-TGC TTT CAC CAC TCC AAC AG-3'
Stat5a	5'-GCT CTC ATC CAG GTC AAA CTC-3'	5'-TGC CCT CAA CCT CAC TAC A-3'
Eomes	5'-CCA GAA CCA CTT CCA CGA AA-3'	5'-CGG CAC CAA ACT GAG ATG A-3'
Serpib9	5'-GTG CCA TTT CCT TCA GAC AG-3'	5'-GAA GTC CCT GCC TTG TAC AG-3'
Gxylt2	5'-TGG CCC CAG AGC ATG AAA -3'	5'-CCG GGC AAA GCG ACT GTA -3'

7.6. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFUORESCENCIA.

La detección de proteínas en tejido cervical fue hecha usando el Mouse/Rabbit PolyDetector HRP/DAB Detection System (Bio SB®) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las muestras de 5 µm de espesor (3 ratones por grupo) fueron incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios monoclonales contra p16-INK4a (Santa Cruz Biotechnology®), KI67, GzmB y PI-9. Seguido del procedimiento de inmunohistoquímica, los tejidos fueron co-teñidos con hematoxilina y montados en GVA (Zymed®). Para el procedimiento de inmunofluorescencia, secciones cervicales de 5 µm de espesor, de tres ratones por

grupo de estudio, fueron sumergidas en PBS 1X y bloqueadas con suero bovino, posteriormente fueron lavadas tres veces con PBS 1X e incubadas durante 1 hora a 37°C con Anti-KI67 (Santa Cruz Biotechnology®). Posteriormente, las secciones fueron incubadas durante 30 min a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario acoplado a isotiocianato de fluorescencia, mejor conocido como FITC (Zymed®); se enjuagaron con PBS 1X, se co-tiñeron con yoduro de propidio y fueron montadas en Vectashield (Vector®). Las preparaciones fueron examinadas con microscopia confocal (SP2 Leica Microsystems®) y las imágenes capturadas fueron importadas al software Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems®) para ajuste de brillo, contraste y resolución (300 dpi).

7.7. CULTIVO CELULAR.

Se cultivaron queratinocitos primarios de prepucio humano (HFK) y queratinocitos transformados con la oncoproteína E7 del VPH16 (HFK-E7) en un medio DMEM:F12 con 2% de suero fetal bovino a 37°C, en una atmosfera de 5% de CO₂ suplementado con 0.18 mM adenina (Sigma®), 0.1 µg/mL hidrocortisona (Sigma®), 100X suplemento para crecimiento de queratinocitos humanos (HKGS) (Thermo Fisher Scientific®), y una mezcla de antibióticos y antimicóticos (Invitrogen®).

Para la transfección de la oncoproteína E7 de VPH16 se usó Attractene (QIAGEN®) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se cultivaron en placas de 6 pozos (3 x 10⁵ células/pozo), al siguiente día las células fueron trasfectadas con una mezcla de 4.5 µl of Attractene/pozo and 1.2 µg de ADN/pozo. Para obtener una línea celular transfectadas transitoriamente, las células fueron seleccionadas y mantenidas en medio con 200 mg/mL geneticina (G418; Invitrogen®).

7.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó una t student y todos los valores $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

VIII. RESULTADOS.

8.1. CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LESIONES CERVICALES DE BAJO GRADO EN EL RATÓN TRANSGÉNICO K14E7.

Con el fin de determinar posibles displacias cervicales en ratones K14E7+E₂ de dos meses de edad, se utilizó la clasificación de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) previamente descrita como "sistema de clasificación histopatológica para la carcinogénesis escamosa cervical de ratón transgénico" (Riley, Duensing et al. 2003). El análisis histopatológico de secciones de tejidos cervicales de FVB, FVB+E₂, K14E7 y K14E7+E₂ muestra que ninguno de los ratones FVB, FVB+E₂, K14E7 desarrollaron lesiones cervicales (Figura 9A, 9B y 9C). En los ratones FVB tratados con E₂, sólo se detectó una hiperplasia epitelial escamosa ligera (exocervix), con las figuras mitóticas de células basales ocasionales y presencia de queratinocitos suprabasales diferenciados normales (Figura 9B).

Se observó infiltrado inflamatorio y el aumento de la proliferación celular en ratones K14E7 (Figura 9C). Curiosamente, en ratones K14E7+E₂ observamos un aumento de 2 veces en las capas celulares basales/basaloides exocervix con algunas células individuales con atipia nuclear e incremento nuclear: citoplasmática e infiltrado inflamatorio (Figura 9D). Adicionalmente, se encontraron células epiteliales escamosas anaplásicas ocasionales que fueron persistentes en las capas de células diferenciadas superiores como se reportó previamente en ratones transgénicos K14 VPH tratados con E₂ (Figura 9D) (Elson, Riley et al. 2000). Todos estos rasgos son característicos de lesiones de bajo grado, correspondientes al CIN-I.

Se realizaron ensayos inmunohistoquímicos de biomarcadores establecidos para la proliferación (Ki-67), displasia y presencia de VPH (p16INK4a) en cáncer cervical humano para apoyar los hallazgos histopatológicos (Yim and Park 2007). Ki-67 es el indicador más fiable para el crecimiento tumoral, el cual se expresa durante las fases G₂ y mitótica del ciclo celular (Scott, Hall et al. 1991); (Yim and Park 2007). En ratones FVB la señal Ki-67 se restringió a sólo unas pocas células de la capa

basal (Figura 9E). Por el contrario, la tinción de Ki-67 en ratones FVB+E2 y K14E7 muestra una mayor intensidad y se observó en los compartimentos basal y parabasal del epitelio escamoso estratificado hiperproliferativo en exocervix de estos animales (Figura 9F, 9G). Curiosamente, la expresión de Ki-67 en ratones K14E7+E2 fue muy similar a FVB sin diferencias significativas entre ellos (Figura 9E, 7H).

Se informó previamente que la oncoproteína VPH16E7 induce la sobreexpresión del gen supresor tumoral p16INK4A, que es necesario para la supervivencia de líneas celulares de carcinoma cervical (McLaughlin-Drubin, Crum et al. 2011). Se sabe que la sobreexpresión de p16INK4A en lesiones cervicales premalignas y malignas (CIN II y CIN III) es un marcador útil de la actividad de VPH-AR (Venturoli, Ambretti et al. 2008). En este sentido, en consecuencia, sólo se observó la expresión de p16INK4A en los ratones K14E7 y K14E7+E2 (Figura 9K, 9L).

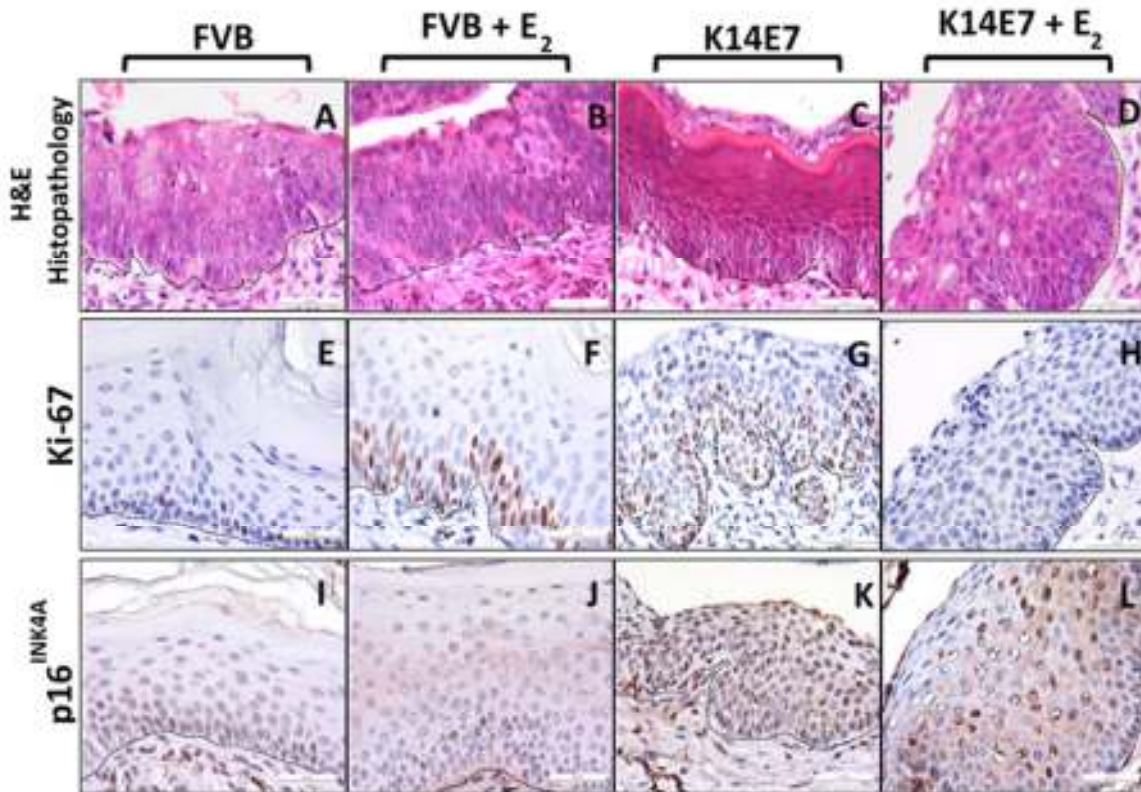


Figura 9. Histopatología del tejido cervical de ratón que detecta la expresión de biomarcadores p16INK4a y Ki-67. Las imágenes corresponden a secciones transversales de epitelio exocervical de FVB no transgénico de 2 meses de edad y ratones transgénicos K14E7 no tratados y tratados con 17β -estradiol (E_2) durante 1 mes. Las secciones se tiñeron con H&E y se realizó una inmunofluorescencia para p16-INK4a y Ki-67 como se describe en la sección Materiales y Métodos. La señal marrón representa células positivas para Ki-67 o p16INK4a. Campo visual con una ampliación de 40 \times .

8.2. EFECTO DE LA ONCOPROTEÍNA VPH16E7 Y 17 β -ESTRADIOL EN LA EXPRESIÓN GLOBAL DE GENES EN ETAPAS TEMPRANAS DE CARCINOGENÉISIS.

Con el fin de evaluar los perfiles globales de expresión génica en el desarrollo temprano del cáncer, se utilizaron ratones FVB y K14E7 tratados durante un mes con pellets de 17 β -estradiol (E₂) y se compararon con ratones sin tratamiento K14E7 o FVB (control).

Entonces, estos cuatro grupos fueron examinados con Whole Mice Genoma Oligo Microarrays utilizando ANOVA, con un criterio de fold change de $\geq 1,5$ y $\leq -1,5$, y un valor de $p < 0,05$, observamos que los cambios más dramáticos en la expresión génica ocurren en los grupos tratados con E₂ (FVB o K14E7). En resumen, se detectaron 685 genes (409 regulados al alza, 276 regulados hacia abajo) en ratones FVB+E₂, 321 genes (181 regulados al alza, 140 regulados a la baja) en K14E7 y 933 genes (554 regulados, 379 regulados a la baja) en ratones K14E7+E₂ comparados con ratones FVB (véase la figura 10A). Se construyó un diagrama de Venn para identificar común, así como los genes exclusivamente modulados por la oncoproteína E7 y/o E₂. La comparación entre K14E7+E₂ y FVB+E₂ produjo 248 genes superpuestos, 50 genes superpuestos entre, K14E7+E₂ y K14E7 y 108 genes superpuestos entre todos los grupos. Curiosamente, 527 (K14E7+E₂), 290 (FVB+E₂) y 124 (K14E7) genes fueron regulados exclusivamente en cada grupo de ratones (Tabla complementaria 1). Los 527 genes expresados de novo en el grupo sometido a carcinogénesis son presumiblemente regulados por la sinergia de E₂ y E7 (Figura 10B).

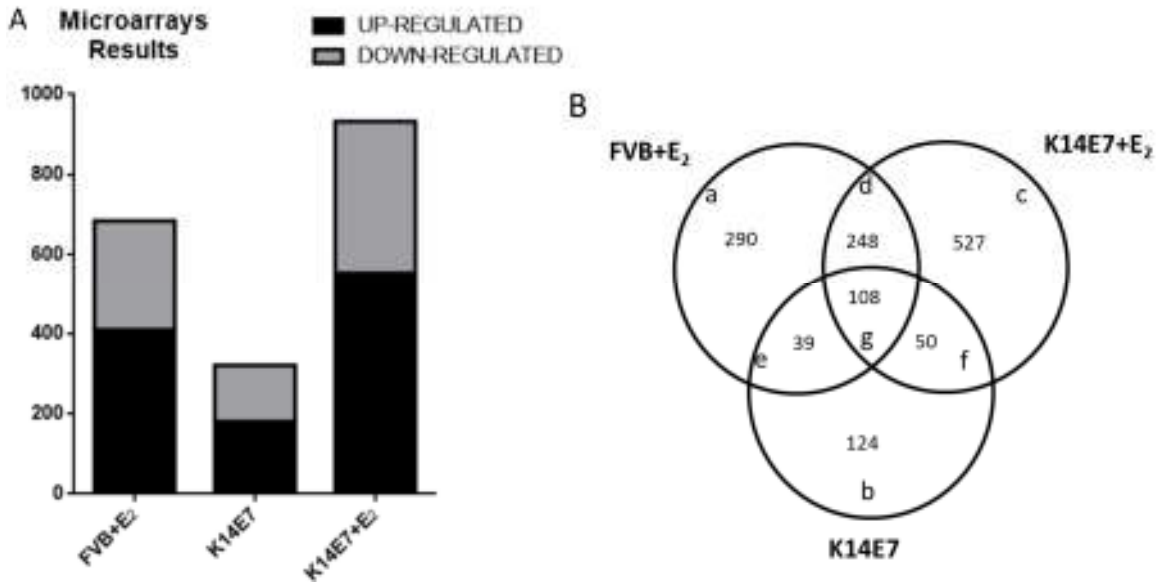


Figura 10. Perfil de expresión global de ratones FVB no tratados frente a ratones FVB+E₂, K14E7 y K14E7+E₂. Para determinar los genes expresados diferencialmente, el corte utilizado fue un cambio de pliegue de $\geq 1,5$ y $\leq -1,5$, y un valor de $p < 0,001$. (A) 409, 181 y 554 genes sobreexpresados y 276, 140 y 379 genes desregulados se detectaron en FVB+E₂, K14E7, y K14E7+E₂ ratones frente a ratones FVB no tratados (B) El diagrama de Venn muestra genes únicos (a, b, c) y comunes (d, e, f, g) expresados entre los grupos FVB+E₂, K14E7 y K14E7+E₂.

Para clasificar los genes expresados diferencialmente implicados en procesos celulares, se realizó un análisis de ontología génica utilizando el software Ingenuity Pathway (IPA) y se observó que varios procesos asociados al cáncer (movimiento celular, cáncer, crecimiento celular y proliferación) se modificaron principalmente en el grupo K14E7+E₂ y con un grado ligeramente menor en el grupo de ratones FVB+E₂ (cáncer, lesión y anomalías organometálicas, enfermedad del sistema reproductivo, crecimiento y proliferación celular) (Figura 11); mientras que la respuesta inflamatoria y las enfermedades y afecciones dermatológicas se modificaron en los ratones K14E7. De interés es que, aunque los grupos de ratones K14E7+E₂ y FVB+E₂ comparten alteraciones en la expresión génica de varios procesos, el perfil genético para cada grupo es muy diferente.



Figura 11. Ontología génica basada en procesos biológicos. Para cada grupo experimental de ratones, los genes fueron categorizados en grupos funcionales por el software Ingenuity Pathway Advanced (IPA). Las barras indican log (valor p), que fue calculado por el software IPA mostrando los niveles de relación. El eje Y izquierdo muestra el log (valor p), y el eje X indica el nombre de las funciones.

8.3. VALIDACIÓN DE DATOS DEL MICROARREGLO MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR).

Para validar los datos del microarreglo, se seleccionaron los genes implicados en diferentes procesos y se realizó PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de análisis. Hemos validado quince genes específicos, que mostraron expresión diferencial en los microarreglos, de datos obtenidos del grupo de ratones K14E7+E₂. Entre los genes sobre regulados validamos Cyp2e1 (no sinérgico), Gdpd3, Il1r2, Lrat, Mgat4c, Nppc, y Serpinb9b (sinérgico); entre los genes desregulados validamos Eomes (no sinérgico), así como GzmB, GzmC, GzmD, GzmE, GzmF, GzmG, Gxylt2 (sinérgico). Los resultados de todos los genes analizados por RT-qPCR fueron coherentes con los datos del microarreglo; los resultados comparativos se muestran en la Tabla complementaria 2. Se encontró un efecto sinérgico a nivel transcripcional en trece de los genes validados probablemente como resultado de la interacción E₂ y E7. También se validó otro conjunto de genes que muestran expresión diferencial en el grupo K14E7 (Cyp2e1, Il1r2, GzmD y GzmG) y en el grupo FVB+E₂ (genes Gdpd3, GzmD, GzmG y Eomes). Los resultados de RT-qPCR se resumieron en las Figuras 12, 13 y 14.

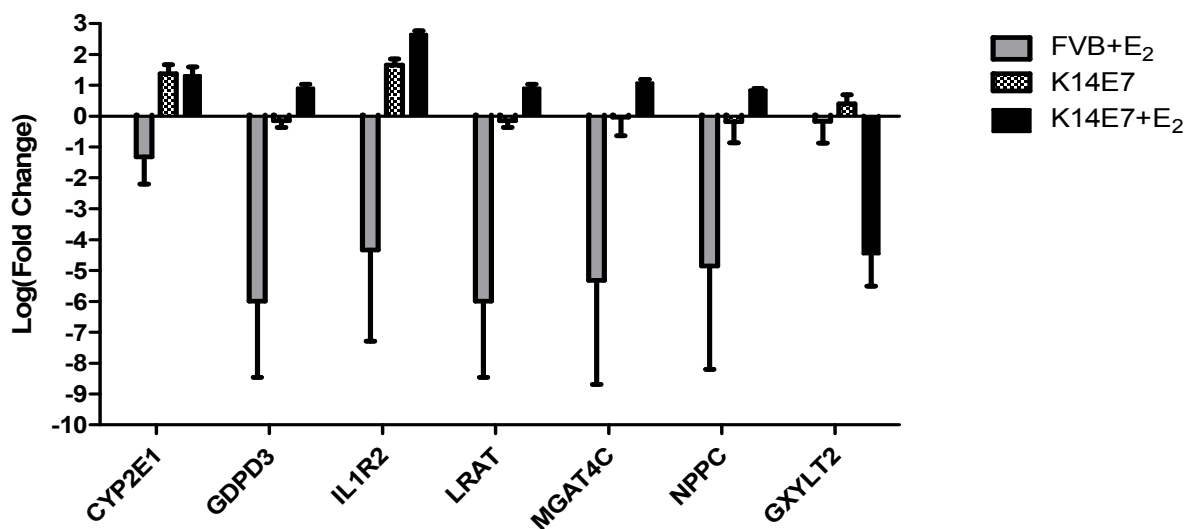


Figura 12. Sinergia del 17 β -estradiol y E7 para expresar varios genes relacionados con el cáncer.

El análisis cuantitativo de PCR en tiempo real mostró una mayor expresión de ARNm en ratones K14E7+E₂ comparados con ratones K14E7 no tratados (K14E7)

o ratones control tratados (FVB). Las barras (expresión relativa) representan la media +/- SD de seis experimentos independientes (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ T-test) normalizado con el mRNA de GAPDH y comparado con el control (ratones FVB no tratados).

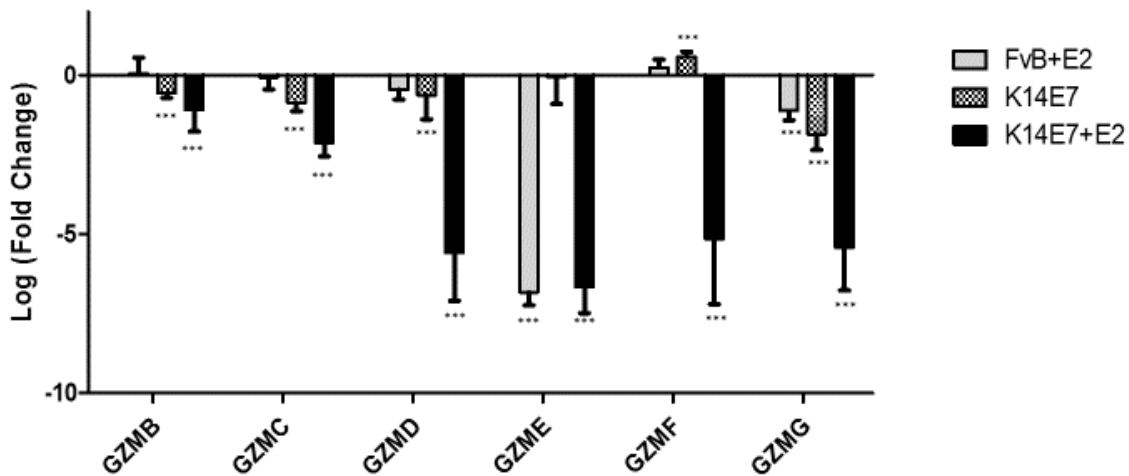


Figura 13. Sinergia entre el 17 β -estradiol y la oncoproteína E7 para reprimir la expresión de la familia de la granzima B.

El análisis cuantitativo de PCR en tiempo real mostró una menor expresión de ARNm de GZM B, C, D, E, F y G en ratones K14E7+E₂ en comparación con ratones no tratados (K14E7) o ratones no transgénicos tratados (FVB+E₂). Las barras (expresión relativa) representan la media +/- SD de seis experimentos independientes (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ T-test) normalizados con el mRNA de GAPDH y comparados con el control (ratones FVB no tratados).

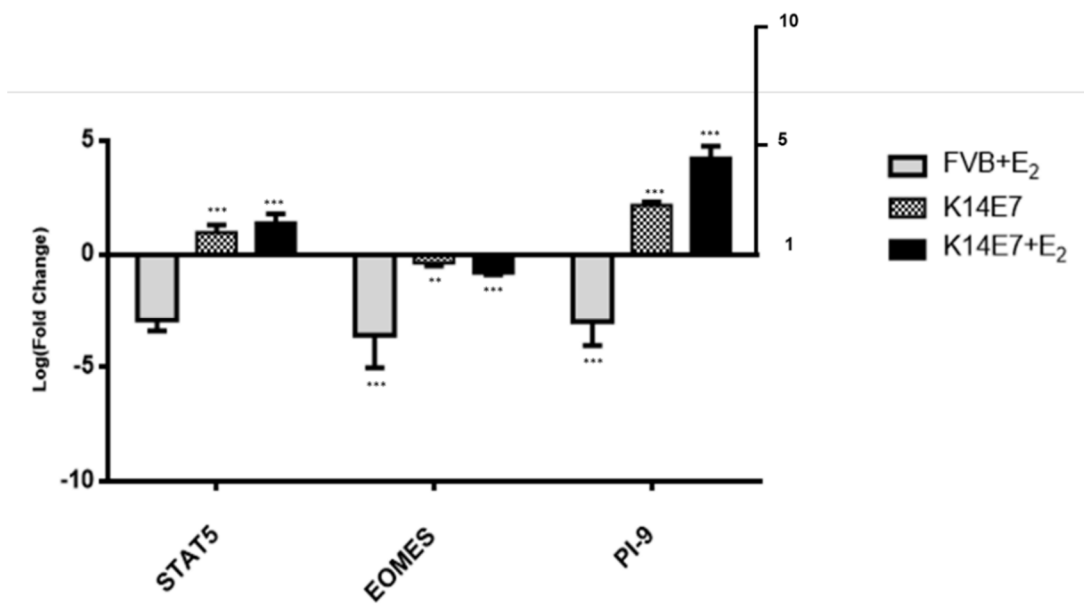


Figura 14. Sinergia entre el 17 β -estradiol y la oncoproteína E7 para expresar los factores de transcripción e inhibidor de granzima B, Serpin9b (PI-9).

El análisis cuantitativo por PCR en tiempo real mostró una mayor expresión de mRNA de PI-9 en ratones K14E7+E₂ en comparación con ratones transgénicos no tratados (K14E7) o ratones no transgénicos tratados (FVB). El experimento muestra una represión comparable de EOMES en las tres variables, sin una diferencia significativa en la expresión de STAT5 en presencia de la oncoproteína E7 (expresión relativa) representan la media +/- SD de seis experimentos independientes (** p < 0.01 y *** p < 0.001 T-test) normalizados con el mRNA de GAPDH y en comparación con el control (ratones FVB no tratados).

8.4. EXPRESIÓN PROTEICA DE GRB Y SU INHIBIDOR, PI-9, EN EXOCERVIX MURINO COMO DETERMINADO POR INMUNOFLUORESCENCIA.

Con el fin de corroborar si la expresión de proteínas se correlaciona con la expresión de ARNm, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para GrB y su inhibidor PI-9 en secciones histopatológicas de exocervix murino obtenido a partir de los grupos anteriormente citados (FVB, FVB+E₂, K14E7, K14E7+E₂). De acuerdo con nuestros resultados en el microarreglo y RT-qPCR, se observó una expresión citoplasmática basal de GrB en la capa suprabasal y granular situadas en el exocervix del epitelio cervical en el grupo control FVB. Encontramos una alta

expresión de GrB también en las células de epitelio hiperplásico suprabasal y granular de los ratones FVB+E₂. Además, se observó una señal baja para GrB en los ratones K14E7 y como esperábamos se reconoció una señal muy débil en los ratones K14E7+E₂, evidenciada de la regulación a la baja de GrB en el nivel de proteína (Figura 15A). Por otra parte, también de acuerdo con los resultados del microarreglo y RT-qPCR, la expresión de PI-9 fue muy baja en los ratones FVB y no se observó en los ratones FVB+E₂. Además, se observó una clara señal citoplasmática en las capas basal y suprabasal del epitelio, junto con el tejido estromal y una señal muy alta en la capa basal y suprabasal en el tejido epitelial de K14E7+E₂ (ver Figura 15B).

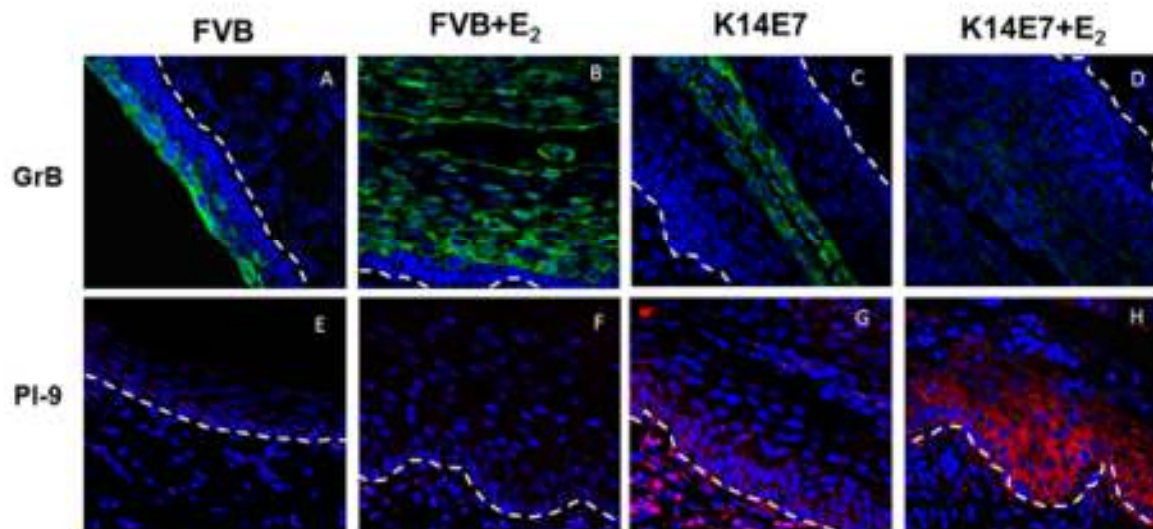


Figura 15. Inmunofluorescencia de Granzima B y PI-9 en exocervix de tejido de ratones. Las imágenes corresponden a una sección transversal del epitelio exocervical. A) expresión de la proteína GrB (verde) en la que podemos observar una regulación negativa de la proteína GrB en los ratones transgénicos K14+E₂. B) La proteína PI-9 está altamente expresada en el citoplasma de ratones K14E7+E₂ (rojo). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul).

8.5 La oncoproteína VPH16-E7 aumenta la expresión del inhibidor de proteasas PI-9 en queratinocitos humanos.

Para corroborar el efecto de la oncoproteína VPH16-E7 sobre la expresión del gen PI-9 de humano, se realizaron ensayos in vitro usando queratinocitos humanos primarios (HFK, por sus siglas en inglés, Human foreskin primary keratynocytes) transfectados transitoriamente y estables con un plásmido que portaba el marco de lectura abierto de la oncoproteína VPH16-E7. Se determinó por un análisis cuantitativo en tiempo real de PCR (RT-qPCR) que la expresión de PI-9 fue regulada positivamente con un factor de cambio de 2 veces cuando las células fueron transfectadas transitoriamente con la oncoproteína VPH16-E7 (Figura 16A) y un factor de cambio de 5.17 cuando las células se mantuvieron transfectadas establemente (Figura 16B). Estos resultados sugieren que la oncoproteína VPH16-E7 induce la expresión, in vivo e in vitro, de PI-9.

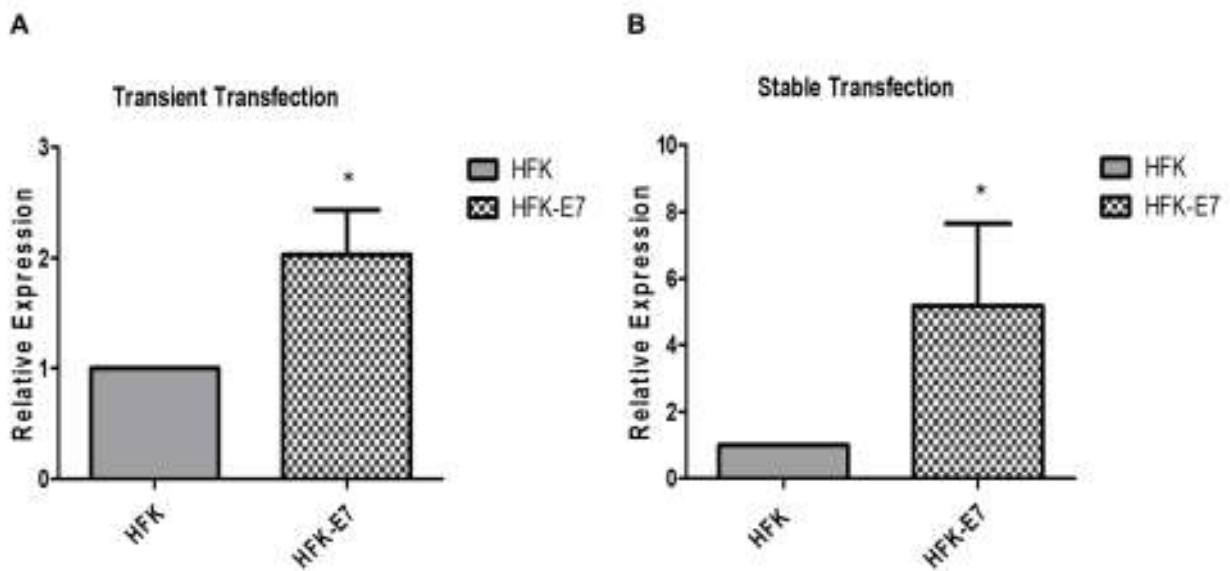


Figura 16. E7 aumenta la expresión del inhibidor PI-9 en cultivos in vitro. El análisis cuantitativo en tiempo real de PCR (RT-qPCR) muestra una alta expresión de RNAm en queratinocitos humanos primarios (HFKs) y queratinocitos transfectados con VPH16-E7 de manera transitoria (Sección A) y estable (Sección B). Las barras (expresión relativa) representan la media +/- SD de tres experimentos

independientes (* p <0,05 T-test) normalizados con B2M ($\beta 2$ microglobulina) y comparados con el control (Queratinocitos humanos primarios).

IX. DISCUSIÓN.

La infección por VPH-AR y el 17β -estradiol (E_2) aumentan el riesgo de desarrollo de CC a través de $ER\alpha$ (Chung, Wiedmeyer et al. 2008); (Chung, Shin et al. 2013); (den Boon, Pyeon et al. 2015) y cooperan con oncogenes de VPH en modelos de ratones para CC (Elson, Riley et al. 2000), (Riley, Duensing et al. 2003), (Shai, Brake et al. 2007), (Maufort, Shai et al. 2010). La oncoproteína E7 del VPH16 y E_2 son factores importantes para la inducción de lesiones premalignas y CC, pero se sabe poco sobre el mecanismo molecular por el cual E7 y E_2 contribuyen a las primeras etapas de la carcinogénesis cervical.

Los estudios globales de expresión génica han sido de gran importancia para comprender procesos importantes en el cáncer humano (Dozmorov, Giles et al. 2011). Se realizó un análisis de perfil de expresión génica global del tejido cervical de ratones jóvenes (dos meses de edad) K14E7 y FVB no tratados o tratados con E_2 para llegar a una mejor comprensión de los eventos transcripcionales en la etapa temprana de la tumorigénesis cervical. En los ratones K14E7 de dos meses de edad encontramos que E_2 tiene un impacto en 685 genes, 409 regulados positivamente y 276 regulados negativamente. El análisis ontológico revela que 27 y 28 de los grupos FVB+ E_2 y K14E7+ E_2 respectivamente, se relacionan al progreso de cáncer; Sin embargo, el perfil de los genes relacionados con el cáncer en ambos grupos de ratones fue muy diferente (véase la Figura 11 y tabla suplementaria 1). El análisis ontológico muestra que los genes del proceso de cáncer en el grupo FVB+ E_2 se asocian principalmente con el ciclo celular y la morfología celular, mientras que en K14E7+ E_2 se relacionaron con el metabolismo de los lípidos y los trastornos endocrinológicos en particular. La sobreexpresión de genes implicados en el metabolismo lipídico es muy interesante ya que este grupo animal generará posteriormente lesiones de alto grado y CC. Se sabe que las células cancerosas deben reprogramar sus vías metabólicas para que coincidan con su proliferación

acelerada y supervivencia (Cairns, Harris et al. 2011); Los cambios de expresión y actividad del metabolismo de los lípidos están regulados directamente por la actividad de las señales oncogénicas (Zhang and Du 2012). El metabolismo de lípidos alterado se reconoce ahora como el sello distintivo de las células cancerosas y la expresión y actividad de muchas enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos, tales como, ATP citrato liasa (ACL), acetil CoA carboxilasa (ACC) y ácido graso sintasa (FASN) son sobre expresados en muchos tipos de cánceres (Menendez and Lupu 2007). En este sentido, nuestros hallazgos en los resultados del microarreglo para ratones K14E7+E₂ muestran una sobreexpresión de los genes que codifican las enzimas Acsbg1, Acs11 y Ddhd1 (tabla suplementaria 1) implicados en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga en la vía de FASN. Esta sobre expresión de la ruta biosintética de ácidos grasos comienza en una fase relativamente temprana en varios tipos de tumores, lo cual es consistente con nuestros resultados. Curiosamente, el segundo proceso más alterado fue el endocrino, en este proceso encontramos genes que codifican receptores de respuestas hormonales como insulina Ptpn1 (sobre expresión), señales estrogénica Srd5a2 (sobre expresión), Greb1 (inhibición) y progesterona Pgr (sobre expresión) (tabla suplementaria 1). Esto no es sorprendente ya que el desarrollo de cáncer ha sido relacionado a hormonas. En animales de experimentación, la incidencia de neoplasia puede ser aumentada por la estimulación hormonal excesiva del órgano diana. En este tipo de neoplasias relacionadas con la respuesta hormonal, las neoplasias producidas son inicialmente sensibles y dependientes a las hormonas, pero eventualmente se vuelven autónomas en cánceres avanzados (Furth 1959). Los resultados sugieren que la actividad sinérgica de E7 y E₂ produce un patrón de expresión relacionable al progreso de neoplasia cervical, completamente diferente incluso en los mismos procesos ontológicos, cuando se compara con los grupos que no generarán cáncer.

En 1996, Arbeit describió un sinergismo especial entre el estrógeno y las oncoproteínas del VPH, distinto de la transactivación de la expresión génica viral (Arbeit, Howley et al. 1996). En revisiones al respecto se destaca el sinergismo que existen entre las oncoproteínas de VPH y la respuesta a estrógenos para producir

cáncer, aunque todavía no es claro las implicaciones completas de esta colaboración sinérgica (Chung, Franceschi et al. 2010). En nuestro trabajo, se observó un efecto sinérgico por E7 y E₂ a nivel transcripcional para regular positivamente o negativamente a grupos específicos de genes altamente relacionables con el progreso de cáncer cervical, la expresión de genes de novo en el grupo que progresara a cáncer y que no se detectaron en los grupos controles. Además, esta actividad sinérgica entre E7 y E₂ produce perfiles de expresión completamente diferentes incluso en los mismos procesos ontológicos en comparación con los grupos que no generan cáncer (FVB, FVB+E₂ y K14E7). Se encontraron genes que representan hallazgos novedosos para CC, tales como péptido natriurético C (Nppc), Glycerophosphodiester phosphodiesterasa (Gdpd3), Glycosyltransferasa (Mgat4c), Interleukin I receptor II (Il1r2), Lecitina Retinol aciltransferasa (Lrat) y la familia de genes de Granzima B. Nppc participa en la homeostasis cardiovascular (Scotland, Ahluwalia et al. 2005) y, recientemente, se ha informado que Nppc y sus precursores están relacionados a cáncer de prostata (Nielsen, Gotze et al. 2008). Glicerofosfodiester fosfodiesterasa (Gdpd3) es asociado con cáncer de mama y sobre expresado en el tipo luminal B (Grinde, Skrbo et al. 2014). Glicosiltransferasa (Mgat4c), relacionada con el riesgo de cáncer de próstata (Demichelis, Setlur et al. 2012). Interleukin I receptor II (Il1r2), encontrado sobre expresado en cáncer de colon y asociado con el aumento de la angiogénesis (Mar, Chu et al. 2015). Lecitina Retinol aciltransferasa (Lrat), implicada en el metabolismo del ácido retinoico, cuya sobreexpresión aumenta la sensibilidad a carcinógenos (Amann, Czaja et al. 2015)

De manera interesante, en el grupo que progresara a CC. Encontramos un efecto sinérgico entre la oncoproteína E7 del VPH16 y el 17 β -estradiol en la inhibición transcripcional de la familia de genes de granzima B. Granzima B (GrB) es conocida desde hace mucho tiempo como una proteasa pro-apoptótica expresada por linfocitos citotóxicos y células Natural Killer, pero ahora se acepta que GrB puede expresarse en otros tipos celulares de origen no inmune tales como células de músculo liso, queratinocitos y condrocitos. (Boivin, Cooper et al. 2009), (Hiebert and Granville 2012). Los experimentos con UVB y UVA en queratinocitos muestran que

la activación de GrB, representa los queratinocitos con capacidad de degradación de la matriz extracelular, así como la actividad citotóxica (Hernandez-Pigeon, Jean et al. 2007).

Además, en un estudio usando un ratón GrBKO, se inhibió la pérdida de densidad de colágeno dérmico (Parkinson, Toro et al. 2015). Esto es muy interesante, ya que se ha demostrado en cáncer de mama que el incremento de la densidad de colágeno es importante para promover el inicio y la progresión del tumor mamario (Provenzano, Inman et al. 2008). Además, un estudio de la autofluorescencia cervical normal y precancerosa muestra que en el epitelio normal la fluorescencia del colágeno se limita a una fina capa de células basales mientras que en el tejido precanceroso el número de células con fluorescencia aumenta (Pavlova, Sokolov et al. 2003). Los resultados de nuestro modelo podrían sugerir que la inhibición temprana de la vía de GrB puede contribuir al aumento de la densidad de colágeno. Por otra parte, la inhibición de GrB protege a los queratinocitos de responder a su capacidad citotóxica que podría ser perjudicial para el desarrollo del cáncer.

En base a nuestros resultados del microarreglo y RT-qPCR, exploramos, si esta inhibición transcripcional de GrB se debió a una disminución en los factores transcripcionales que inducen GrB río arriba. En los linfocitos se ha demostrado que los factores de transcripción T-bet y Eomes cooperan para promover la formación de linfocitos citotóxicos induciendo la expresión de las moléculas citolíticas: perforina y granzima B (McLane, Banerjee et al. 2013).

En este sentido, encontramos una disminución en los niveles del factor de transcripción Eomes en los 3 grupos de interés (FVB+E₂, K14E7 y K14E7+E₂). Que correlaciona con la falta de inducción de GrB; Además se ha demostrado que Eomes regula la expresión del interferón gamma que en los queratinocitos es importante para iniciar las defensas antivirales (Banno, Adachi et al. 2003; Black, Ardern-Jones et al. 2007); (Fukuoka, Harada et al. 2016). La regulación negativa de GrB podría ser inducida por un mecanismo epigenético mediado por E7 y E₂ (Jadhav, Ye et al. 2015), (Laurson, Khan et al. 2010). Por otro lado, se encontró sobre expresado el inhibidor de proteasas-9 (PI-9), que es un potente inhibidor de

GrB y se expresa por las células inmunitarias como protección contra fuga accidental de GrB citosólica (Bird, Sutton et al. 1998). Además, en ratones K14+E₂ y queratinocitos transfectados con VPH16-E7, se encontró un alto incremento de PI-9 en HFKs transfectados transitoriamente con VPH16-E7 y notoriamente mayor en HFKs transfectados estables. Las células endoteliales, SMC vasculares y hepatocitos también han mostrado una capacidad para expresar PI-9 como un medio de protección contra la citotoxicidad mediada por GrB (Barrie, Stout et al. 2004); (Buzza, Hirst et al. 2001). Curiosamente, se ha demostrado que los estrógenos inducen PI-9 en las células de hepatoblastoma y los protegen de la apoptosis dependiente de GrB dependiente de CTL y NK (Jiang, Orr et al. 2006). La exposición a estrógenos (17β-estradiol y genisteína) aumentó el número y el tamaño de los tumores de las células MCF7 del cáncer de mama que promueven la proliferación y aumenta el nivel de PI-9 (Lauricella, Carlisi et al. 2016). En las células de leucemia existe una correlación robusta entre los niveles de expresión constitutivos de PI-9 y la supresión de la actividad de granzima B. Además, la inhibición de la granzima B se traduce en una activación reducida de caspasa-3. En células de cáncer de pulmón se ha demostrado que el aumento de la expresión de PI-9 protege de la citotoxicidad mediada por granzima B como un mecanismo de evasión inmune (Soriano, Mukaro et al. 2012).

X. CONCLUSIONES.

En conclusión, HPV16-E7 y estrógenos (17β-estradiol) regulan negativamente la expresión y actividad de GrB e incrementan la expresión de PI-9 en queratinocitos, lo que indica la posibilidad de que la regulación a la baja de la granzima B impida que las células precancerosas adquieran capacidades citotóxicas, que pueden ser perjudicial para el desarrollo del cáncer y que la regulación al alza de PI-9 puede contribuir a la evasión inmune por las células cancerosas. Estos dos factores podrían ser útiles como marcadores predictivos y como nuevos objetivos terapéuticos durante las primeras etapas del cáncer (Fritsch, Finke et al. 2013).

XI. PERSPECTIVAS.

Como perspectivas de este trabajo, sería importante demostrar in vivo que el agotamiento de Granzime B o la expresión de PI-9, es esencial para la progresión de lesiones de bajo grado al carcinoma in situ, un modelo de ratón transgénico doble que expresa E7 y GrB bajo el control del promotor K14 o sistema doble transgénico que expresa E7 e incorpora un knock out para PI-9, podría ser muy útil. Otro posible experimento sería células de cáncer cervical xenotrasplantadas que expresan constitutivamente GrB o PI-9 en un modelo de ratón de tipo salvaje con el fin de evaluar su capacidad para generar un tumor. Además, es necesario un análisis histopatológico extendido de GrB y PI-9 en muestras clínicas de lesión de grado bajo, medio y alto para establecer una correlación positiva con la progresión del cáncer de cuello uterino.

XII. BIBLIOGRAFÍA.

- Abarbanel, H. D., L. Gibb, et al. (2004). "Spike timing and synaptic plasticity in the premotor pathway of birdsong." Biol Cybern **91**(3): 159-167.
- Aisenberg, A. C. (1961). "Studies on normal and neoplastic mitochondria. I. Respiration." Cancer Res **21**: 295-303.
- Amann, P. M., K. Czaja, et al. (2015). "LRAT overexpression diminishes intracellular levels of biologically active retinoids and reduces retinoid antitumor efficacy in the murine melanoma B16F10 cell line." Skin Pharmacol Physiol **28**(4): 205-212.
- Angeline, M., E. Merle, et al. (2003). "The E7 oncoprotein of high-risk human papillomavirus type 16 enters the nucleus via a nonclassical Ran-dependent pathway." Virology **317**(1): 13-23.
- Arbeit, J. M., P. M. Howley, et al. (1996). "Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(7): 2930-2935.
- Armstrong, D. J. and A. Roman (1993). "The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues." Biochem Biophys Res Commun **192**(3): 1380-1387.
- Attwooll, C., S. Oddi, et al. (2005). "A novel repressive E2F6 complex containing the polycomb group protein, EPC1, that interacts with EZH2 in a proliferation-specific manner." J Biol Chem **280**(2): 1199-1208.
- Avvakumov, N., J. Torchia, et al. (2003). "Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase." Oncogene **22**(25): 3833-3841.
- Baldwin, A., K. W. Huh, et al. (2006). "Human papillomavirus E7 oncoprotein dysregulates steroid receptor coactivator 1 localization and function." J Virol **80**(13): 6669-6677.
- Banno, T., M. Adachi, et al. (2003). "Unique keratinocyte-specific effects of interferon-gamma that protect skin from viruses, identified using transcriptional profiling." Antivir Ther **8**(6): 541-554.
- Barbosa, M. S., C. Edmonds, et al. (1990). "The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation." EMBO J **9**(1): 153-160.
- Barbosa, M. S., D. R. Lowy, et al. (1989). "Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins." J Virol **63**(3): 1404-1407.
- Barnard, P. and N. A. McMillan (1999). "The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha." Virology **259**(2): 305-313.
- Barrie, M. B., H. W. Stout, et al. (2004). "Antiviral cytokines induce hepatic expression of the granzyme B inhibitors, proteinase inhibitor 9 and serine proteinase inhibitor 6." J Immunol **172**(10): 6453-6459.
- Barrie, P. S. (2004). "Philip S. Barrie, M.D., M.B.A. Interview by Vicki Glaser." Surg Infect (Larchmt) **5**(1): 67-70.
- Barrientos, L. G., F. Lasala, et al. (2004). "In vitro evaluation of cyanovirin-N antiviral activity, by use of lentiviral vectors pseudotyped with filovirus envelope glycoproteins." J Infect Dis **189**(8): 1440-1443.
- Barrier, L., S. Barc-Pain, et al. (2004). "Lactic acidosis progressively impairs dopamine uptake in rat striatal synaptosomes by a mechanism partially independent of the Na⁺/K⁺-ATPase dysfunction." Neurosci Lett **359**(1-2): 114-118.
- Barriere, G., N. Mellen, et al. (2004). "Neuromodulation of the locomotor network by dopamine in the isolated spinal cord of newborn rat." Eur J Neurosci **19**(5): 1325-1335.

- Bates, S., A. C. Phillips, et al. (1998). "p14ARF links the tumour suppressors RB and p53." Nature **395**(6698): 124-125.
- Baumert, H., J. P. Faure, et al. (2004). "Evidence for a mitochondrial impact of trimetazidine during cold ischemia and reperfusion." Pharmacology **71**(1): 25-37.
- Belandia, B., R. L. Orford, et al. (2002). "Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes." EMBO J **21**(15): 4094-4103.
- Berk, A. J. (1999). "Activation of RNA polymerase II transcription." Curr Opin Cell Biol **11**(3): 330-335.
- Bettencourt-Dias, M. and D. M. Glover (2007). "Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(6): 451-463.
- Bird, C. H., V. R. Sutton, et al. (1998). "Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway." Mol Cell Biol **18**(11): 6387-6398.
- Black, A. P., M. R. Ardern-Jones, et al. (2007). "Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells." Eur J Immunol **37**(6): 1485-1493.
- Boivin, W. A., D. M. Cooper, et al. (2009). "Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma." Lab Invest **89**(11): 1195-1220.
- Brake, T. and P. F. Lambert (2005). "Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(7): 2490-2495.
- Buzza, M. S., C. E. Hirst, et al. (2001). "The granzyme B inhibitor, PI-9, is present in endothelial and mesothelial cells, suggesting that it protects bystander cells during immune responses." Cell Immunol **210**(1): 21-29.
- Cairns, R. A., I. S. Harris, et al. (2011). "Regulation of cancer cell metabolism." Nat Rev Cancer **11**(2): 85-95.
- Cole, S. T. and O. Danos (1987). "Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products." J Mol Biol **193**(4): 599-608.
- Curtis Hewitt, S., J. F. Couse, et al. (2000). "Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor knockout mice: what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action." Breast Cancer Res **2**(5): 345-352.
- Chowdhury, D. and J. Lieberman (2008). "Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death." Annu Rev Immunol **26**: 389-420.
- Chung, S. H., S. Franceschi, et al. (2010). "Estrogen and ERalpha: culprits in cervical cancer?" Trends Endocrinol Metab **21**(8): 504-511.
- Chung, S. H. and P. F. Lambert (2009). "Prevention and treatment of cervical cancer in mice using estrogen receptor antagonists." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(46): 19467-19472.
- Chung, S. H., M. K. Shin, et al. (2013). "Requirement for stromal estrogen receptor alpha in cervical neoplasia." Horm Cancer **4**(1): 50-59.
- Chung, S. H., K. Wiedmeyer, et al. (2008). "Requirement for estrogen receptor alpha in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer." Cancer research **68**(23): 9928-9934.
- Chung, S. H., K. Wiedmeyer, et al. (2008). "Requirement for estrogen receptor alpha in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer." Cancer Res **68**(23): 9928-9934.
- Datto, M. B., Y. Li, et al. (1995). "Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5545-5549.

- De Geest, K., C. A. Bergman, et al. (1994). "Differential response of cervical intraepithelial and cervical carcinoma cell lines to transforming growth factor-beta 1." Gynecol Oncol **55**(3 Pt 1): 376-385.
- DeMasi, J., M. C. Chao, et al. (2007). "Bovine papillomavirus E7 oncoprotein inhibits anoikis." J Virol **81**(17): 9419-9425.
- DeMasi, J., K. W. Huh, et al. (2005). "Bovine papillomavirus E7 transformation function correlates with cellular p600 protein binding." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11486-11491.
- Demers, G. W., S. A. Foster, et al. (1994). "Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4382-4386.
- Demichelis, F., S. R. Setlur, et al. (2012). "Identification of functionally active, low frequency copy number variants at 15q21.3 and 12q21.31 associated with prostate cancer risk." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(17): 6686-6691.
- den Boon, J. A., D. Pyeon, et al. (2015). "Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: Role of stromal estrogen receptor signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(25): E3255-3264.
- Deroo, B. J. and K. S. Korach (2006). "Estrogen receptors and human disease." J Clin Invest **116**(3): 561-570.
- Doorbar, J. (2006). "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer." Clinical Science **110**(5): 525-541.
- Dozmorov, M. G., C. B. Giles, et al. (2011). "Predicting gene ontology from a global meta-analysis of 1-color microarray experiments." BMC Bioinformatics **12 Suppl 10**: S14.
- Duensing, S. and K. Munger (2002). "The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability." Cancer Res **62**(23): 7075-7082.
- Duensing, S. and K. Munger (2003). "Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein can induce abnormal centrosome duplication through a mechanism independent of inactivation of retinoblastoma protein family members." J Virol **77**(22): 12331-12335.
- Dyson, N. (1998). "The regulation of E2F by pRB-family proteins." Genes Dev **12**(15): 2245-2262.
- Dyson, N., P. Guida, et al. (1992). "Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins." J Virol **66**(12): 6893-6902.
- Eichten, A., M. Westfall, et al. (2002). "Stabilization and functional impairment of the tumor suppressor p53 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein." Virology **295**(1): 74-85.
- Elson, D. A., R. R. Riley, et al. (2000). "Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis." Cancer Res **60**(5): 1267-1275.
- Evan, G. I., A. H. Wyllie, et al. (1992). "Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein." Cell **69**(1): 119-128.
- Fainboim, L. and J. Geffner (2005). "Introducción a la inmunología humana", Editorial Medica Panamericana.
- Feigelson, H. S. and B. E. Henderson (1996). "Estrogens and breast cancer." Carcinogenesis **17**(11): 2279-2284.
- Figge, J., T. Webster, et al. (1988). "Prediction of similar transforming regions in simian virus 40 large T, adenovirus E1A, and myc oncoproteins." J Virol **62**(5): 1814-1818.
- Frisch, S. M. and R. A. Screaton (2001). "Anoikis mechanisms." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 555-562.

- Fritsch, K., J. Finke, et al. (2013). "Suppression of granzyme B activity and caspase-3 activation in leukaemia cells constitutively expressing the protease inhibitor 9." Ann Hematol **92**(12): 1603-1609.
- Fukuoka, N., M. Harada, et al. (2016). "Eomesodermin promotes interferon-gamma expression and binds to multiple conserved noncoding sequences across the Ifng locus in mouse thymoma cell lines." Genes Cells **21**(2): 146-162.
- Funk, J. O., S. Waga, et al. (1997). "Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein." Genes Dev **11**(16): 2090-2100.
- Furth, J. (1959). "A meeting of ways in cancer research: thoughts on the evolution and nature of neoplasms." Cancer Res **19**(3 Pt 1): 241-258.
- Ganguly, N. and S. P. Parihar (2009). "Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis." J Biosci **34**(1): 113-123.
- Ginns, P. and S. Barrie (2004). "Reliability of single-item ratings of quality in higher education: a replication." Psychol Rep **95**(3 Pt 1): 1023-1030.
- Greenfield, I., J. Nickerson, et al. (1991). "Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11217-11221.
- Grinde, M. T., N. Skrbic, et al. (2014). "Interplay of choline metabolites and genes in patient-derived breast cancer xenografts." Breast Cancer Res **16**(1): R5.
- Hannon, G. J. and D. Beach (1994). "p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest." Nature **371**(6494): 257-261.
- Hashida, T. and S. Yasumoto (1991). "Induction of chromosome abnormalities in mouse and human epidermal keratinocytes by the human papillomavirus type 16 E7 oncogene." J Gen Virol **72** (Pt 7): 1569-1577.
- Herber, R., A. Liem, et al. (1996). "Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene." J Virol **70**(3): 1873-1881.
- Hernandez-Pigeon, H., C. Jean, et al. (2007). "UVA induces granzyme B in human keratinocytes through MIF: implication in extracellular matrix remodeling." J Biol Chem **282**(11): 8157-8164.
- Herynk, M. H. and S. A. Fuqua (2004). "Estrogen receptor mutations in human disease." Endocr Rev **25**(6): 869-898.
- Hickman, E. S., S. M. Picksley, et al. (1994). "Cells expressing HPV16 E7 continue cell cycle progression following DNA damage induced p53 activation." Oncogene **9**(8): 2177-2181.
- Hiebert, P. R. and D. J. Granville (2012). "Granzyme B in injury, inflammation, and repair." Trends Mol Med **18**(12): 732-741.
- Howley, P. and K. Sharh (1996). Papillomaviruses Fields virology.
- Huh, K. W., J. DeMasi, et al. (2005). "Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11492-11497.
- Ibarra Sierra, E., J. Diaz Chavez, et al. (2012). "Differential gene expression between skin and cervix induced by the E7 oncoprotein in a transgenic mouse model." Virology **433**(2): 337-345.
- Jadhav, R. R., Z. Ye, et al. (2015). "Genome-wide DNA methylation analysis reveals estrogen-mediated epigenetic repression of metallothionein-1 gene cluster in breast cancer." Clin Epigenetics **7**: 13.
- Jeon, S. and P. F. Lambert (1995). "Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1654-1658.

- Jiang, X., B. A. Orr, et al. (2006). "Estrogen induction of the granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, protects cells against apoptosis mediated by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells." Endocrinology **147**(3): 1419-1426.
- Jones, D. L., D. A. Thompson, et al. (1997). "Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis." Virology **239**(1): 97-107.
- Kagi, D., B. Ledermann, et al. (1996). "Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo." Annu Rev Immunol **14**: 207-232.
- Kamio, M., T. Yoshida, et al. (2004). "SOCS1 [corrected] inhibits HPV-E7-mediated transformation by inducing degradation of E7 protein." Oncogene **23**(17): 3107-3115.
- Kanda, N. and S. Watanabe (2003). "17beta-estradiol inhibits the production of interferon-induced protein of 10 kDa by human keratinocytes." J Invest Dermatol **120**(3): 411-419.
- Kessis, T. D., D. C. Connolly, et al. (1996). "Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA." Oncogene **13**(2): 427-431.
- Lacroix, L., C. Mian, et al. (2004). "PAX8 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 gene expression status in benign and malignant thyroid tissues." Eur J Endocrinol **151**(3): 367-374.
- Lauricella, M., D. Carlisi, et al. (2016). "The analysis of estrogen receptor-alpha positive breast cancer stem-like cells unveils a high expression of the serpin proteinase inhibitor PI-9: Possible regulatory mechanisms." Int J Oncol **49**(1): 352-360.
- Laurson, J., S. Khan, et al. (2010). "Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein." Carcinogenesis **31**(5): 918-926.
- Liu, X., A. Clements, et al. (2006). "Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor." J Biol Chem **281**(1): 578-586.
- Longworth, M. S. and L. A. Laimins (2004). "The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31." J Virol **78**(7): 3533-3541.
- Longworth, M. S. and L. A. Laimins (2004). "Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 362-372.
- Longworth, M. S., R. Wilson, et al. (2005). "HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs." EMBO J **24**(10): 1821-1830.
- Malik, S. and R. G. Roeder (2000). "Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells." Trends Biochem Sci **25**(6): 277-283.
- Mannhardt, B., S. A. Weinzimer, et al. (2000). "Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein binds and inactivates growth-inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3." Mol Cell Biol **20**(17): 6483-6495.
- Mar, A. C., C. H. Chu, et al. (2015). "Interleukin-1 Receptor Type 2 Acts with c-Fos to Enhance the Expression of Interleukin-6 and Vascular Endothelial Growth Factor A in Colon Cancer Cells and Induce Angiogenesis." J Biol Chem **290**(36): 22212-22224.
- Marmorstein, R. (2001). "Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(6): 422-432.
- Maufort, J. P., A. Shai, et al. (2010). "A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis." Cancer Res **70**(7): 2924-2931.
- Mazurek, S., W. Zwerschke, et al. (2001). "Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex." Biochem J **356**(Pt 1): 247-256.

- McLane, L. M., P. P. Banerjee, et al. (2013). "Differential localization of T-bet and Eomes in CD8 T cell memory populations." *J Immunol* **190**(7): 3207-3215.
- McLaughlin-Drubin, M. E., C. P. Crum, et al. (2011). "Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(5): 2130-2135.
- McLaughlin-Drubin, M. E., K. W. Huh, et al. (2008). "Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6." *J Virol* **82**(17): 8695-8705.
- Menendez, J. A. and R. Lupu (2007). "Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis." *Nat Rev Cancer* **7**(10): 763-777.
- Mitchell, D. M. and M. A. Williams (2013). "Disparate roles for STAT5 in primary and secondary CTL responses." *J Immunol* **190**(7): 3390-3398.
- Motoyama, S., C. A. Ladines-Llave, et al. (2004). "The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis." *Kobe J Med Sci* **50**(1-2): 9-19.
- Mueller, S. O. and K. S. Korach (2001). "Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice." *Curr Opin Pharmacol* **1**(6): 613-619.
- Munger, K., B. A. Werness, et al. (1989). "Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product." *EMBO J* **8**(13): 4099-4105.
- Navarro-Lerida, I., M. M. Corvi, et al. (2004). "Palmitoylation of inducible nitric-oxide synthase at Cys-3 is required for proper intracellular traffic and nitric oxide synthesis." *J Biol Chem* **279**(53): 55682-55689.
- Nguyen, C. L., C. Eichwald, et al. (2007). "Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component gamma-tubulin." *J Virol* **81**(24): 13533-13543.
- Nguyen, C. L., M. E. McLaughlin-Drubin, et al. (2008). "Delocalization of the microtubule motor Dynein from mitotic spindles by the human papillomavirus E7 oncoprotein is not sufficient for induction of multipolar mitoses." *Cancer Res* **68**(21): 8715-8722.
- Nielsen, S. J., J. P. Gotze, et al. (2008). "ProCNP and CNP are expressed primarily in male genital organs." *Regul Pept* **146**(1-3): 204-212.
- Ohlenschlager, O., T. Seiboth, et al. (2006). "Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7." *Oncogene* **25**(44): 5953-5959.
- Onate, S. A., S. Y. Tsai, et al. (1995). "Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily." *Science* **270**(5240): 1354-1357.
- Park, J. S., E. J. Kim, et al. (2000). "Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis." *J Biol Chem* **275**(10): 6764-6769.
- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2001). "Estimating the world cancer burden: Globocan 2000." *Int J Cancer* **94**(2): 153-156.
- Parkinson, L. G., A. Toro, et al. (2015). "Granzyme B mediates both direct and indirect cleavage of extracellular matrix in skin after chronic low-dose ultraviolet light irradiation." *Aging Cell* **14**(1): 67-77.
- Pavlova, I., K. Sokolov, et al. (2003). "Microanatomical and biochemical origins of normal and precancerous cervical autofluorescence using laser-scanning fluorescence confocal microscopy." *Photochem Photobiol* **77**(5): 550-555.
- Phelps, W. C., K. Munger, et al. (1992). "Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein." *J Virol* **66**(4): 2418-2427.
- Phelps, W. C., C. L. Yee, et al. (1988). "The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A." *Cell* **53**(4): 539-547.

- Polyak, K. (1996). "Negative regulation of cell growth by TGF beta." *Biochim Biophys Acta* **1242**(3): 185-199.
- Provenzano, P. P., D. R. Inman, et al. (2008). "Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression." *BMC Med* **6**: 11.
- Rabinovich, G. A. (2004). "Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina. Un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica".
- Rihet, S., M. Lorenzato, et al. (1996). "Oncogenic human papillomaviruses and ploidy in cervical lesions." *J Clin Pathol* **49**(11): 892-896.
- Riley, R. R., S. Duensing, et al. (2003). "Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis." *Cancer Res* **63**(16): 4862-4871.
- Rugeles, L. M. T., G. J. P. Patiño, et al. (2009). Inmunología: Una ciencia activa, Editorial Universidad de Antioquia.
- Sabbah, M., K. I. Kang, et al. (1998). "Oestrogen receptor facilitates the formation of preinitiation complex assembly: involvement of the general transcription factor TFIIB." *Biochem J* **336** (Pt 3): 639-646.
- Sanabria Negrín, J. G. (2009). "Virus del Papiloma humano." *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río* **13**: 168-187.
- Santer, F. R., B. Moser, et al. (2007). "Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein inhibits apoptosis mediated by nuclear insulin-like growth factor-binding protein-3 by enhancing its ubiquitin/proteasome-dependent degradation." *Carcinogenesis* **28**(12): 2511-2520.
- Scotland, R. S., A. Ahluwalia, et al. (2005). "C-type natriuretic peptide in vascular physiology and disease." *Pharmacol Ther* **105**(2): 85-93.
- Scott, R. J., P. A. Hall, et al. (1991). "A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction." *J Pathol* **165**(2): 173-178.
- Seavey, S. E., M. Holubar, et al. (1999). "The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 stabilizes p53 through a mechanism independent of p19(ARF)." *J Virol* **73**(9): 7590-7598.
- Shai, A., T. Brake, et al. (2007). "The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities." *Cancer Res* **67**(4): 1626-1635.
- Simonetta, F., A. Pradier, et al. (2016). "T-bet and Eomesodermin in NK Cell Development, Maturation, and Function." *Front Immunol* **7**: 241.
- Smotkin, D. and F. O. Wettstein (1986). "Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(13): 4680-4684.
- Soberón, M. L. and A. L. Saavedra (2006). "Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina." *Cancerología* **1**: 31-50.
- Son, J., J. W. Park, et al. (2014). "Requirement of estrogen receptor alpha DNA-binding domain for HPV oncogene-induced cervical carcinogenesis in mice." *Carcinogenesis* **35**(2): 489-496.
- Song, S., G. A. Gulliver, et al. (1998). "Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes abrogate radiation-induced DNA damage responses in vivo through p53-dependent and p53-independent pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2290-2295.
- Song, S., A. Liem, et al. (2000). "Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis." *Virology* **267**(2): 141-150.
- Soriano, C., V. Mukaro, et al. (2012). "Increased proteinase inhibitor-9 (PI-9) and reduced granzyme B in lung cancer: mechanism for immune evasion?" *Lung Cancer* **77**(1): 38-45.
- Thorland, E. C., S. L. Myers, et al. (2003). "Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors." *Oncogene* **22**(8): 1225-1237.

- Thornton, M. J., A. H. Taylor, et al. (2003). "Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin." Exp Dermatol **12**(2): 181-190.
- Torres, D., M. Barrier, et al. (2004). "Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection." Infect Immun **72**(4): 2131-2139.
- Velazquez-Marquez, N., M. A. Paredes-Tello, et al. (2009). "Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from a rural region of Puebla, Mexico." International Journal of Infectious Diseases **13**(6): 690-695.
- Venturoli, S., S. Ambretti, et al. (2008). "Chemiluminescent quantitative immunohistochemical p16 INK4A localization as a marker for cervical intraepithelial neoplasias." Int J Gynecol Pathol **27**(4): 575-581.
- Verdier-Sevrain, S., M. Yaar, et al. (2004). "Estradiol induces proliferation of keratinocytes via a receptor mediated mechanism." FASEB J **18**(11): 1252-1254.
- Vieira, K. B., D. J. Goldstein, et al. (1996). "Tumor necrosis factor alpha interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus-immortalized human keratinocytes." Cancer Res **56**(10): 2452-2457.
- Villa, L. L., K. B. Vieira, et al. (1992). "Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18." Mol Carcinog **6**(1): 5-9.
- Watanabe, S., T. Kanda, et al. (1990). "Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 functions." J Virol **64**(1): 207-214.
- Watt, F. M. (1998). "Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **353**(1370): 831-837.
- White, E., R. Cipriani, et al. (1991). "Adenovirus E1B 19-kilodalton protein overcomes the cytotoxicity of E1A proteins." J Virol **65**(6): 2968-2978.
- Yim, E. K. and J. S. Park (2007). "Biomarkers in cervical cancer." Biomark Insights **1**: 215-225.
- Yoon, C. S., K. D. Kim, et al. (2001). "alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP." Biochem Biophys Res Commun **283**(3): 668-673.
- Zerfass-Thome, K., W. Zwerschke, et al. (1996). "Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein." Oncogene **13**(11): 2323-2330.
- Zhang, F. and G. Du (2012). "Dysregulated lipid metabolism in cancer." World J Biol Chem **3**(8): 167-174.
- Zwerschke, W., S. Mazurek, et al. (1999). "Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1291-1296.