



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



**“Análisis de la expresión de genes asociados a la
invasión y metástasis en el desarrollo del Cáncer
Cérvico-uterino”**

TESIS

Que para obtener el título de Licenciado en
Biología

PRESENTA:

Francisco Calderón Estrella

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Patricia Piña Sánchez



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



Sinodales

Presidente:	Dr. Federico Ávila Moreno
Vocal	Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez
Secretario:	Dra. Patricia Piña Sánchez
Suplente:	Dr. Carlos Pérez Plasencia
Suplente:	Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Oncología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas (U.I.M.E.O.) del Hospital de Oncología de Centro Médico Nacional Siglo XXI. El proyecto fue financiado por el IMSS, con número de registro FIS/IMSS/PROT/G10/873.



AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala** por albergarme durante mi formación profesional brindándome conocimientos y oportunidades.

A la **Dra. Patricia Piña Sánchez**, quien me abrió las puertas de su laboratorio brindándome su confianza, guiándome y por permitirme formar parte de tan agradable y excelente equipo de trabajo.

DEDICATORIA

A mi mamá, quien siempre me ha apoyado en cada una de las decisiones que he tomado y sé que en las futuras lo seguirá haciendo brindándome consejos siempre para mi beneficio. Por ser una gran madre al anteponer siempre mis necesidades sobre las suyas pidiéndome únicamente a cambio cumplir con mis responsabilidades y ser cada día mejor.

A mi papá, quien también es uno de mis pilares en mi vida y en mi formación, siempre motivándome y siendo un ejemplo para mí de responsabilidad y dedicación.

Y a ambos, sé que no lo expreso lo suficiente pero saben que los quiero, siempre los llevo en mis pensamientos y estoy muy agradecido por todo lo que hacen por mí, sobre todo por ser tan pacientes durante el tiempo que me tomó realizar esta tesis y por apoyarme en mi decisión para seguir estudiando, creyendo siempre en mi capacidad para obtener éxito a cada paso que dé.

A mis amigas y compañeras de laboratorio (Ana, Ceci, Cindy, Diana, Magda y Marlen), porque cada una de ustedes de alguna forma me apoyo en la realización de este trabajo y porque de este equipo aprendí muchas cosas y me llevo grandes recuerdos de todo lo vivido a su lado dentro y fuera del laboratorio. Les deseo mucho éxito en cada cosa que hagan y nunca cambien porque eso ha hecho que este equipo sea auténtico y tan unido.

A Ana Luz, porque a tu lado fue como empecé a conocer este enorme campo de la investigación y tú me contagiaste esas ganas de siempre estar aprendiendo cosas nuevas y no estar estático.



CONTENIDO

Sección	Página
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
SIGLAS Y ABREVIATURAS	XI
1 RESUMEN	12
2 INTRODUCCIÓN	13
2.1. Cáncer	13
2.1.1. Cáncer Cérvico-uterino (CaCu)	14
2.1.1.1. Factores de riesgo asociados a CaCu	16
2.1.1.2. Cérvix uterino	16
2.1.1.3. Lesiones precursoras	18
2.2. Virus del Papiloma Humano (VPH)	19
2.2.1. Clasificación taxonómica	19
2.2.2. Genoma viral del VPH	20
2.2.3. Ciclo viral	22
2.2.4. Oncoproteínas virales	23
2.2.5. Alteraciones moleculares asociadas al desarrollo de CaCu	24
3 ANTECEDENTES	25
3.1. Invasión y metastasis	25
3.1.1. Via relacionada con la progresión tumoral	27
3.1.2. Genes asociados con la invasión y metástasis	29
3.1.2.1. <i>TWIST-1</i>	29
3.1.2.2. <i>TWIST-1</i> y cáncer	29
3.1.2.3. <i>HOXD10</i>	32
3.1.2.4. <i>HOXD10</i> y cáncer	32
3.1.2.5. ARN no codificante	33

3.1.2.6. <i>HOTAIR</i> y cáncer.....	34
4 JUSTIFICACIÓN	35
5 OBJETIVOS	36
5.1. Objetivo general	36
5.2. Objetivos particulares.....	36
6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	37
6.1. Selección de muestras biológicas	37
6.2. Procesamiento del muestras para extracción de ácidos nucleicos....	38
6.3. Extracción de ácidos nucleicos	38
6.4. Síntesis de cDNA.....	38
6.5. PCR-tiempo real (RT-PCR).....	39
6.6. Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica.....	39
6.7. Análisis de imágenes	40
6.8. Detección de VPH.....	41
6.8.1. Hibridación <i>in situ</i> (ISH) de VPH �S de alto riesgo y p16.....	41
6.8.2. Detección de VPH por medio de PCR punto final	41
6.8.3. Genotipificación por medio de <i>Linear Array</i> ®	42
7 RESULTADOS	43
7.1. Expresión de los genes <i>TWIST-1</i> , <i>HOXD10</i> y <i>HOTAIR</i>	43
7.2. Expresión de las proteínas	44
7.2.1. Análisis cualitativo de la expresión de las proteínas	46
7.2.2. Análisis de imágenes	50
7.2.3. Inmunocitoquímica	54
7.3. Detección de VPH.....	55
8 DISCUSIÓN	60
9 CONCLUSIONES.....	65
10 LITERATURA CITADA	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Porcentaje y frecuencia de muestras del grupo control y casos que expresaron los genes <i>TWIST-1</i> , <i>HOXD10</i> Y <i>HOTAIR</i>	44
2. Porcentaje y frecuencia de las muestras a partir de la intensidad de las proteínas analizadas.	49
3 Expresión de las proteínas RE- α <i>TWIST-1</i> y <i>HOXD10</i> en líneas celulares de cérvix y mama	54
4. Porcentaje y frecuencia de muestras con infección de VPH analizadas por medio de PCR, ISH y p16.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Hallmarks del cáncer	14
2. Incidencia y mortalidad del Cáncer Cervico-uterino a nivel mundial y en países en vías de desarrollo	15
3. Anatomía del cervix-uterino humano y arquitectura del ecto y endocervix	17
4. Localización de la unión escamo-columnar y la zona de transformación.....	18
5. Lesiones precursoras del Cáncer Cervico-uterino (CaCu).....	19
6. Genoma viral del Virus del Papiloma Humano (VPH)	21
7. Organización del ciclo de vida del Virus del Papiloma Humano (VPH)	23
8. Patrón de expresión de las proteínas de VPH durante la progresión a carcinoma.....	24
9. Proceso de invasión y metástasis.....	26
10. Modelos del proceso metastásico	27
11. Vía de señalización asociada con la invasión	28
12. Estrategia experimental.....	37
13. Expresión de los genes <i>TWIST-1</i> , <i>HOXD10</i> y <i>HOTAIR</i> en muestras de epitelio cervical normal y CaCu	43
14. Hibridación in situ e inmunohistquímica de las proteínas p16, TWIST-1, HOXD10, RE- α y RE- β en epitelio cervical normal, lesión precursora y CaCu	45
15. Análisis cualitativo de la expresión de la proteína TWIST-1 en el grupo control y casos. .	46
16. Analisis cualitativo de la expresión de la proteína HOXD10 en el grupo control y casos .	47
17. Analisis cualitativo de la expresión de la proteína RE- α en el grupo control y casos	48
18. Analisis cualitativo de la expresión de la proteína RE- β en el grupo control y casos.....	48
19. Análisis del porcentaje de expresión nuclear mediante <i>Image J</i> y promedio del porcentaje de expresión de la proteína TWIST-1 en el grupo control y casos.....	50
20. Análisis del porcentaje de expresión nuclear mediante <i>Image J</i> y promedio del porcentaje de expresión de la proteína HOXD10 en el grupo control y casos.	51

21. Análisis del porcentaje de expresión nuclear mediante Image J y promedio del porcentaje de expresión de la proteína RE- α en el grupo control y casos.	52
22. Análisis del porcentaje de expresión nuclear mediante Image J y promedio del porcentaje de expresión de la proteína RE- β en el grupo control y casos	53
23. Inmunocitoquímica de la proteínas RE- α , TWIST-1 y HOXD10 en líneas celulares de cervix: HeLa, Caski y SiHa.....	54
24. Hibridación in situ (ISH) y p16 en spots del grupo control (epitelio cervical normal) y casos (lesión precursora y CaCu).	55
25. Evaluación de la calidad y detección de VPH en muestras del grupo control (epitelio cervical normal) y de casos (lesión precursora y CaCu).	57
26. Evaluación de la calidad y detección de VPH en muestras de casos (CaCu).....	58
27. Análisis de genes en epitelios cervicales humanos asociados a invasión y metástasis. ...	64



GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

bHLH basic hélix-loop-helix (hélice vuelta hélice)

CaCu Cáncer Cervico-uterino

ISH In-situ hybridization (Hibridación in situ)

NIC Neoplasia intraepitelial

ARNInc ARN largo no codificante

LIEBG Lesión intraepitelial de bajo grado

LIEAG Lesión intraepitelial de alto grado

LCR Long Control Region (Región larga de control)

PCR Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PML Promyelotic leukemia

RE- α Receptor de estrógenos alpha

RE- β Receptor de estrógenos beta

VPH Virus del Papiloma Humano



1. Resumen

El cáncer Cervico-uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte e incidencia por cáncer en mujeres en países en vías de desarrollo. El principal factor etiológico asociado con este cáncer es la infección del Virus del Papiloma Humano (VPH), siendo necesaria la infección pero no suficiente como agente causal. Por lo que es necesaria la identificación de alteraciones moleculares asociadas al desarrollo y progresión neoplásica. Una de las alteraciones descritas en CaCu, es la expresión del ARNm del gen homeótico *HOXD10*, sugiriendo su participación en el desarrollo de CaCu. *HOXD10* es susceptible de regulación transcripcional y post-transcripcional mediada por los ARN no codificantes *HOTAIR* y *mir-10*, éste último regulado a su vez por *TWIST-1*, cuyo producto proteico se ha identificado en CaCu. Estos genes forman parte de una vía de invasión y metástasis en cáncer de mama, donde la activación de *TWIST-1* y pérdida de *HOXD10* promueven la invasión. A la fecha no se conoce el perfil de expresión a nivel de proteína *HOXD10* y su asociación con la expresión de *TWIST-1* y *HOTAIR*, por lo que en el presente trabajo, se analizó la expresión de las proteínas *TWIST-1* y *HOXD10* en epitelios cervicales normales, lesiones precursoras y CaCu, así como el transcrito *HOTAIR*. Los resultados indican la presencia de *TWIST-1* en epitelios cervicales normales tanto a nivel de ARNm como de proteína, lo cual indicaría alguna función asociado al desarrollo y mantenimiento epitelial normal, aunque no hay reportes al respecto. Se identificó incremento de la expresión de *HOXD10* y *TWIST-1* en la progresión de CaCu; sin embargo, no identificamos asociación entre la expresión de *HOXD10* y *HOTAIR*. Es posible que la expresión de *HOXD10* en CaCu no esté relacionada a la función supresora de tumor, como se ha reportado en otros tipos de cáncer. Por último se encontró una relación inversa entre la expresión del receptor de estrógenos alfa ($RE-\alpha$) y *TWIST-1*, lo cual concuerda con el modelo de regulación del $RE-\alpha$ mediado por *TWIST-1*. Finalmente, el incremento de expresión de los genes *TWIST-1* y *HOTAIR* en un grupo de lesiones precursoras y CaCu, sugiere que la desregulación de genes involucrados en invasión y metástasis es un evento temprano en el desarrollo del CaCu.

Palabras claves: Invasión y metástasis, CaCu, VPH, *TWIST-1*, *HOXD10*, *HOTAIR*



2. Introducción

2.1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial asociada a diversos factores (genéticos, epigenéticos y ambientales), dando como resultado la alteración de diversos procesos celulares. Mismos que han sido nombrados como *hallmarks* del cáncer, representando aquellas alteraciones que la célula adquiere durante el desarrollo de la mayoría de las neoplásicas malignas. Dichas características son: mantenimiento de la señal proliferativa, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, capacidad de replicación ilimitada, inducción de la angiogénesis, activación de la invasión y metástasis, reprogramación metabólica y evasión del sistema inmune (Hanahan y Weinberg, 2011; You y Jones, 2012).

El cáncer, es la principal causa de muerte en países desarrollados y la segunda en países en desarrollo. En el año 2008 se estimaron a nivel mundial, 12.7 millones de casos de cáncer y 7.6 millones de muertes. Actualmente el número de casos ha aumentado como resultado del envejecimiento y el crecimiento poblacional, así como la adquisición de algunos hábitos asociados al desarrollo de cáncer como fumar, el alcohol, el sedentarismo, obesidad y la mala alimentación (Jemal *et al*, 2011).

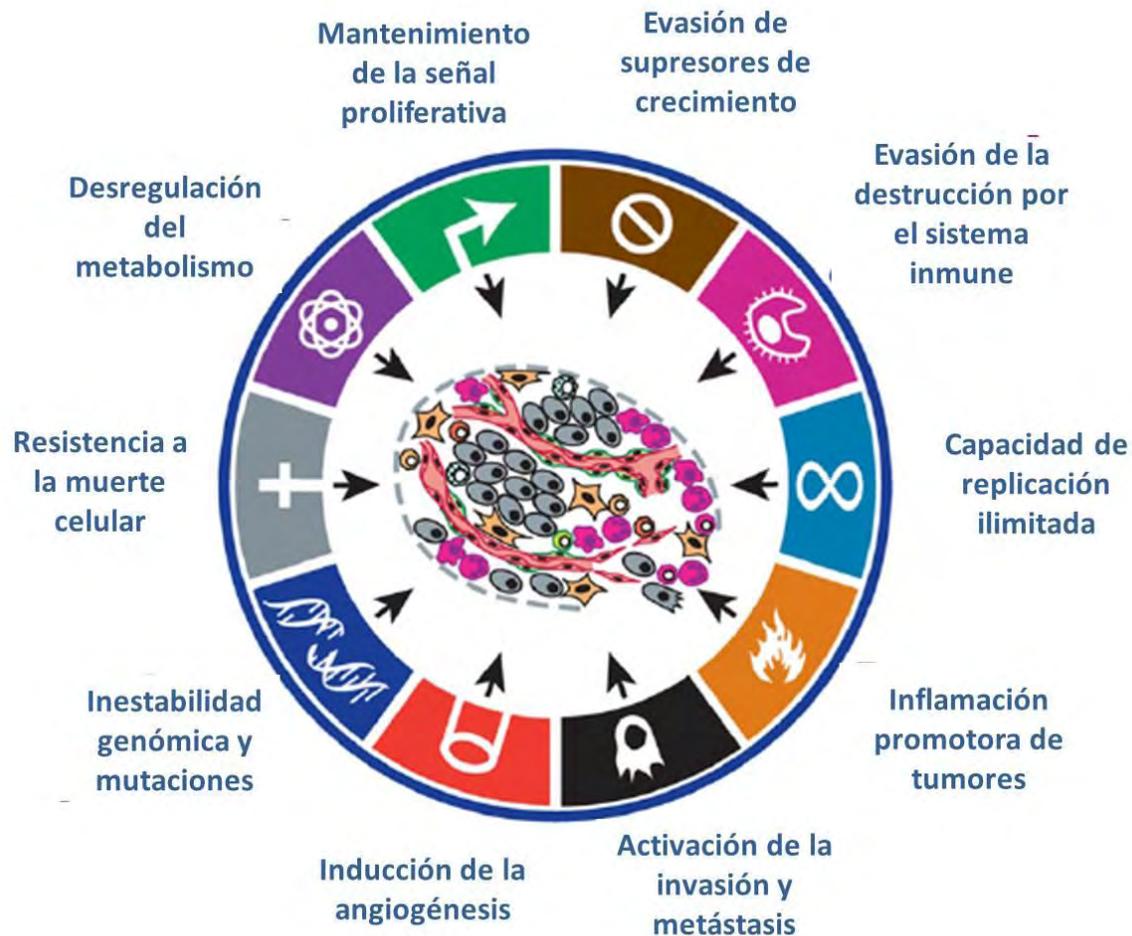


Figura 1. Hallmarks del cáncer (Tomado y modificado de Hanahan y Weinberg, 2011)

2.1.1. Cáncer cérvico-uterino (CaCu)

En 2008, el cáncer cérvico-uterino (CaCu) ocupó el tercer lugar en incidencia y fue la cuarta causa de muerte en mujeres por cáncer a nivel mundial, aportando el 9% (529,800 casos) del total de nuevos casos y el 8% (270,100 casos) del total de muertes asociados a algún tipo de cáncer (figura 1). Más del 85% de dichos casos ocurren en países en vías de desarrollo, un ejemplo es el segundo lugar en incidencia en México (Figura 2) (Jemal *et al*, 2011; Human papillomaviruses and related cancers SUMMARY REPORT WHO, 2010).

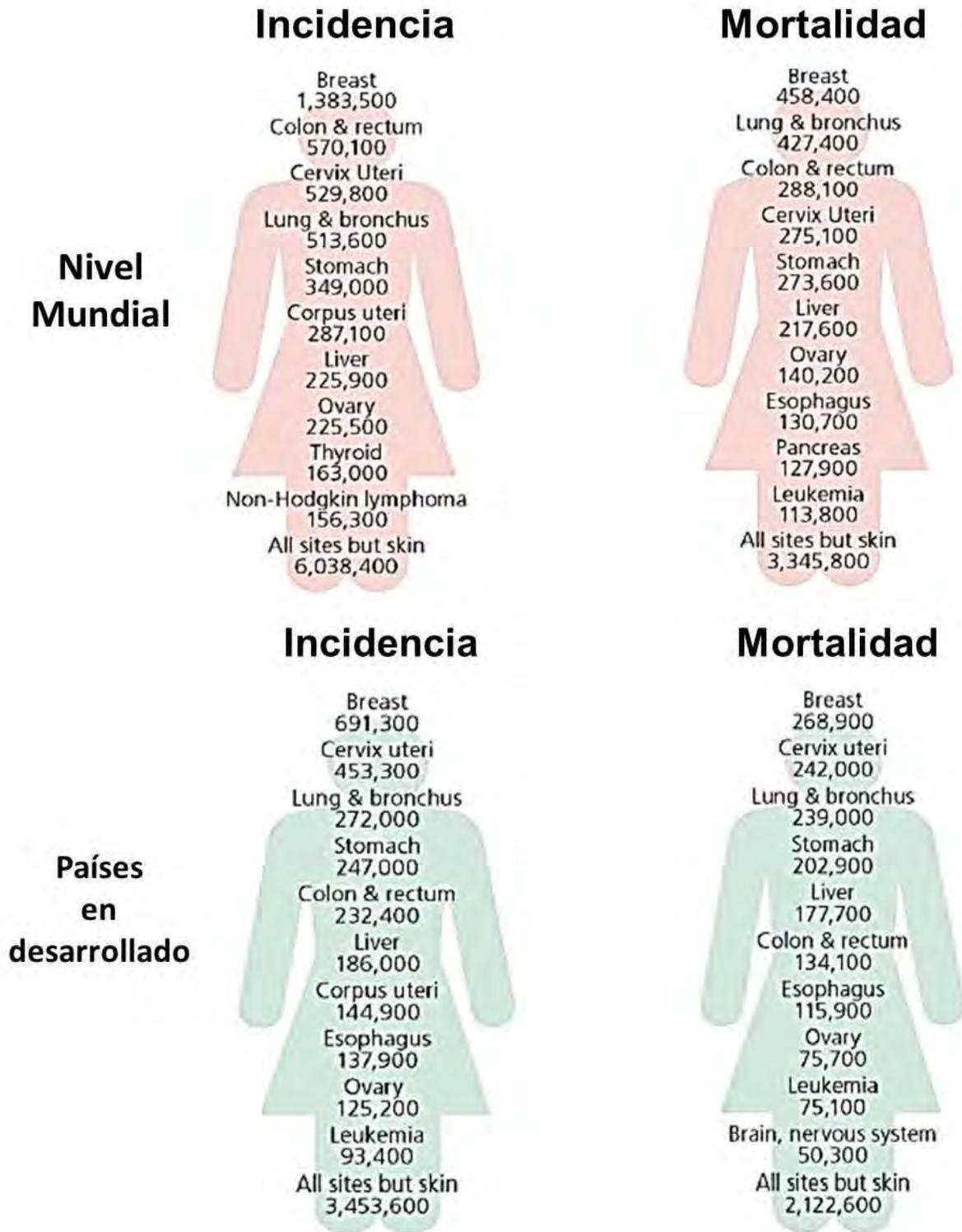


Figura 2. Incidencia y mortalidad de Cáncer cérvico-uterino en mujeres a nivel mundial y en países en desarrollo. (Tomado y modificado de Jemal *et al*, 2011).



2.1.1.1. Factores de riesgo asociados al desarrollo de CaCu

La infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) es el principal factor etiológico asociado con el desarrollo de CaCu, siendo necesaria la infección pero no suficiente como agente causal. Adicionalmente, otros factores de riesgo tales como múltiples parejas sexuales, el tabaquismo, uso de anticonceptivos hormonales, personas inmunodeficientes y número de embarazos se asocian al riesgo a desarrollar CaCu (Walboomers, 1999; Bosch *et al* 2002).

2.1.1.2. Cérvix uterino

El cérvix es la porción fibromuscular baja del útero de forma cilíndrica o cónica con una longitud aproximada de 3 a 4cm y un diámetro de 2.5cm. La parte inferior del cérvix, abre hacia la vagina a través de un orificio externo (o abertura externa). La porción externa del cuello uterino alrededor del orificio externo se denomina ectocérvix mientras que la región proximal interna al orificio se denomina endocérvix, el cual es atravesado por el canal cervical encargado de conectar la cavidad uterina con la vagina. El cérvix está constituido de dos tipos de epitelio, el ectocérvix formado por epitelio de células escamosas y endocérvix por epitelio de células columnares (Figura 3), interaccionando mediante la unión escamo-columnar, la cual varía en posición dependiendo de la anatomía del cérvix y el estado hormonal. Durante la infancia y menarquía dicha unión se mantiene cercana al orificio externo, ya en la pubertad y el periodo reproductivo el canal endocervical se alarga provocando la eversión del endocervix en el ectocervix y debido a la acidificación vaginal el epitelio columnar es reemplazado por células metaplásicas dicha zona donde se realiza este cambio se denomina zona de transformación, posteriormente estas células darán origen al epitelio metaplásico escamoso con lo cual la unión escamo columnar cambia de su posición original (Figura 4) (Sellors y Sankaranarayanan, 2003).

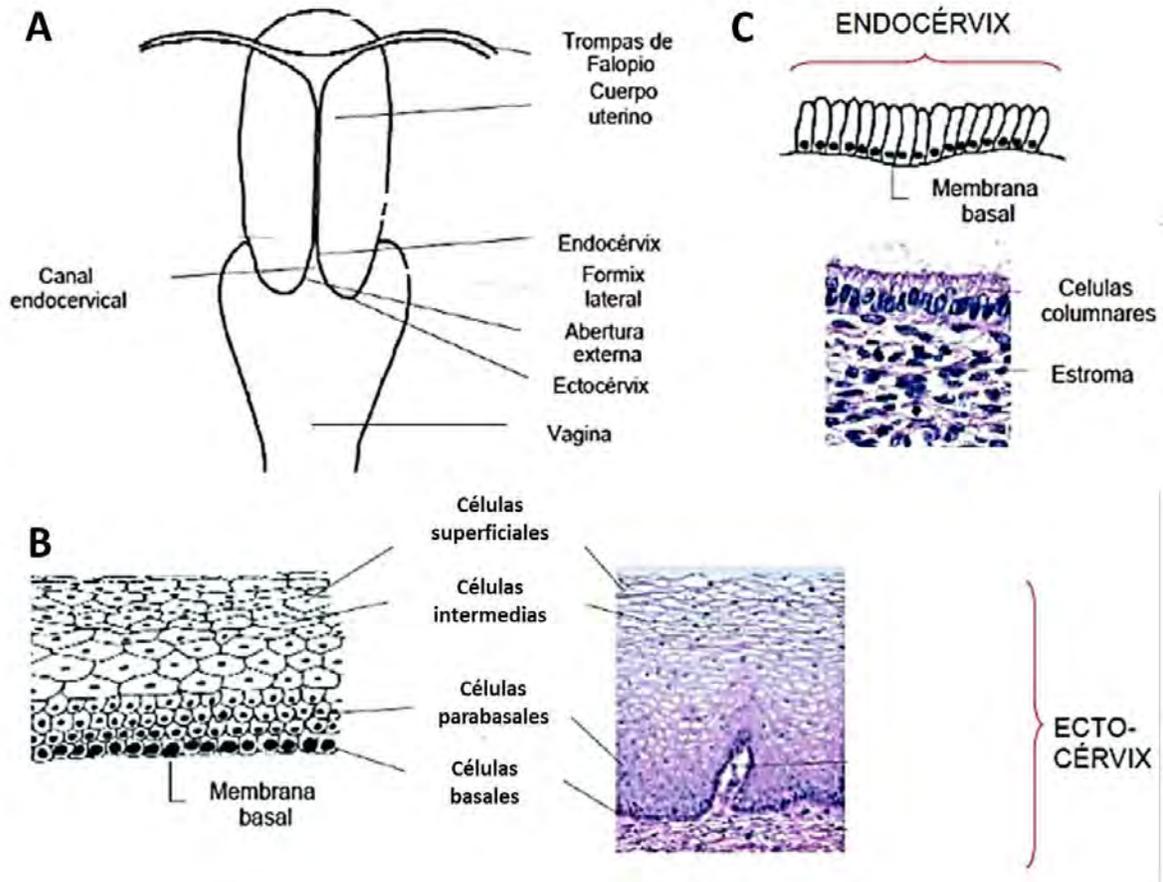


Figura 3. Anatomía del cérvix uterino humano (A) y arquitectura epitelial del ectocervix (B) y endocervix (C) (Tomado y modificado de Sellors y Sankaranarayanan, 2003).

Se ha tratado de establecer la posible preferencia topográfica en el epitelio para la progresión de lesiones precursoras a cáncer de cérvix asociado a infección por VPH, mediante la identificación de una población de células en la interfase del epitelio escamoso y columnar (unión escamo-columnar) dado que pueden dar origen a células ecto y endocervicales. Dicha población presenta expresión única de genes y morfología cuboidal diferente a los dos epitelios. A partir de los genes identificados se estableció un inmunofenotipo celular (KRT7, AGR2, CD63, MMP7 y GDA), el cual también se identificó en lesiones intraepiteliales cervicales grado 2 y 3 (NIC 2/3) así como en carcinomas asociados a infección por VPH (Herfs *et al*, 2012).

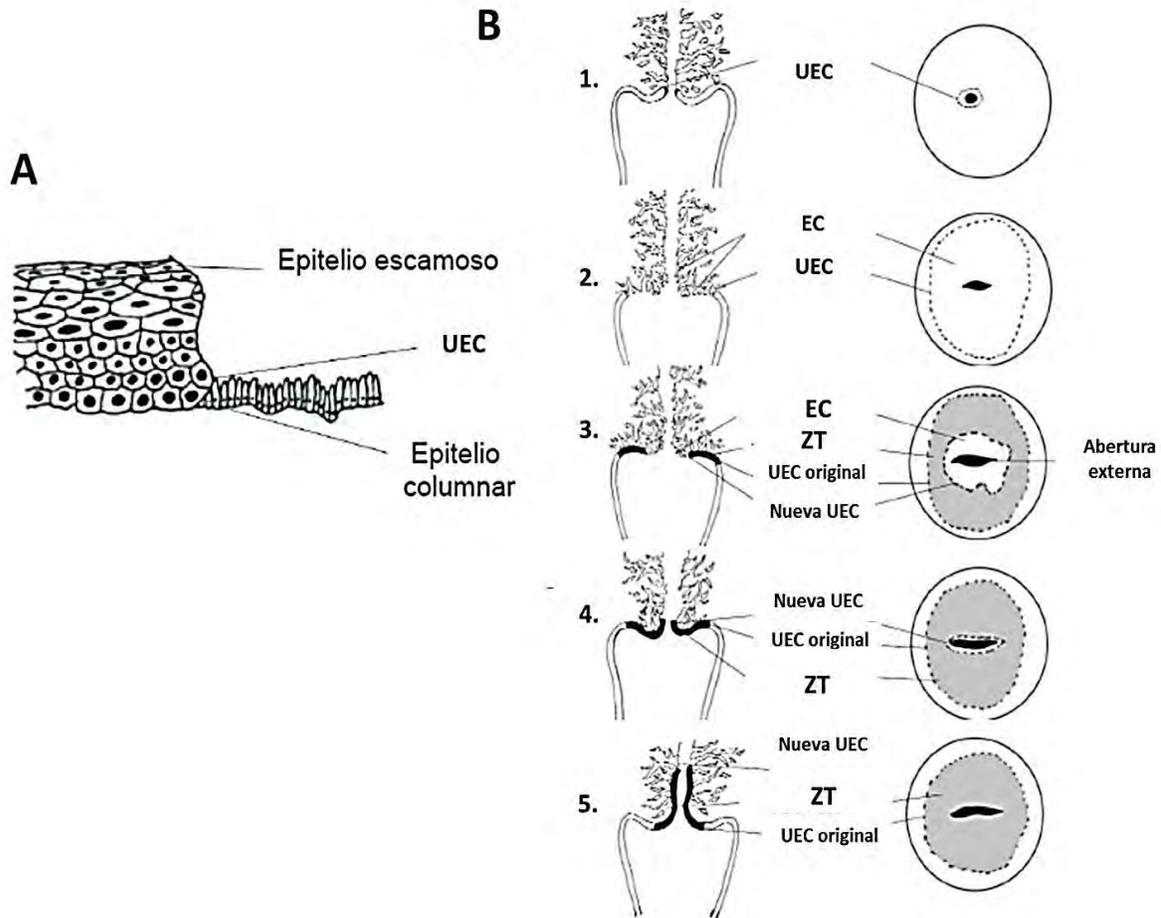


Figura 4. Localización de la unión escamo-columnar (A) y la zona de transformación (B) en el cervix antes de la menarquía(1), durante la pubertad (2), mujeres alrededor de los 30's (3), mujeres perimenopáusicas (4) y posmenopáusicas(5). Unión escamo-columnar (UEC), epitelio columnar (EC) y zona de transformación (ZT). (Tomado y modificado de Sellors y Sankaranarayanan, 2003)

2.1.1.3. Lesiones precursoras

La patogénesis del cáncer cérvico-uterino involucra la interrupción de la diferenciación del epitelio cervical, desarrollándose inicialmente lesiones con diferentes grados siendo importante su identificación para el tratamiento de neoplasias del cérvix. La primera clasificación se realizó en 1930 y se designó con el término displasia. De acuerdo a su gravedad se denominaba: leve, moderada o severa. En 1968 se cambió a Neoplasia cervical intraepitelial con diferentes grados (1, 2 y 3) o carcinoma *in situ*, dependiendo del porcentaje de epitelio involucrado en la lesión. La clasificación más reciente es la desarrollada en 1988, conocida como sistema Bethesda adquiriendo los términos de lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG) incluyendo a infecciones por VPH, la displasia leve o NIC1, y de alto grado (LIEAG)



incluyendo a displasias moderadas y severas o NIC 2-3 (Broso ,1993; Dzul- Rosado *et al*, 2004; Hadzicet *al*, 1999).

La mayoría de las lesiones ocasionadas o asociadas a VPH, tanto de potencial oncogénico como no oncogénico (Muñoz *et al*, 2003), revierten en mujeres inmunocompetentes. Sin embargo, cerca del 25% persisten hasta el desarrollo de LIEBG o su equivalente histológico, neoplasia cervical intraepitelial cervical grado 1 (NIC 1). Estas manifestaciones transitorias de la infección viral se caracterizan por mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en el tercio inferior del epitelio, mostrando anomalías menores de la célula. Durante el proceso de infección, la zona T (transición del ectocérvix con endocérvix) presenta metaplasia escamosa atípica. Aproximadamente 20% al 40% de dichas lesiones progresará hacia LIEAG o NIC 2,-3, presentando mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en los tercios central y superior de la lesión, produciendo replicación continua de células inmaduras y eventualmente acumulación de anomalías genéticas que favorecen la progresión del cáncer cervical invasor (Figura 5) (Hildesheim *et al*, 1994; Ho, 1998; Holowaty *et al*, 1999).

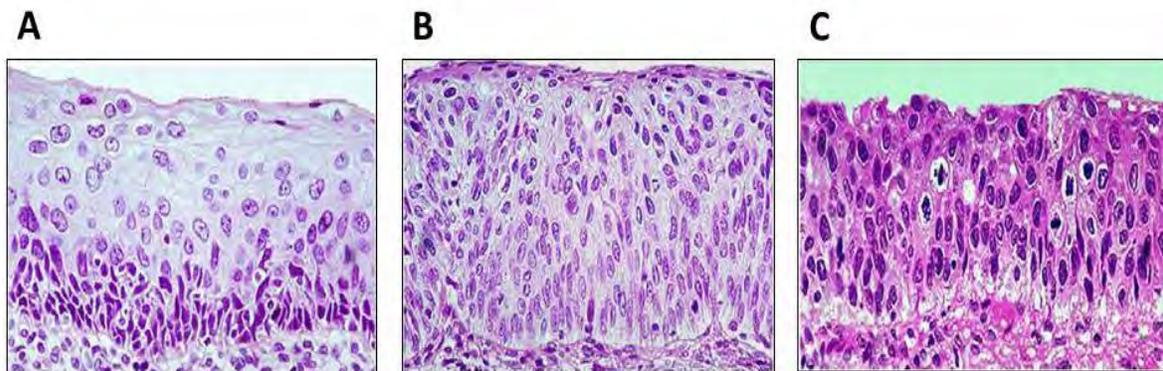


Figura 5. Lesiones precursoras del Cáncer Cervico-uterino(CaCu): (A) neoplasia intraepitelial 1(NIC1 ó CIN1), (B) neoplasia intraepitelial 2(NIC2 ó CIN2) y (C) neoplasia intraepitelial 3 (NIC3 ó CIN3) (Tomado y modificado de Cubie, 2013).

2.2. Virus del Papiloma Humano (VPH)

2.2.1. Clasificación taxonómica

Pertenciente a la familia *Papillomaviridae*, se clasifican en tres niveles taxonómicos, considerando la secuencia de L1 la cual se encuentra más conservado entre los virus (Chan



et al, 1992) . El primer nivel taxonómico es el género nombrado a partir de las letras griegas, siendo el género *alpha* el más importante ya que incluye a los VPH asociados a lesiones de mucosas y genitales. Dentro de los diferentes géneros se comparte aproximadamente 60% de homología en su secuencia de L1, reuniendo filogenéticamente especies similares pero biológicamente diferentes. El siguiente nivel es el de especies agrupando a virus con funciones biológicas similares. Por último, los tipos virales los cuales se determinan por diferencias en la secuencia del gen L1 (>10%). Un subtipo se establece al presentarse diferencias en la secuencia del mismo gen del 2% al 10% y variante si la diferencia es menor al 2%(Bernard, 2005).

Como ya se ha mencionado, el VPH está involucrado en el desarrollo del CaCu y sus precursores. Está formado de 72 capsómeros y con un diámetro de 55nm. En humano a partir de una revisión realizada por de Villiers (2013) han sido identificados aproximadamente 170 tipos virales. Los papilomavirus ocasionan tumores benignos como verrugas y papilomas. Al estar involucrados en el desarrollo de CaCu se han clasificado en aquellos de potencial oncogénico (HPV-18, HPV-16, HPV-39, HPV-45, HPV-59, HPV-68, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-52, HPV-58 y HPV-67, 73, 51, 82) y no oncogénicos (HPV-6, HPV-11, HPV-40, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-53, HPV-54, HPV-61, HPV-72, HPV-70 y HPV81) (Alba *et al*, 2009; Bosch *et al*, 2002; Doorbar, 2005; Muñoz *et al*, 2003).

2.2.2. Genoma viral del Virus del Papiloma Humano

El modelo del genoma basado en el VPH 16 consiste de un ADN circular de doble cadena (8kb), dividido en tres regiones: región larga de control (LCR); región de las proteínas tempranas, (E1, E2, E4, E5, E6, E7 y E8) y por último la región de las proteínas tardías, L1 (cápside mayor) y L2 (cápside menor).

La región LCR corresponde al 10% del genoma viral, contiene al promotor de las proteínas virales E6 y E7, el origen de replicación, sitios de unión de la proteína viral E2 encargados de la replicación y transcripción, el dominio *enhancer* o potenciador dependiente de los factores de transcripción celulares, así como el sitio de poliadenilación tardía. La región temprana representa el 45% del genoma, codifica para proteínas no estructurales cuya función está implicada en el control de la replicación e inducen la transformación de la célula hospedera del virus. E1 controla la replicación episomal del DNA, mientras que E2 participa en el reclutamiento de E1 al sitio de origen de replicación, así mismo regula la actividad del



promotor de las oncoproteínas E6 y E7. Las oncoproteínas E6 y E7 están involucrados en el ciclo celular, E6 inactivando a p53 mientras que E7 secuestra a pRb. La expresión E4 se asocia a aquellas células hospederas que expresan a las proteínas tardías, así mismo es importante en la liberación de las partículas virales y degradación de queratinas. Mientras que E5 está involucrado en el reciclado de factores de crecimiento. Por otro lado las proteínas tardías que corresponden al 40% del genoma, codifica proteínas estructurales de la cápside: L1 y L2 (Figura 6) (Alba *et al*, 2009).

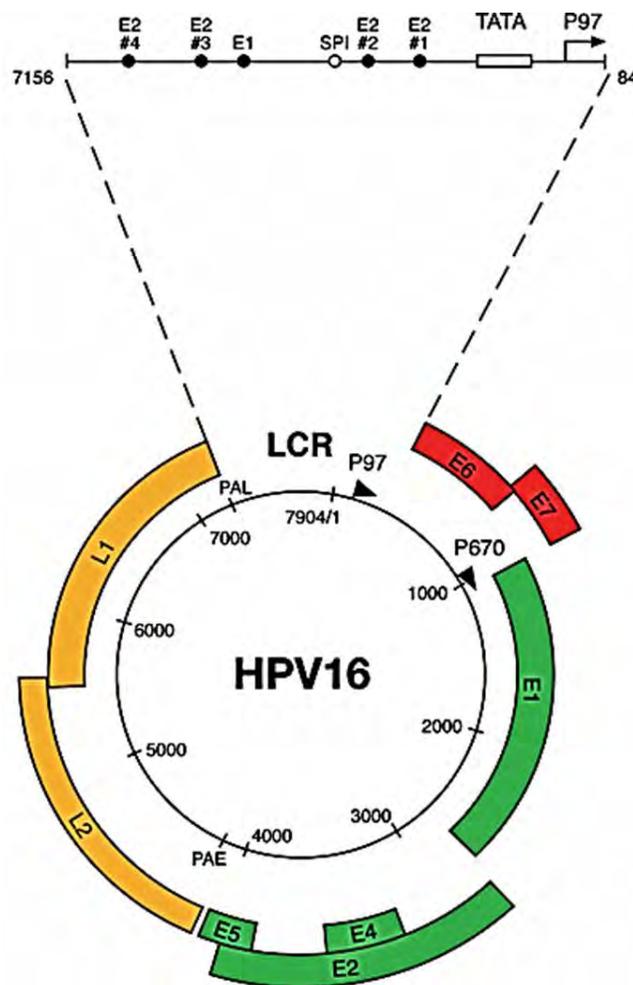


Figura 6. Genoma del Virus del Papiloma Humano(VPH). Región larga de control (LCR, Long Control Region), genes de las proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6, E7 y E8) y genes de las proteínas tardías (L1, cápside mayor; L2 cápside menor) (Modificado y tomado de Doorbar , 2006).



2.2.3. Ciclo viral

En una revisión realizada por Doorbar (2005) menciona que el VPH es dependiente de la diferenciación celular del epitelio para completar su ciclo y generar una infección productiva basándose en el estudio de VPH 16. El ciclo viral inicia con la penetración de partículas virales hacia el epitelio estratificado, llegando hasta la lámina basal a partir de microabrasiones en el tejido. Se ha propuesto que el acoplamiento del virus a la célula hospedera se da por la unión a receptores celulares como el complejo integrina alfa 6-beta 4, además de proteoglicanos de heparina localizados en la membrana y la posterior internalización a la célula a partir de la endocitosis de vesículas de clatrina. Dentro de la célula después de la ruptura de la cápside, se establece el genoma viral como episoma (manteniéndose alrededor de 10-200 copias por célula) requiriendo de proteínas para la replicación y segregación a los cromosomas mitóticos: E1 que tiene actividad de helicasa y E2, la cual es una proteína de unión a ADN, reconoce motivos palíndromos (AACC(N4)GGTT). En la región reguladora del virus se encuentran cuatro motivos de unión para E2, dos de ellos asociados con el reclutamiento de E1, replicación y con la regulación del promotor p97 de las oncoproteínas E6 y E7. Contrario de lo que sucede en las células epiteliales normales que inician la diferenciación una vez que migran hacia las capas superiores abandonando el ciclo celular, durante la fase proliferativa del virus, la proteína E7 en conjunto con E6 suprimen la salida del ciclo celular retardando la diferenciación por medio de la asociación a proteínas reguladoras del ciclo celular como pRB y p53 respectivamente. E7 provoca la disociación de pRb hipofosforilado de E2F, permitiendo la entrada a la fase S; E7 también se asocia a acetilasas de histonas, inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (p21 y p27), y participa en la expresión de la ciclina E. Por su parte E6 evita la inducción de la apoptosis por la entrada no programada a la fase S dada por p53 y proteínas como Bak y Bax; siendo un factor predisponente durante el desarrollo de cáncer asociado con infección por VPH. La producción de viriones implica la amplificación del genoma viral (por las proteínas E1 y E2) y su empaquetamiento en partículas infecciosas, ocurriendo en la parte media o capas más superficiales. Durante la síntesis del virus, las proteínas tardías (L1 y L2) encargadas de formar la cápside, se expresan en las capas más superficiales del epitelio. El empaquetamiento del genoma se da en estructuras nucleares denominadas cuerpos PML (Promyelocytic leukemia), donde la proteína L2 se acumula reclutando a su vez a L1, dichas proteínas se encuentran presentes en aquellas células que expresan E4.



Finalmente una vez que la amplificación del genoma ha sido completada y el virus empaquetado, en una cápside de 72 capsómeros es liberado del epitelio mediante la proteína E4 alterando la integridad de las citoqueratinas (Figura 7).

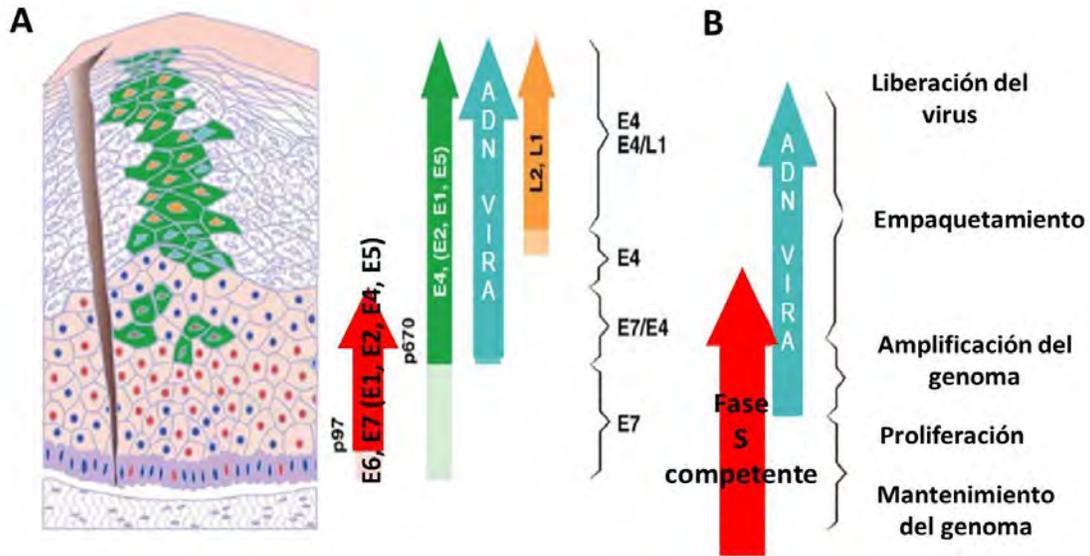


Figura 7. Organización del ciclo de vida del Virus del Papiloma Humano (VPH) durante la infección a partir de microabrasiones (A). Fases para la producción de nuevas partículas virales una vez que el virus se alberga en la célula epitelial (B) (Tomado y modificado de Doorbar, 2005).

2.2.4. Oncoproteínas virales

La producción del virus en la superficie epitelial es dependiente de la expresión ordenada de sus proteínas, lo cual durante la progresión de una neoplasia es perturbada. Tal es el caso en aquellas lesiones de alto grado donde la amplificación del genoma se realiza cercana a la superficie y la producción de proteínas de la cápside es retrasada. Esto puede deberse por cambios en los niveles de la expresión de las proteínas E6 y E7 ocurrida después de la integración del genoma viral al cromosoma de la célula hospedera. Dicha integración encontrada en la mayoría de cáncer invasivos y en algunas lesiones de alto grado. Lo que posteriormente origina la pérdida de E2 (regulador de la proliferación) y E4 (inhibiendo la mitosis previniendo la localización del complejo ciclina B/Cdk1), llevando por consiguiente a la desregulación de E6 y E7. La proteína E7 de virus de potencial oncogénico provoca anomalías en el centrosoma, incrementando las probabilidades de error durante cada ciclo de división. Así mismo la función ya caracterizada de dicha proteína mediante la disociación de pRb y E2F, permitiendo la proliferación y siendo más fuerte dicha función en aquellos virus de potencial oncogénico. Por su parte E6 forma un complejo con p53 y la



ubiquitinligasa E6AP, degradando a p53, inhibiendo la respuesta al daño mediada por dicha proteína. Se acumulan cambios secundarios en la célula hospedera que eventualmente con lleva al cáncer. Otro papel importante de E6 es el tener un dominio de unión C-terminal a dominios PDZ, haciendo blanco en proteínas como hDlg y hSrib involucradas en el crecimiento y unión célula-célula; lo que estaría involucrado en la pérdida de la polaridad de las células. También E6 participa en la activación de la unidad catalítica de la telomerasa (hTERT) añadiendo hexámeros a los extremos teloméricos de los cromosomas, permitiendo infección persistente y desarrollo de cáncer. Así mismo E6 y E7 actuando como antagonistas de la inhibición mediada por BRCA al promotor hTERT (Figura 8) (Doorbar, 2006).

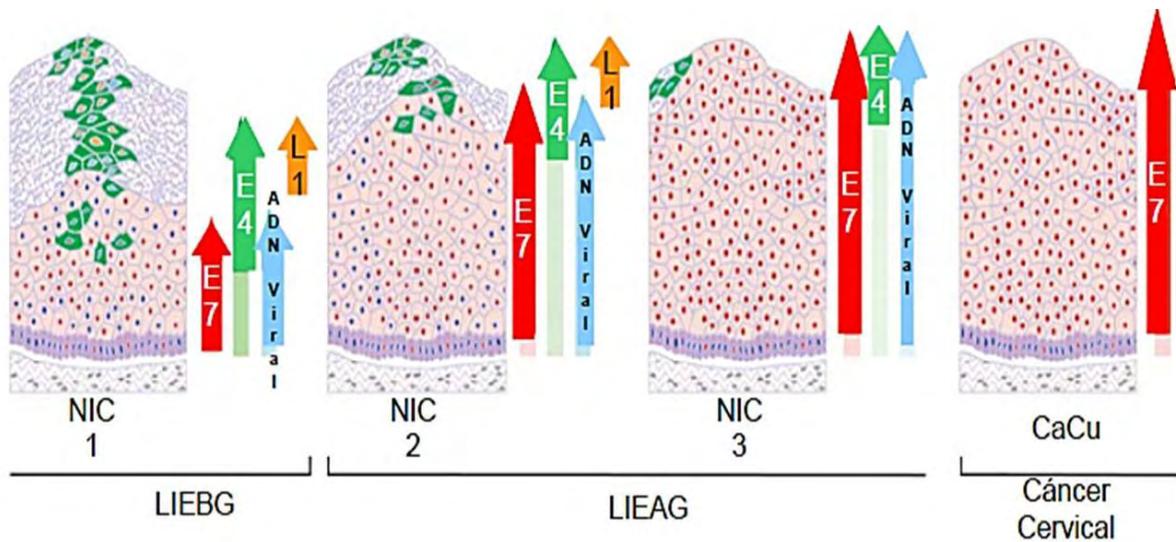


Figura 8. Patrón de expresión de las proteínas de VPH durante la progresión a cáncer cervical. Neoplasia intraepitelial cervical (NIC 1-3). Lesión intraepitelial cervical bajo (LIEBG) y alto grado (LIEAG). Cáncer cervicouterino (CaCu) (Tomado y modificado de Doorbar, 2006).

2.2.5. Alteraciones moleculares asociadas al desarrollo de CaCu

El desarrollo de CaCu como ya se había mencionado está estrechamente ligado a la infección por VPH de tipos virales de potencial oncogénico, entre ellos VPH-16 con una frecuencia del 60% en carcinomas escamosos, mientras que 18 encontrado del 10% al 14% en adenocarcinomas (Clifford *et al*, 2003), los cuales se desarrollan a partir de lesiones precursoras de bajo (LIEBG) y alto (LIEAG) grado o NIC1 (Neoplasia Intraepitelial Grado 1) y NIC2-3 (Neoplasia Intraepitelial Grado 2-3); esto derivado de la incapacidad de resolver la



infección o de la persistencia de esta. Se estima que 20% de los NIC 1 progresan a NIC 2 y de estos 30% progresarán a una neoplasia más severa como NIC 3 y sólo 40% progresará a cáncer invasor (Peto *et al* 2004). Sin embargo, la infección viral no es suficiente, ya que un bajo porcentaje de epitelios infectados con VPH de alto potencial oncogénico progresan hasta el desarrollo del CaCu, por lo es necesaria la participación de diversas alteraciones moleculares en el desarrollo de CaCu, tales como el silenciamiento de genes supresores de tumor, algunos de ellos directamente inactivados por las oncoproteínas virales E6 y E7, tal es el caso de p53 y pRb respectivamente (Scheffner *et al*, 1990; Boyer *et al*, 1996). Por otra parte, la integración del genoma viral presente en todos los carcinomas cervicales (Bosh *et al* 1995) y por último la acumulación de daños en el genoma no relacionados con el VPH (Lengauer *et al*, 1998).

3. *Antecedentes*

3.1. **Invasión y metástasis**

La progresión hacia grados patológicos con peor pronóstico en un carcinoma surgido de epitelios, involucra procesos de invasión y metástasis, los cuales forman parte de los *hallmarks* del cáncer. Dichos procesos asociados principalmente con la pérdida de moléculas de adhesión, la desregulación en la expresión de factores de transcripción, participación de ARN no codificantes (ARNnc), reorganización del citoesqueleto y la acción de enzimas degradadoras de la matriz extracelular; influyen en la aparición de un fenotipo invasor en células neoplásicas (Kalluri y Weinberg, 2009). Una forma de evidenciar todos estos cambios en la células es mediante la transición epitelio-mesénquima, la cual participa durante el desarrollo embrionario y la reparación de tejidos, dado que estos procesos involucran la migración celular hacia sitios distantes de su lugar de origen es de entenderse que esta transición reaparezca durante procesos de invasión, y que sea importante para dar origen a la metástasis (Kalluri y Weinberg 2009; Hanahan y Weinberg, 2011).

A partir de la capacidad que adquiere las células para colonizar nuevos sitios, se han establecido las etapas que se deben cumplir para desarrollar metástasis, consistiendo en: 1) pérdida de la polaridad por parte de las células hacia la membrana basal, 2) intravasación al sistema circulatorio o linfático, 3) extravasación de las células que sobreviven y salen del sistema circulatorio, 4) invasión y establecimiento en nuevos tejidos a partir de la



proliferación de pequeñas colonias (micrometástasis) y por último 5) la formación de un tumor secundario (Figura 9) (Hanahan y Weinberg, 2011; Kalluri y Weinberg 2009; Yang *et al* 2004; Yukota, 2000).

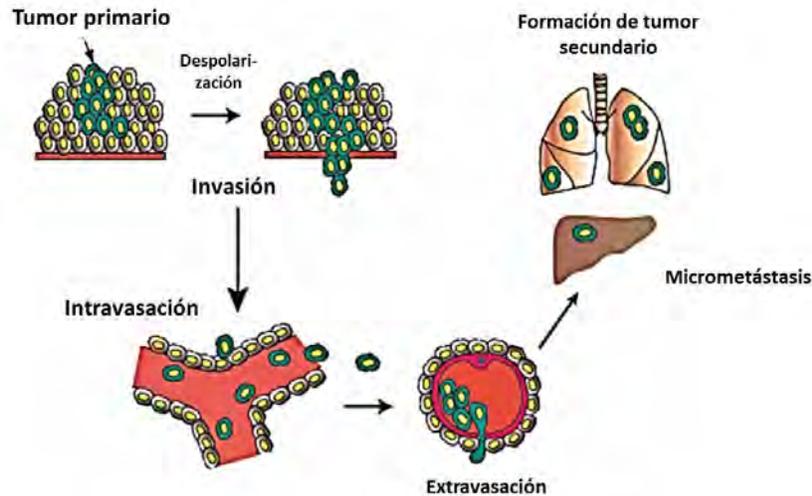


Figura 9. Proceso de invasión y metástasis. (Tomado y modificado de Hunter *et al*, 2008)

De acuerdo a lo anterior un tumor no es una población de células homogéneas, sino grupos celulares heterogéneos con diferentes elementos que aportaran a su desarrollo (Hanahan y Weinberg, 2011; Yukota, 2000). Por lo que existen diversos modelos para explicar el fenómeno de metástasis: (1) *selección clonal*: en la cual una población tumoral expresa todos aquellos genes requeridos para completar el proceso de la metástasis, (2) *evolución paralela*: la cual sugiere que la metástasis surge tempranamente durante la progresión del tumor generándose al mismo tiempo que el tumor primario, (3) *heterogeneidad dinámica*: la cual depende del número de variantes metastásicas presentes siendo determinantes en el potencial metastásico del tumor, (4) *dominancia clonal*: sugiere que una vez que se forma una subclona metastásica esta competirá y dominará el tumor por lo que tanto el tumor primario como la metástasis presentarán el mismo fenotipo; y por último (5) *célula stem del cáncer*: basado en la capacidad ilimitada de proliferación celular donde ciertas poblaciones adquieren capacidad formación de metástasis, aunque no queda claro aún si son verdaderamente *stem* o una subpoblación diferente (Figura 9) (Talmadge, 2012).

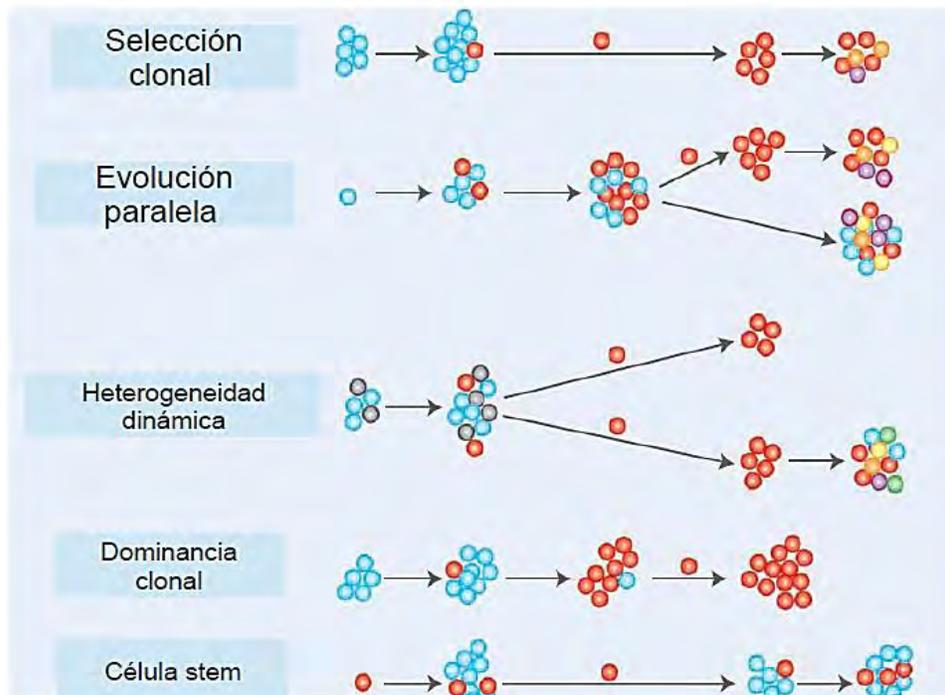


Figura 10. Modelos del proceso metastásico (Tomado y modificado de Talmadge, 2012).

3.1.1. Vía relacionada con la progresión tumoral: invasión y metástasis.

En base a lo antes mencionado, la identificación de biomarcadores asociados con la activación de la invasión y metástasis, son de gran importancia para determinar de manera temprana a pacientes con riesgo de progresión de la enfermedad. En este sentido, se han descrito en modelos celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231), algunos de los mecanismos inductores del fenotipo invasor mediante la reorganización del citoesqueleto, relacionando elementos ya identificados en el desarrollo de la metástasis. La vía inicia a partir de la unión de ácido hialurónico al receptor transmembranal CD44, activando a través de su dominio citoplasmático a la cinasa c-SRC. Debido a la fosforilación por medio de c-SRC, la proteína TWIST-1 se transloca al núcleo haciendo blanco en regiones génicas de control denominadas “E- boxes”. En la búsqueda de regiones “E-boxes”, se han identificado posibles sitios de unión del factor de transcripción TWIST-1, río arriba del microRNA mir-10b y se estableció que TWIST-1 es capaz de interactuar con dichas regiones localizadas dentro del promotor de mir-10b, regulando positivamente su expresión. Por su parte, mir-10b es capaz de regular post-transcripcionalmente a *HOXD10*, al cual se atribuyen funciones supresoras de tumor en algunos modelos tumorales y cuya inhibición favorece la expresión de RhoGTPasas (RhoA y RhoC) activando a la cinasa RHO y como consecuencia la



reorganización del citoesqueleto, promoviendo la aparición del fenotipo invasor en modelos celulares (MDA-MB-231) de cáncer de mama (Figura 9) (Bourguignon *et al*, 2010).

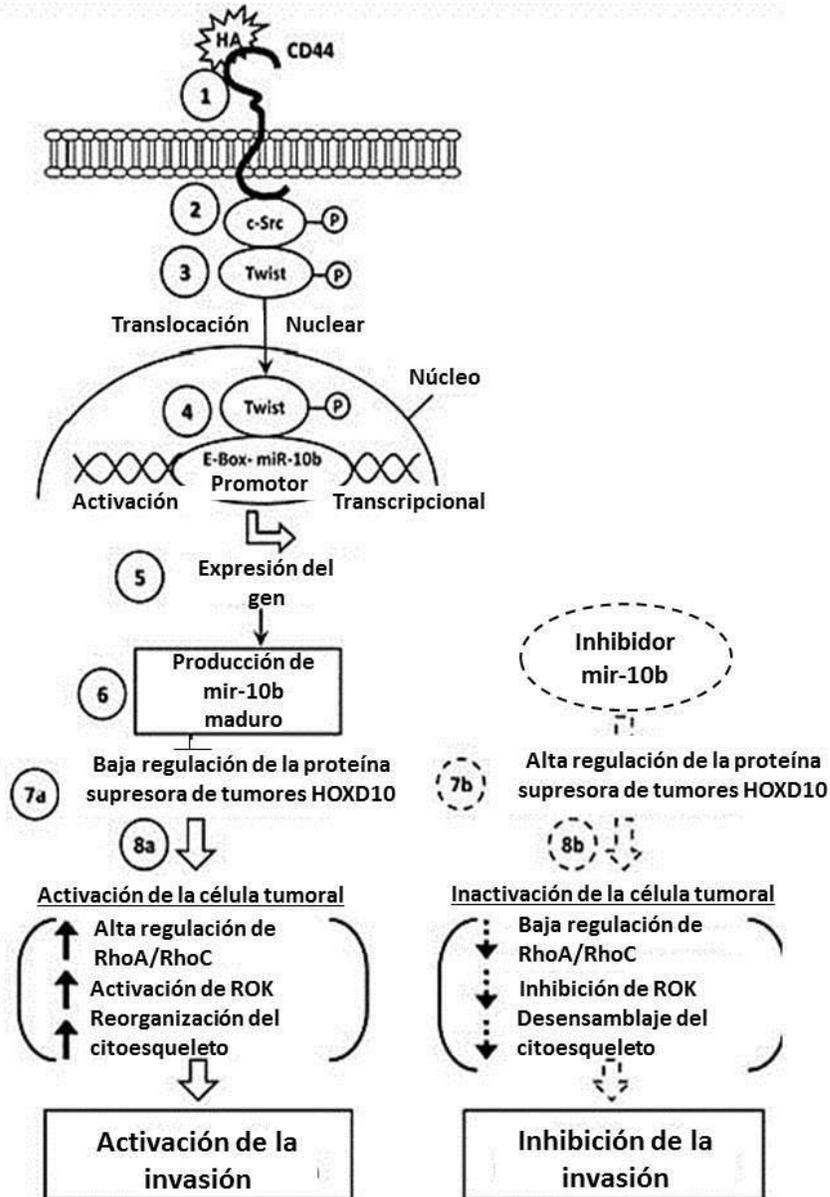


Figura 11. Vía de señalización asociada con la invasión a partir de la expresión de c-SRC y TWSIT-1 mediada por ácido hialurónico/CD44, en la regulación de la producción de mir-10b, expresión de HOXD10/RhoGTPasa y función del citoesqueleto por la activación de RHO cinasas en células de cáncer de mama (Tomado y modificado de Bourguignon *et al*, 2010).



3.1.2. Genes asociados con la invasión y metástasis: *TWIST-1*, *HOXD10*, *HOTAIR*

3.1.2.1. *TWIST-1*

El factor de transcripción *TWIST-1*, pertenece a la familia con dominio hélice-vuelta-hélice (bHLH), está agrupado en la clase B, ya que requiere de la unión de co-factores con el mismo dominio para aumentar su afinidad por el ADN. Dicho dominio se une a la secuencia consenso CATATG denominada “E-box”, la cual se ha identificado en elementos reguladores de genes asociados con la organogénesis (Jan *et al* 1993). Este factor de transcripción fue identificado inicialmente en *Drosophila melanogaster* cuya participación es importante durante la gastrulación en el desarrollo del mesodermo y células de la cresta neural, así como en la determinación del eje dorso-ventral. Su inhibición provoca parcial dorsolización y falla en la diferenciación del mesodermo (Simpson, 1983; Thisse *et al* 1987).

En humano *TWIST-1* se localiza en el brazo corto del cromosoma 7, en la región citogenética 7p21.1, misma donde se han identificado las mutaciones del gen involucradas en el desarrollo del síndrome Saethre-Chotzen (SCS). SCS es una enfermedad autosómica dominante heredable que se caracteriza por el desarrollo de individuos con baja estatura, craneosinostosis, asimetría facial y retraso mental (Ghouzziet *al*, 2000).

Por otro lado, se ha descrito que *TWIST-1* participa en los mecanismos de la transición epitelio-mesénquima (TEM), importantes durante el desarrollo embrionario y la reparación de tejidos, permitiendo la migración de células epiteliales en contacto estrecho con la membrana basal de su lugar de origen, hacia sitios distantes, adquiriendo características del tumor primario (Kalluri y Weinberg, 2009).

3.1.2.2. *TWIST-1* y cáncer

Modelos experimentales *in vivo* han sido un éxito para identificar eventos moleculares durante la metástasis. No obstante estos no han sido abordados en etapas tempranas del proceso metastásico, ya que omiten el estudio de la expresión de genes involucrados en la invasión e intravasación al ser introducidas células tumorales directamente a nivel sistémico. Yang *et al* (2003), mediante un modelo murino *in vivo* empleando células de cáncer de mama (4T1), determinó el papel de *TWIST-1* durante el proceso de metástasis. En este modelo *TWIST-1* no era importante en el proceso de formación de tumores y/o proliferación,



mediante ensayos de inhibición *in vivo* de *TWIST-1*; no obstante al implantar células neoplásicas deficientes de *TWIST-1* se reducían drásticamente el número de nódulos metastásicos en pulmón. Por lo que se sugirió que *TWIST-1* participa durante la fase de intravasación, aumentando el número y tamaño de colonias en contraste de aquellas muestras con *TWIST-1* inhibido, ello mediante análisis de muestras de sangre de ratón.

Por último, los autores determinaron la participación de la TEM durante la progresión tumoral mediada por *TWIST-1*, observando cambios morfológicos similares a fibroblastos, cambios en la expresión de marcadores epiteliales (E-cadherina) por mesenquimales (N-vimentina); cuya pérdida de E-cadherina está asociada con despolarización de células epiteliales en lámina basal. De acuerdo a ello, mediante el empleo del modelo celular MDA-MB 231 se determinó la participación de *TWIST-1* en la activación de la invasión regulando la expresión de mir-10b, mismo que a su vez regula al *HOXD10*, el cual presenta funciones supresoras de tumor (Bourguignon *et al*, 2010).

Por otro lado, se ha propuesto que *TWIST-1* está involucrado en la resistencia a fármacos oncológicos, como Taxol y Vincristina, ello en líneas celulares de carcinomas nasofaríngeo (CNE2), vejiga (RT112), ovario (Ovca433) y próstata (PC3) (Wang, 2004). Por otra parte, la expresión de *TWIST-1* ha sido previamente asociada con la resistencia a cisplatino, mediante la regulación del gen *YB-1* en cáncer de próstata (PC3) y cáncer de mama (MCF-7) (Shiota *et al*, 2008).

Recientemente, se describió la participación de *TWIST-1* en la inhibición del receptor de estrógenos- α (*RE-\alpha*) en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-435 y 4T1), donde altos niveles de *TWIST-1*, permiten el reclutamiento del complejo remodelador de nucleosoma NuRD (nucleosome remodeling and deacetylase gene expression complex) en el intrón 7 de *RE-\alpha*, provocando la disminución de los niveles de acetilación de la histona 3, en el residuo de lisina 9 (H3K9), y aumento de los niveles de metilación de la histona 3 lisina 9 (H3K9). De igual manera se observó que líneas celulares (T47D y MCF-7), disminuyeron su fenotipo *RE-\alpha* positivas, durante la sobre-expresión de *TWIST-1*. Esta relación inversa de *TWIST-1* con el *RE-\alpha* pudo ser corroborada en carcinomas ductales invasivos. Lo anterior permitiría, explicar por qué algunos pacientes adquieren resistencia al tratamiento endocrino por tamoxifeno o raloxifeno (Fu *et al*, 2012).



Lo anterior resulta de gran importancia, ya que la inhibición del RE- α también ha sido reportada en el desarrollo de CaCu, permaneciendo desconocido el mecanismo involucrado, no obstante establecida la correlación entre la subunidad (EZH2) del complejo Polycomb, con pérdida de la expresión de RE- α (Zhai *et al* 2010). Al respecto, López *et al* 2013 han propuesto que la inhibición RE- α podría deberse a mecanismos pos-transcripcionales, al identificar al transcrito en carcinomas cervicales, en ausencia de la proteína. Sin embargo, se detectó la expresión de la proteína RE- β del cual poco se conoce sobre su participación en CaCu. A pesar de esto, se ha demostrado que la expresión de RE- α se mantiene en el estroma, como un requerimiento para el desarrollo de la neoplasia (Chung *et al*, 2013).

Respecto a la participación de ambos RE- α y β , existen reportes contradictorios en cuanto a los modelos y tejidos estudiados. Tal es el caso, de Chung *et al* (2008) donde en el modelo de ratones transgénicos (K14E7) identificó que la expresión de RE- α constituye un factor indispensable para el desarrollo de carcinomas cervicales tanto en ratón, como humano; en contraste de RE- β . Mientras que, Zhai *et al* (2010) al inhibir la expresión de RE- α en líneas celulares de cérvix, derivadas de neoplasia intraepitelial grado 1 (612), aumentan su capacidad invasora. Por lo que se ha propuesto, que la participación diferencial de RE- α en el desarrollo de ciertos carcinomas en humanos, mientras que para otros tumores el efecto de estrógenos estaría dado por RE- β .

Reportes previos sobre *TWIST-1* en CaCu asocian la expresión de la proteína con pobre pronóstico (sobrevida a 5 años) en carcinomas de células escamosas en etapas I-IIA y IIB-V, (Shibata *et al*, 2008). En la línea celular de cérvix como HeLa, así como en carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas, se estableció a *TWIST-1* como un posible regulador del gen *MDR-1P/gp*, el cual está involucrado en la resistencia a cisplatino (Zhu *et al*, 2011). Por otra parte, en la misma línea celular HeLa, se asoció la expresión de *TWIST-1* con la presencia de características tipo *stem* como CD44^{alto} y CD24^{bajo} mediante la activación de β -catenina y Akt (Li y Zhou, 2011). Por lo que, aún permanece por identificar blancos génicos regulados por *TWIST-1*, favoreciendo la progresión de CaCu, siendo uno de ellos RE- α en aquellos carcinomas cervicales donde dicho receptor se encuentra inhibida su expresión.



3.1.2.3. *HOXD10*

HOXD10 pertenece a la familia de factores de transcripción, reguladores maestros del desarrollo embrionario, morfogénesis y diferenciación celular. Identificados inicialmente en *Drosophila melanogaster* a partir de dos mutaciones: antennapedia, reemplazo en el desarrollo antenas por patas, así como la mutación bithorax, desarrollo extra de un par de alas que reemplaza halterios localizados normalmente en el tercer segmento del tórax. Se encuentran conservados evolutivamente presentando una región consenso de 60 aminoácidos llamado homeodominio. En humano, los genes HOX se encuentran agrupados en 4 clusters (A, B, C, y D), localizado cada uno en cromosomas diferentes (7p15.3, 17q21.3, 12q13.3 y 2q31, respectivamente). Cada clúster contiene de 9 a 11 genes alineados secuencialmente en 13 grupos parálogos. Durante el desarrollo embrionario la expresión de los genes HOX, ocurre espacio-temporalmente en una dirección 3' a 5' (Abate-Shen, 2002; Lappin *et al*, 2006). Mientras que, aberraciones en los perfiles de expresión espacio temporal, ocurre en eventos neoplásicos.

3.1.2.4 *HOXD10* y cáncer

Previamente se ha descrito que *HOXD10* participa en vías de señalización relacionadas con invasión descrita en modelos celulares de cáncer de mama, participando como regulador del fenotipo invasor en células CD44/ácido hialurónico positivas, capaces de inhibir Rho-GTPasas, RHO-cinasas y moléculas asociadas con la organización del citoesqueleto (Bourguignon *et al*, 2010).

La pérdida progresiva de la expresión de *HOXD10*, a lo largo de tejidos endometriales normales hacia carcinomas endometriales grado 1-3, ha sido asociada con el desarrollo de este tipo de cáncer considerándose a *HOXD10* como gen supresor de tumor (Osborne *et al*, 1998). Así mismo, ha sido reportada la inhibición de la angiogénesis por parte de *HOXD10* y la diseminación neoplásica, manteniendo a células endoteliales en estado diferenciado y quiescente (Carrio *et al*, 2002). Carrio *et al* (2005) también identificó que la sobre-expresión de *HOXD10* revertía el fenotipo invasor de modelos celulares, tales como MDA-MB-231 y HeLa. Así mismo, identificó la expresión del ARN en tejidos histológicamente normales de mama y endometrio, observando su disminución en etapas avanzadas de la carcinogénesis en ambos tejidos con lo que se confirmaba su función manteniendo un estado diferenciado en las células así como en los capilares presentes previamente descrito por este mismo grupo. Al respecto, en cáncer gástrico ha sido considerado como gen supresor de tumores,



cuya inhibición en cáncer y sus respectivas lesiones precancerosas, está asociada con hipermetilación de secuencias promotoras, siendo considerado como factor de pobre pronóstico (Wang *et al*, 2012).

Previamente en modelos celulares de cáncer de mama, se ha descrito que *HOXD10* participa en vías de señalización relacionadas con invasión participando como regulador del fenotipo invasor en células CD44/ácido hialurónico positivas, capaces de inhibir Rho-GTPasas, RHO-cinasas y moléculas asociadas con la organización del citoesqueleto (Bourguignon *et al*, 2010).

Así mismo, identifiqué la expresión del ARN en tejidos histológicamente normales de mama y endometrio, observando su disminución en etapas avanzadas de la carcinogénesis en ambos tejidos con lo que se propone su función en el mantenimiento de un estado diferenciado en las células, así como en los capilares.. Al respecto, en cáncer gástrico ha sido considerado como gen supresor de tumores, cuya inhibición en cáncer y sus respectivas lesiones precancerosas, esta asociada con hipermetilación de secuencias promotoras, siendo considerado como factor de pobre pronóstico en pacientes (Wang *et al*, 2010, 2012).

En contraste, en muestras cervicales normales y carcinomas de células escamosas de CaCu, el análisis de expresión de genes HOX, Abd-b identificó la expresión del transcrito *HOXD10*, *B13*, *C9*, *C11*, *C12*, *C13* y *D9*, al no encontrarse en muestras libres de neoplasia se asoció la presencia de dichos transcritos con el desarrollo de carcinomas en cérvix (López *et al*, 2006). Siendo este reporte, el único hasta el momento que describe la expresión de *HOXD10* en CaCu, permaneciendo por confirmarse la presencia de expresión de proteína, ya que se ha reportado, eventos de regulación epigenética y/o post-transcripcional, como la expresión de ARN-no-codificantes (*ncRNA*, non-coding RNA) se encuentren involucrados

3.1.2.5. ARN-no codificante

Aproximadamente el 70% del genoma es transcrito del cual solo el 2% codifica para proteína, mientras que el restante consiste en ARN no-codificante (*ARNnc*). Dependiendo del tamaño son clasificados como ARN's pequeños (<200 nucleótidos) donde se encuentran los mirRNAs (micro RNAs), siRNAs (small interfering RNA) y los piRNAs (PIWI-interacting RNAs). El otro grupo en el que se clasifican los ARNnc son los ARNs largos (>200 nucleótidos) o lncRNA (por sus siglas en ingles long non-coding RNA, ARNlnc) los cuales han adquirido



importancia en procesos como la carcinogénesis (Gutschner y Diederichs, 2012), entre ellos el HOTAIR.

3.1.2.6. *HOTAIR* y cáncer

El estudio de los ARNInc, asociados a cáncer ha permitido destacar la expresión de HOTAIR (HOX Antisense Intergenic RNA descrito inicialmente como ARN de 2.2 kb, que se transcribe como secuencia antisentido en el clúster HOXC y tiene su función en *trans* mediante la interacción y reclutamiento del complejo Polycomb 2 (PRC2) a través de la subunidad SUZ12, encargado del remodelamiento de la cromatina, y capaz regular la expresión de los genes *HOX* durante el desarrollo embrionario (Gieni y Hendzel, 2009). Al respecto se ha descrito que dicho reclutamiento es capaz de silenciar al clúster HOXD, mediante la capacidad enzimática de generar marcas de trimetilación sobre la histona 3, el residuo de la lisina 27 (H3K27me3) (Rinn *et al*, 2007). Este mismo comportamiento ha sido reportado en tumores metastásicos, al incrementar la expresión de HOTAIR en estos tumores comparando su expresión con tumores primarios de mama, mediante el reclutamiento del complejo PRC2 a partir de su subunidad SUZ12, silenciando a *HOXD10* al igual que otros genes implicados en la progresión del cáncer como *PGR*, *PCDH* y *JAM2*. Por lo tanto, la expresión de *HOTAIR* es considerada como factor determinante en el desarrollo de metástasis, y factor de pobre sobrevida. Así mismo la expresión de *HOTAIR* en el modelo celular MDA-MB-231, confiere mayor capacidad de invasión (Gupta *et al*, 2010). Sin embargo, a la fecha no existen reportes que indiquen la participación de HOTAIR, asociado con la expresión de *HOXD10* en CaCU.



4. *Justificación*

La infección por VPH es el principal factor etiológico asociado al desarrollo de CaCu aunque no es un suficiente para el desarrollo de esta neoplasia, No todas las lesiones precursoras evolucionan a cáncer, y los tumores primarios aunque pueden clasificarse histológica y clínicamente como entidades similares, no evolucionan de la misma manera, lo cual pone en evidencia la heterogeneidad biológica de estas lesiones, tales como diferencias en la capacidad de invasión y metástasis. Al respecto, se ha identificado la contribución de genes tales como HOXD10 y TWIST-1, los cuales también participan en el desarrollo embrionario. Aunque se ha detectado expresión en algunos tejidos adultos sin alteraciones neoplásicas, a la fecha se desconoce su función.

En estudios independientes, en CaCu se ha identificado, la expresión de HOXD10 y TWIST-1, éste último involucrado en mal pronóstico; sin embargo, se desconoce el perfil de expresión de estos genes, desde el epitelio normal hasta CaCu. Por otra parte, se ha propuesto a HOXD10 asociado a funciones supresoras de tumor en carcinomas gástricos, endometriales y de mama. En particular, en cáncer de mama se ha propuesto un modelo de invasión que involucra la pérdida de expresión de HOXD10 debido a mecanismos de regulación transcripcionales y post-transcripcionales mediados por los ARNnc HOTAIR y mir-10b respectivamente, este último regulado por TWIST-1.

Sin embargo, a la fecha no hay reportes sobre la expresión de la proteína de HOXD10 en cérvix y no se ha evaluado de manera simultánea la expresión de TWIST-1 y HOTAIR, involucrados en su regulación. Por lo que en el presente trabajo se evaluó en epitelios cervicales sin alteraciones neoplásicas, lesiones precursoras y CaCu, la expresión de los transcritos y proteínas TWIST-1 y HOXD10, así como HOTAIR.



5. *Objetivos*

5.1. **Objetivo general**

Analizar la expresión de genes TWIST-1, HOXD10 y HOTAIR asociados a la invasión y metástasis en el desarrollo del Cáncer Cervico-uterino (CaCu).

5.2. **Objetivos particulares**

- Identificar en epitelio cervical normal y CaCu, la expresión de los genes *TWIST-1*, *HOTAIR* y *HOXD10* mediante RT-PCR para establecer si hay diferencias en los niveles de expresión de los tres genes.
- Identificar en epitelio cervical normal, lesiones precursoras y CaCu las proteínas TWIST-1, HOXD10 y RE- α ; así como determinar si hay alguna relación entre los niveles de expresión de las proteínas con la progresión en las etapas de desarrollo de CaCu.
- Determinar si la expresión de los genes analizados en la progresión de CaCu es compatible con el modelo de invasión y metástasis descrito en cáncer de mama



6. Estrategia Experimental

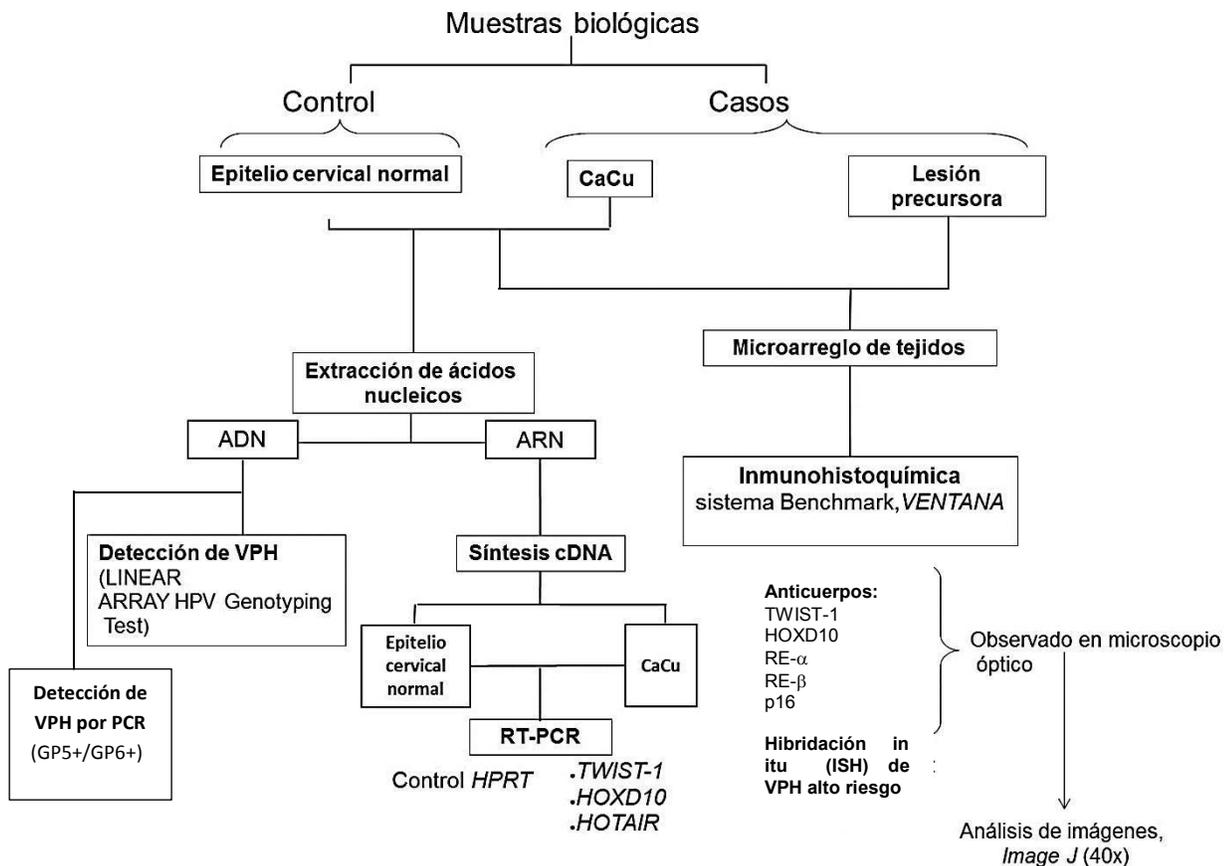


Figura 12. Estrategia experimental.

6.1. Selección de muestras biológicas

Se seleccionaron biopsias de tejidos epiteliales cervicales humanos fijados en formal y embebidos en parafina, de los archivos de patología en base al reporte histopatológico. El grupo control se estableció a partir de tejidos con diagnóstico histopatológico de epitelio cervical sin alteraciones neoplásicas. El grupo de casos incluyó a tejidos con diagnóstico histopatológico de lesión precursora y CaCu. De ambos grupos se revisaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina (H&E), seleccionando únicamente aquellas muestras con epitelio suficiente y con la menor proporción de estroma en relación al epitelio. Del total de muestras revisadas se seleccionaron 10 muestras de epitelio cervical normal, 24 con diagnóstico histopatológico de lesión precursora y 22 de CaCu.



También se utilizaron dos tipos de líneas celulares: cérvix (HeLa, MS751, Inbl, C33, Caski y SiHa) y mama (T47D y MCF7). Todas las líneas celulares se fijaron con 1ml de ThinPrep® Preserv Cyt y se mantuvieron a 4°C.

6.2. Procesamiento de muestras para extracción de ácidos nucleicos

A los bloques de parafina de tejidos del grupo control y casos, se les realizaron cortes en un microtomo (*Leica*). Los primeros cortes realizados a cada bloque (aproximadamente 3 de 5µm cada uno) se eliminaron con la finalidad de reducir la contaminación. Para delimitar que en el grupo control sólo se analizaron células epiteliales, las cuales se extrajo mediante sacabocados el área de interés con una aguja de 0.6mm (4 sacabocados por muestra) y para los casos de CaCu se realizaron 6 cortes de 10µm, los cuales fueron depositados al igual que los sacabocados en tubos eppendorf de 1.5ml para la extracción de ácidos nucleicos.

Se determinó que para las muestras con lesiones precursoras no se haría la extracción de ácidos nucleicos debido a limitaciones por el tamaño de la lesión, por lo que sólo se utilizaron para análisis de proteínas en un microarreglo de tejidos.

6.3. Extracción de ácidos nucleicos

Del grupo control se extrajo ARN de 10 muestras con epitelio cervical normal utilizando el kit kit RNeasy FFPE (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante (<http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/RNA-Sample-Technologies/Total-RNA/RNeasy-FFPE-Kit#resources>.) Del grupo de casos únicamente se extrajo ARN de 22 muestras y DNA de 13 muestras de CaCu utilizando el kit AllPrep DNA-RNeasy FFPE (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante (<http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/RNA-Sample-Technologies/DNA-RNA-Protein/AllPrep-DNARNA-FFPE-Kit#resources>).

6.4. Síntesis de cDNA

Se seleccionaron muestras con al menos 100ng/µl de ARN (pureza 260/280: 1.7-2.0, cuantificadas en espectrofotómetro (Microplate spectrophotometer, *EPOCH*)). Las muestras seleccionadas fueron: 10 epitelios cervicales normales y 22 CaCu, a los cuales se les realizó la síntesis utilizando el kit High Capacity RNA-to-cDNA (*AppliedBiosystems*) a partir de 1µg



de ARN de cada muestra. ARN y cDNA de las muestras fueron almacenados a -20°C para posteriores análisis.

6.5. PCR- tiempo real (RT-PCR)

El análisis de la expresión de los transcritos se realizó mediante sondas de hidrólisis (Universal Probe Library set Human, ROCHE) y con el sistema Light Cycler® 480 Probe Master Mix (ROCHE) en el termociclador Light Cycler® 480 II (ROCHE). Se usó como gen endógeno *HPRT* (SENTIDO-CCTGGCGTCGTGATTAGTG/ ANTISENTIDO-TGAGGAATAAACACCCTTTCCA, sonda 73). La reacción de RT-PCR se realizó y con diluciones 1:10 del cDNA sintetizado de los controles (5 muestras con epitelio normal y 5 muestras con epitelio normal adyacente) y 22 casos (CaCu) para un volumen final por reacción de 10 μl . Las muestras se analizaron por triplicado con el gen endógeno. Todas las muestras fueron cargadas en una placa de 96 pozos (Light Cycler® 480 Multiwellplate 96) y siguiendo el siguiente protocolo para RT-PCR: Pre-incubación (1 ciclo) 95°C (10'), Amplificación (45 ciclos) 95°C (10"), 60°C (30") y 72°C (1"), y Enfriamiento(1 ciclo) 40°C (30). Se descartaron las muestras donde no se detectó amplificación del gen endógeno. Las muestras positivas fueron analizadas para identificar los genes de interés, mediante sondas de hidrólisis: para *TWIST-1* (SENTIDO-AGCTACGCCTTCTCGGTCT/ ANTISENTIDO-CCTTCTCTGGAAACAATGACATC, sonda 6); *HOXD10* (SENTIDO-CTGAGGTCTCCGTGTCCAGT/ ANTISENTIDO-GCTGGTTGGTGTATCAGACTTG, sonda 2) y *HOTAIR* (SENTIDO-CAGTGGGGAACCTCTGACTCG/ ANTISENTIDO-GTGCCTGGTGTCTCTTACC, sonda 50). La información obtenida fue analizada utilizando el programa Light Cycler® gene scanning software (ROCHE).

6.6. Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica

Para evaluar la expresión de las proteínas *TWIST-1*, *HOXD10*, *ER- α* , *ER- β* y *CD44* en todos los epitelios de interés se realizó un microarreglo de tejidos elaborado con un microarreglador (ADVANCE TISSUE ARRAYER, CHEMICON), los epitelios tomados provenían de tejidos cervicales humanos embebidos en parafina. Cada uno de ellos se tomó con una aguja de 1 mm (donador) y con otra aguja de 1mm (recipiente) se realizaron los orificios en el bloque de parafina destinado para el microarreglo donde se depositó el epitelio extraído. En total se colocaron 63 epitelios (spots) correspondiendo únicamente al grupo control (epitelio cervical normal) 26 spots. Para el grupo de casos se colocaron 37 spots tomados: 23 spots de lesiones precursoras y 14 spots de CaCu.



Para realizar la reacción de inmunohistoquímica de cada proteína se utilizó un corte de 4 μm del bloque de parafina que contenía el microarreglo, se realizó en el sistema automatizado Benchmark Autostainer (*Ventana Medical Systems Inc*). Para cada reacción de inmunohistoquímica se realizó la estandarización de la concentración de anticuerpo así como el tiempo de incubación (para todos los anticuerpos fue de 30 minutos)

Los anticuerpos y diluciones óptimas utilizadas fueron anti-HOXD10 policlonal 1:150 (*ABCAM*), anti-TWIST-1 monoclonal 1:150 (*Santa Cruz*), anti-receptor de estrógenos- α monoclonal (*Ventana Medical Systems Inc*) y anti-receptor de estrógenos- β (*Gene Tec 1:150*).

Para analizar la expresión de las proteínas en todas las líneas celulares se realizaron arreglos en laminillas con las líneas celulares de cérvix y de mama. Primero a una alícuota (200 μl) de cada línea celular (cérvix y mama) se le retiró la solución fijadora (ThinPrep® Preserv Cyt), agregándole en un tubo eppendor (1.5 ml) 500 μl de PBS y tritón al 0.01%, centrifugando a 7000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante del tubo y se volvió a agregar PBS y tritón al 0.1%, se centrifugó a 7000 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Al final se homogenizó la muestra en vórtex, se tomaron 10 μl de cada alícuota y se colocó en una laminilla electrocargada. El mismo procedimiento se realizó para cada línea celular obteniendo al final un arreglo en una laminilla de las líneas celulares de cérvix (HeLa, MS751, C33, Caski y SiHa) y con líneas celulares de cáncer de mama (T47D y MCF7).

6.7. Análisis de imágenes

Se evaluó la presencia o ausencia de las proteínas así como la intensidad de la reacción (alta, moderada y baja). Posteriormente se capturaron las imágenes de los spots a un aumento de 400x por medio de un microscopio óptico (DM750, *LEICA*) para evaluar el porcentaje de expresión nuclear de las proteínas con el programa *Image J* (Image Processing and Analysis in Java) utilizando el plugin *Immunoratio* © 2010-2011 (Isola J y Tuominen (Institute of Biomedical Technology, University of Tampere)).



6.8. Detección de VPH

Debido a las características en cuanto a cantidad y calidad de las muestras seleccionadas, se realizaron diferentes métodos para la detección de VPH, tales como PCR, *hibridación in situ* reversa, *hibridación in situ*, así como por el marcador subrogado p16.

6.8.1. Hibridación in situ de VPH's de alto riesgo (ISH) y expresión de la proteína p16

A partir del microarreglo previamente elaborado se realizó la detección de VPH por medio de dos métodos el primero a partir de hibridación *in situ* (ISH) utilizando la sonda Inform HPV III Family 16 Probe (B)(*Ventana Medical Systems Inc*), la cual es un coctel de sondas que detecta los tipos virales asociados con cáncer cervical: 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 66. Se realizó la estandarización del tiempo de incubación de la proteasa a 14 min, 16min y 18min, siendo esta última la utilizada para el análisis en epitelios de acuerdo a la guía de "Interpretation Guide for Ventana INFORM HPV Probes *In Situ* Hybridization (ISH) Staining of Cervica Tissue" la cual puede ser consultada en la siguiente dirección http://www.uclad.com/newsletters/HPV_ISH_Tissue-Probe-Interpretation_Guide.pdf

El segundo método utilizado fue la detección de la proteína p16 mediante inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo p16 (p16 (INK4) ready-to-use, *BioGenex*). Para realizar la reacción de inmunohistoquímica de p16 así como ISH se utilizó un corte de 4µm del bloque de parafina que contenía el microarreglo. La reacción de inmunohistoquímica y ISH se llevaron a cabo mediante el sistema de Benchmark Autostainer(*Ventana Medical Systems Inc*). Los resultados fueron evaluados en el microscopia Leica a 400x, según las guías.

6.8.2. Detección de VPH por medio de PCR punto final

Primers GP5+/GP6+

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl la cual contenía Dream Taq Buffer 1x (*Fermentas*), MgCL₂ 3mM, mix dNTPs .2mM, 1 unidad de Dream Taq DNA polymerase (*Fermentas*), primers GP5+ (TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC) 1µM y GP6+ (GAAATAAACTGTAAATCATATTC) 1µM. Las condiciones de ciclado fueron 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40 seg, alineamiento a 40°C por 1 min y elongación a 72°C por 40 seg. El primer ciclo estuvo precedido por 10 min de desnaturalización a 94°C y el último



ciclo fue una elongación final por 4 min a 72°C. Las condiciones fueron programadas en el termociclador C1000™ Thermal Cycler (BIO-RAD).

PCR múltiple

Se realizó la amplificación de fragmentos de 200pb y 400pb del gen endógeno GAPDH para evaluar la calidad del ADN a partir de muestras de tejidos embebidos en parafina (van Beers *et al*, 2006). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20µl la cual contenía Dream Taq Buffer1x (Fermentas), MgCl₂ 3mM, mix dNTPs 0.2mM, 1 unidad de Dream Taq DNA polymerase (Fermentas), primers 200pb (SENTIDO-AGGTGGAGCGAGGCTAGC/ ANTISENTIDO-TTTTGC GGTGGAAATGTCCT) 133□33TGCGGTGGAA400pb (SENTIDO-ACAGTCCATGCCATCACTGC/ ANTISENTIDO- GCTTGACAAAGTGGTTCGTTG) .0675□00pLas condiciones de ciclado fueron 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40 seg, alineamiento a 56°C por 50 seg y elongación a 72°C por 50 seg. El primer ciclo estuvo precedido por 5 min de desnaturalización a 94°C. El último ciclo fue una elongación final por 5 min a 72°C. Las condiciones fueron programadas en el termociclador C1000™ Thermal Cycler (BIO-RAD).

6.8.3. Genotipificación de muestras por medio de Linear Array®

Para la tipificación de VPH en muestras de CaCu se seleccionaron aquellas con al menos 100ng/µl de ADN(pureza 260/280: 1.7-2.0, cuantificación realizada en espectrofotómetro EPOCH) y se utilizó el kit LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test (ROCHE), el cual identifica 37 distintos tipos virales incluyendo todos los de alto riesgo oncogénico.

Todos los datos fueron manejados en el paquete estadístico PASW Statistics 18 (SPSS Statistics) los resultados obtenidos tanto de la expresión de los 3 genes como de la expresión nuclear se analizaron mediante ANOVA (Análisis de varianza) de 1 factor con un grado de significancia de p<0.05.



7. Resultados

7.1 Expresión de los genes *TWIST-1*, *HOXD10* y *HOTAIR*

Se analizó la expresión de expresión de *TWIST-1*, *HOXD10* y *HOTAIR* relativa al gen endógeno *HPRT* en epitelios cervicales normales (grupo control) y CaCu (casos), cuyos resultados de, se muestran en la figura 13.

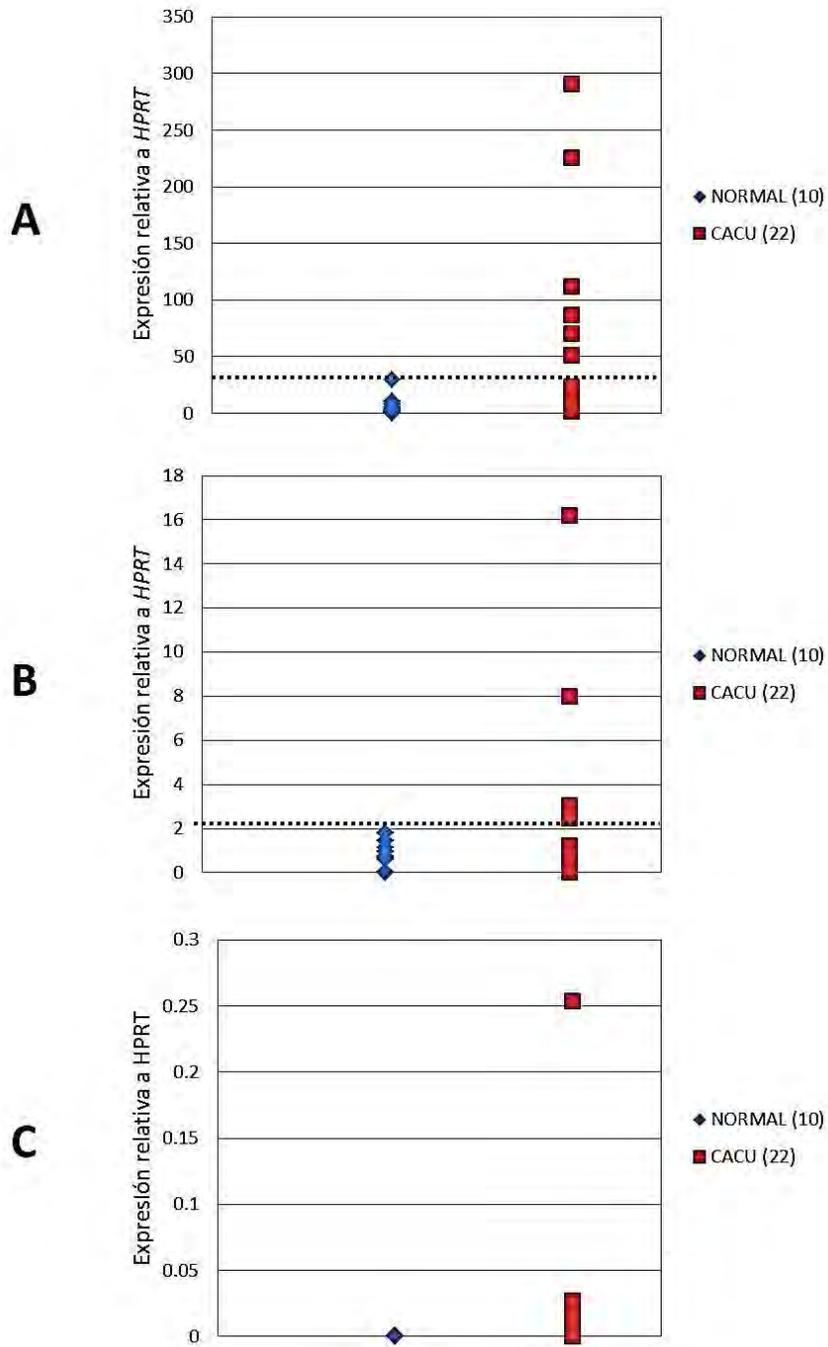




Figura 13. Expresión de los genes *TWIST-1* (A), *HOXD10* (B) y *HOTAIR* (C) en muestras de epitelio cervical normal y CaCu. Aquellas muestras de CaCu por encima de la línea punteada sobre expresaron el gen con respecto a muestras de epitelio cervical normal. *TWIST-1* ($p=0.1067$) *HOXD10* ($p=0.3797$) y *HOTAIR* ($p=0.4025$) mediante prueba de ANOVA.

De las muestras analizadas el 100% del grupo control (10/10) y de CaCu (22/22) expresaron *TWIST-1*. El 70% (7/10) de las muestras control expresó *HOXD10*, mientras que 86.36% (19/22) de las muestras en CaCu. Por último, ninguna muestra control expresó el gen *HOTAIR*, en contraste del 22.72% (5/22) de las muestras en CaCu (Tabla 1), no obstante no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y casos de CaCu mediante análisis de varianza (Figura 13).

Tabla 1. Porcentaje y frecuencia de muestras del grupo control y casos que expresaron los genes *TWIST-1*, *HOXD10* y *HOTAIR*.

Genes analizados por RT-PCR	Epitelio cervical normal % (n=10)	CaCu % (n=22)
<i>TWIST-1</i>	100%	100%
<i>HOXD10</i>	70%	86.36%
<i>HOTAIR</i>	0%	22.72%

Posteriormente se determinó el número de muestras de CaCu que sobre-expresó cada gen tomando como punto de corte el valor más alto obtenido en el grupo control. De las muestras de CaCu el 22.27% (6/22) sobre-expresó *TWIST-1* (Figura 13, A), el 22.72% (5/22) de las muestras sobre-expresó *HOXD10* (Figura 13, B) y 22.72% (5/22) de las muestras de CaCu sobre-expresaron *HOTAIR* (Figura 13, C).

7.2 Expresión de las proteínas

Se realizó la construcción de microarreglos de tejidos con la finalidad de analizar la expresión de proteínas mediante ensayos de inmunohistoquímica en tejidos cervicales con diferente diagnóstico histopatológico, entre ellos epitelio cervical normal (grupo control), lesiones precursoras y casos de CaCu (Figura 14).

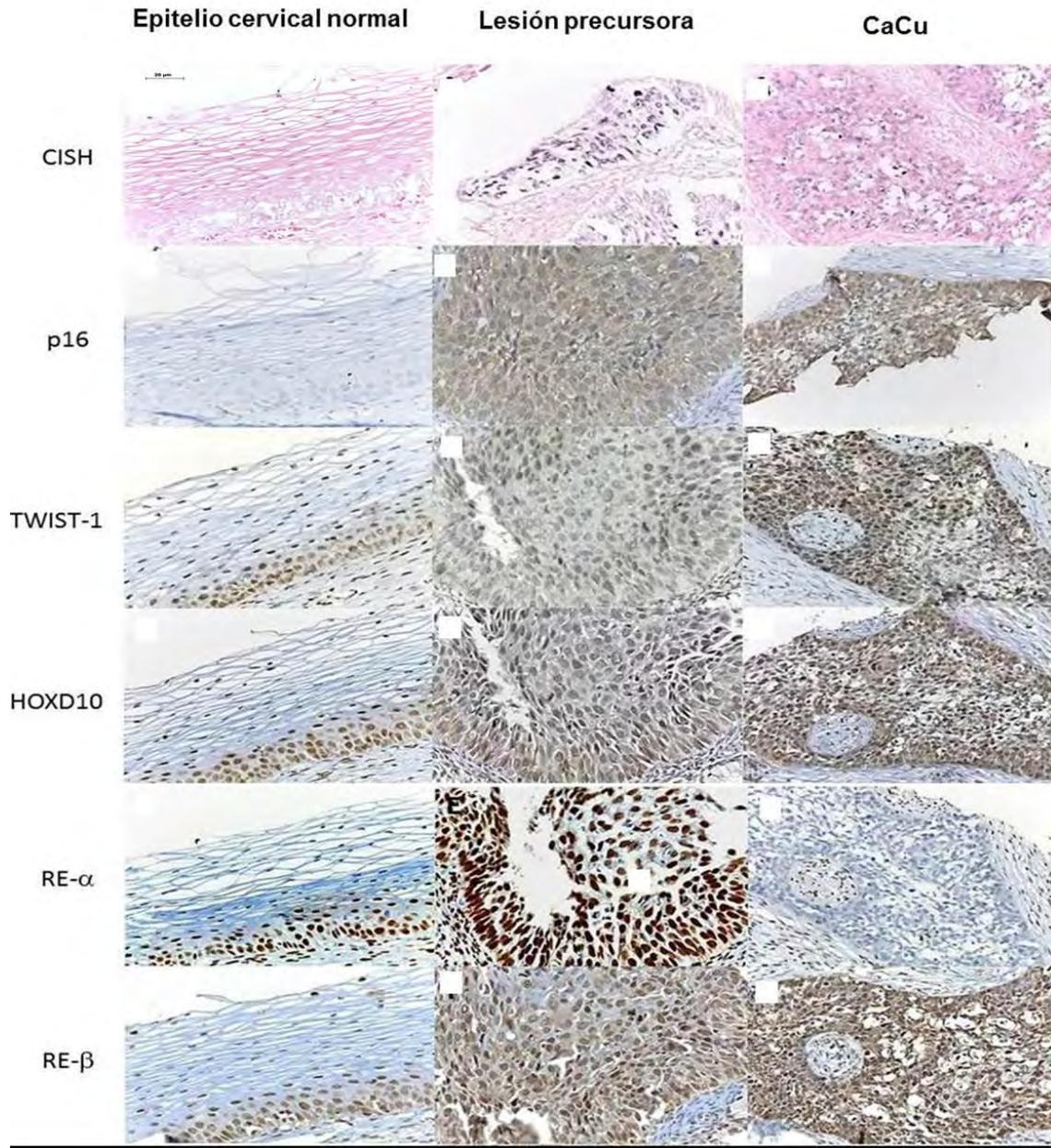


Figura 14. Hibridación in situ (ISH) de VPH de alto e Inmunohistoquímica de las proteínas p16, TWIST-1, HOXD10, RE- α y RE- β en epitelio cervical normal, lesión precursora y CaCu. RE (Receptor de estrógenos). Las imágenes fueron capturadas con aumento total de 400x.



7.2.1. Análisis cualitativo de la expresión de las proteínas

Inicialmente se evaluó de manera cualitativa la intensidad de la expresión de las proteínas (negativo, baja, moderada y alta) TWIST-1, HOXD10, RE- α y RE- β en los spots del grupo control (epitelio cervical normal) y casos (lesión precursora y CaCu) como se muestra en las figuras 15–18.

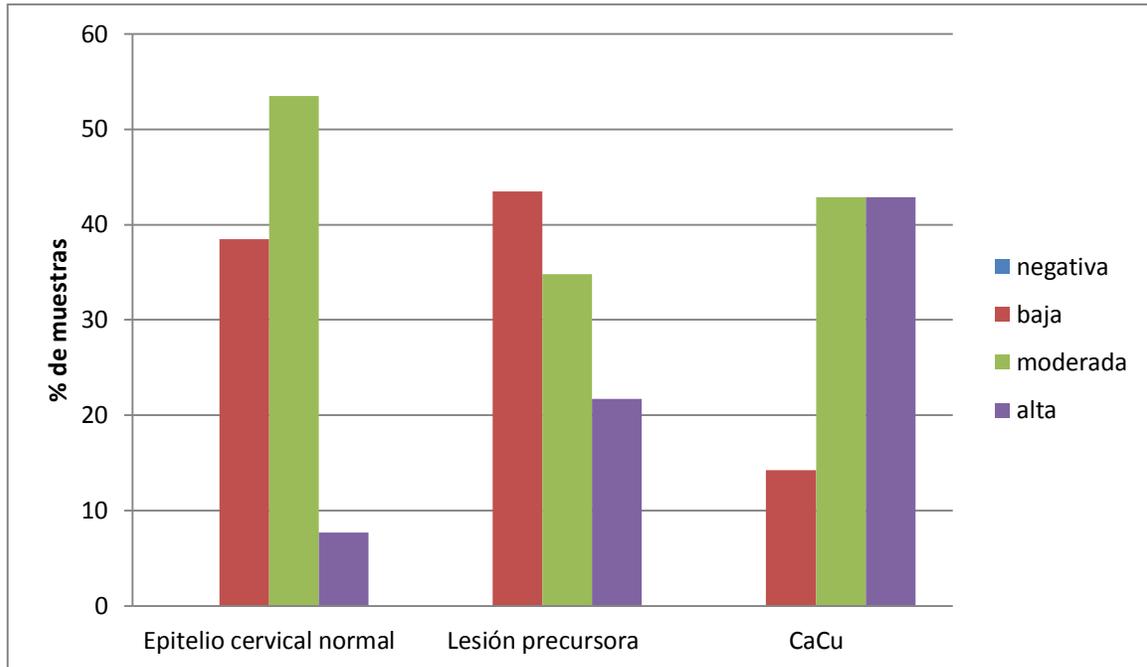


Figura 15. Análisis cualitativo de la expresión de la proteína TWIST-1 en el grupo control y casos, basado en la intensidad de reacción .

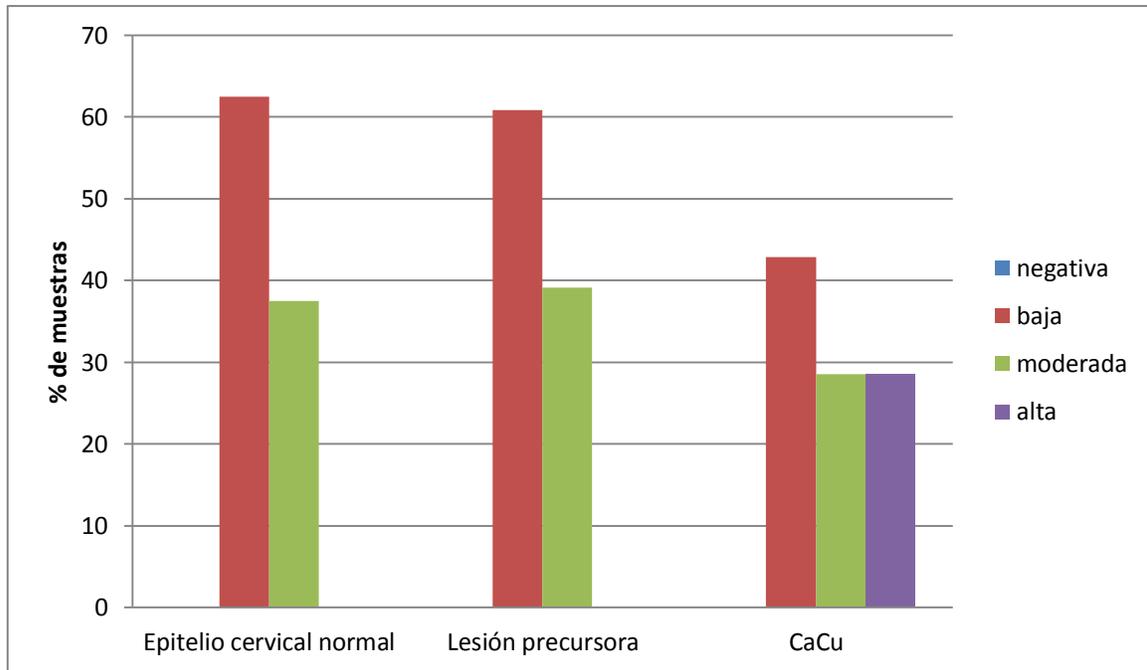


Figura 16. Análisis cualitativo de la expresión de la proteína HOXD10 en el grupo control y casos, basado en la intensidad de reacción.

A partir de diferencias encontrados en trabajos previos sobre la participación de los receptores de estrógenos α y β en CaCu se consideró también evaluar la expresión de la proteína de ambos receptores en los spots del grupo control y casos (Figura 17 y 18).

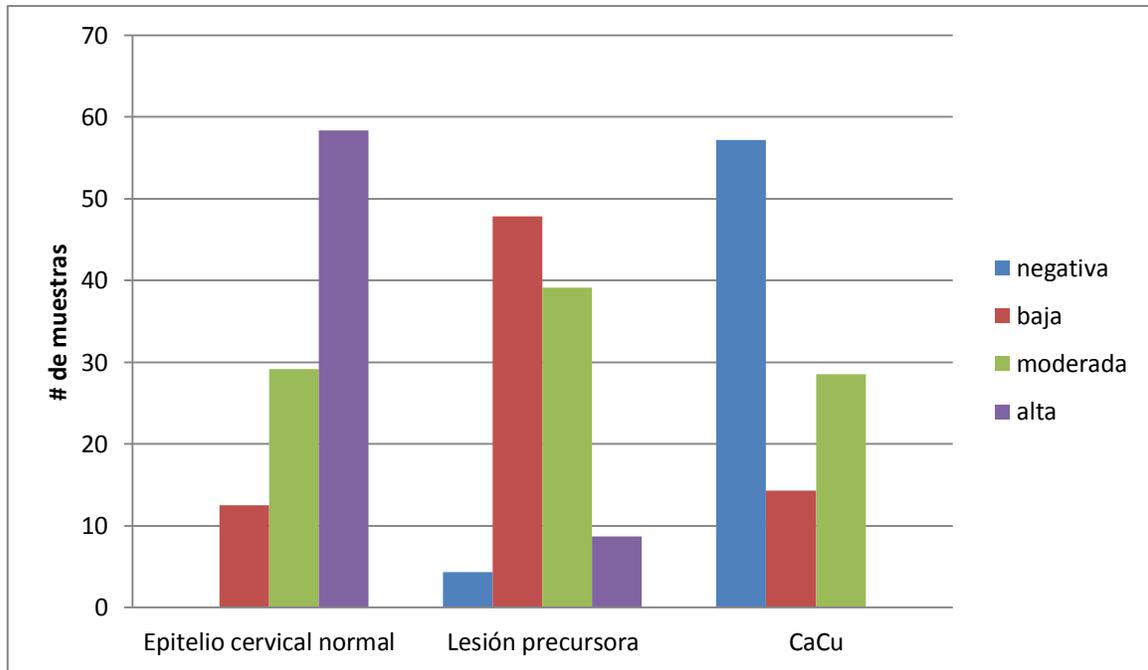


Figura 17. Análisis cualitativo de la expresión de la proteína RE- α en el grupo control y casos.

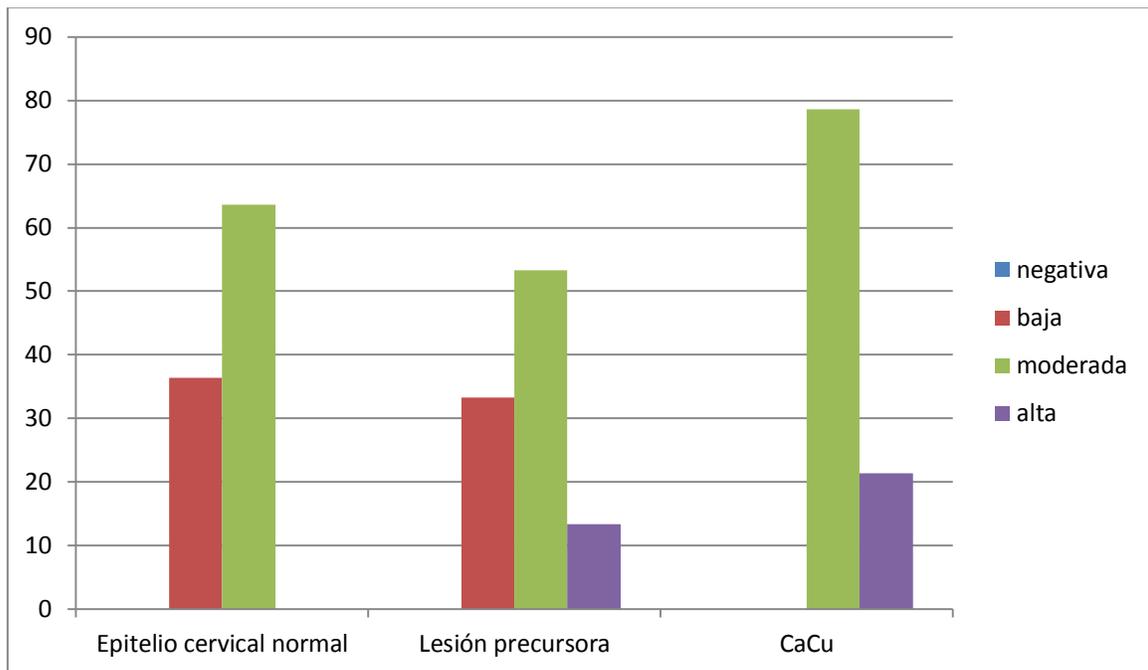


Figura 18. Análisis cualitativo de la expresión de la proteína RE- β en el grupo control y casos.



En la tabla 2 se muestra el porcentaje y frecuencia de muestras del grupo control y casos de acuerdo a la intensidad de las proteínas analizadas.

Tabla 2. Porcentaje y frecuencia de las muestras a partir de la intensidad de las proteínas analizadas.

Proteína	Intensidad de la proteína	Epitelio cervical normal % (n)	Lesión precursora % (n)	CaCu % (n)
TWIST-1	baja	38.46% (10/26)	43.47% (10/23)	14.28% (2/14)
	moderada	53.84% (14/26)	34.78% (8/23)	42.85% (6/14)
	alta	7.69% (2/26)	21.73% (5/23)	42.86% (6/14)
HOXD10	baja	62.5% (15/24)	60.86% (14/23)	42.85% (6/14)
	moderada	37.5% (9/24)	39.13% (9/23)	28.57% (4/14)
	alta	0%	0%	28.57% (4/14)
RE- α	baja	12.5% (3/24)	50% (11/22)	33.33% (2/6)
	moderada	29.16% (7/24)	40.90% (9/22)	66.66% (4/6)
	alta	58.33% (14/24)	9.09% (2/22)	0%
RE- β	baja	36.36% (8/22)	33.33% (5/15)	0%
	moderada	63.63% (14/22)	53.33% (8/15)	78.57% (11/14)
	alta	0%	13.33% (2/15)	21.42% (3/14)



7.2.2. Análisis de imágenes

Se identificó una tendencia respecto al incremento de expresión de las proteínas TWIST-1, HOXD10 y un decremento de RE- α en la progresión del CaCu, por lo que se decidió realizar un análisis cuantitativo de la expresión de las proteínas TWIST-1, HOXD10, RE- α y RE- β . Dicho análisis se realizó a partir del porcentaje de expresión nuclear en los diferentes epitelios mediante el programa para análisis de imágenes *ImageJ* con el plugin *ImmunoRatio* a partir de la fotografía capturada previamente de cada spot en el microarreglo (figura 19-22).

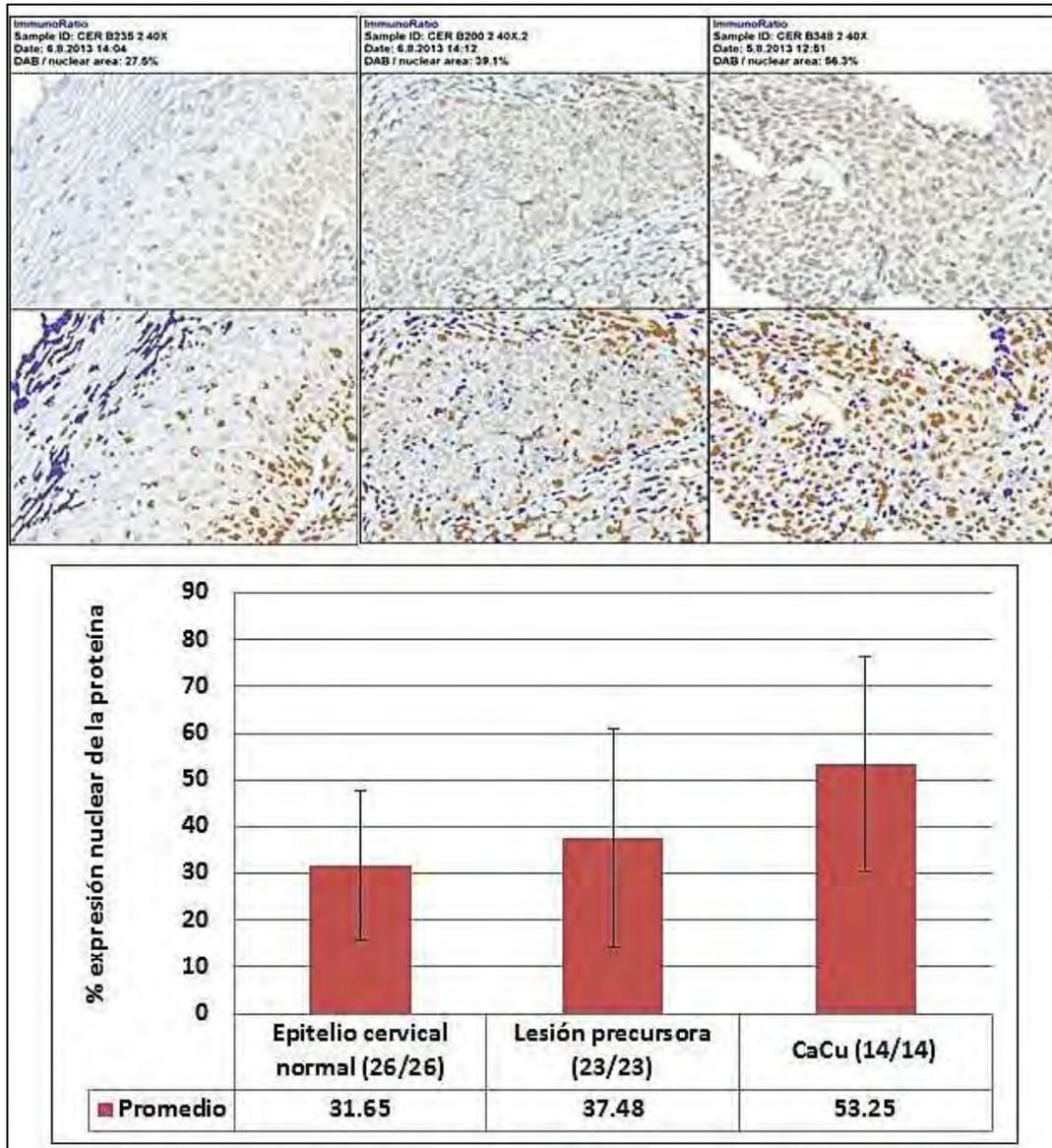


Figura 19. Análisis del porcentaje de expresión nuclear mediante *Image J* y promedio del porcentaje de expresión de la proteína TWIST-1 en el grupo control y casos. (ANOVA $p= 0.0089$)

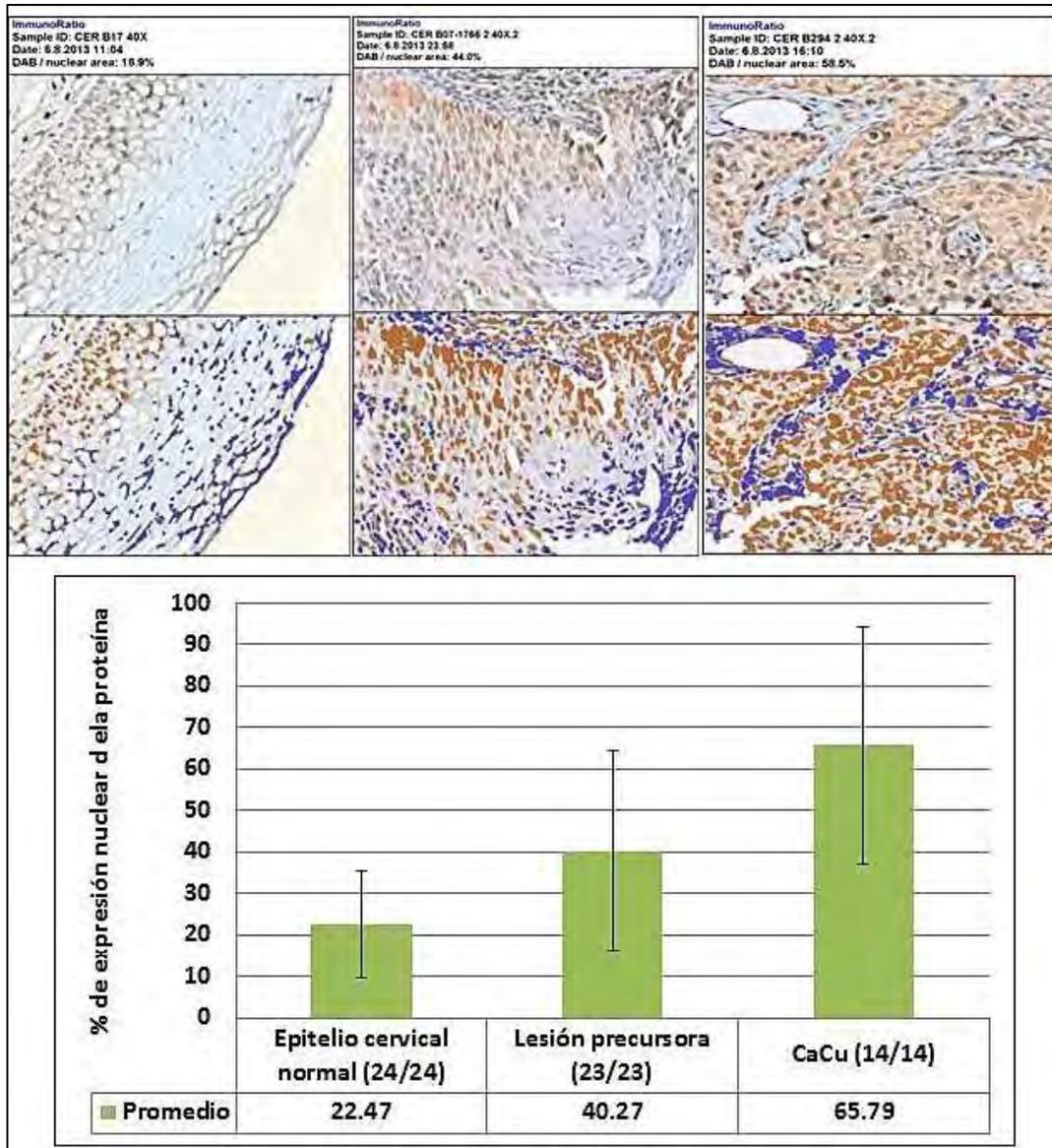


Figura 20. Análisis del porcentaje de expresión nuclear mediante *Image J* y promedio del porcentaje de expresión de la proteína HOXD10 en el grupo control y casos. (ANOVA $p= 0.00000093$).

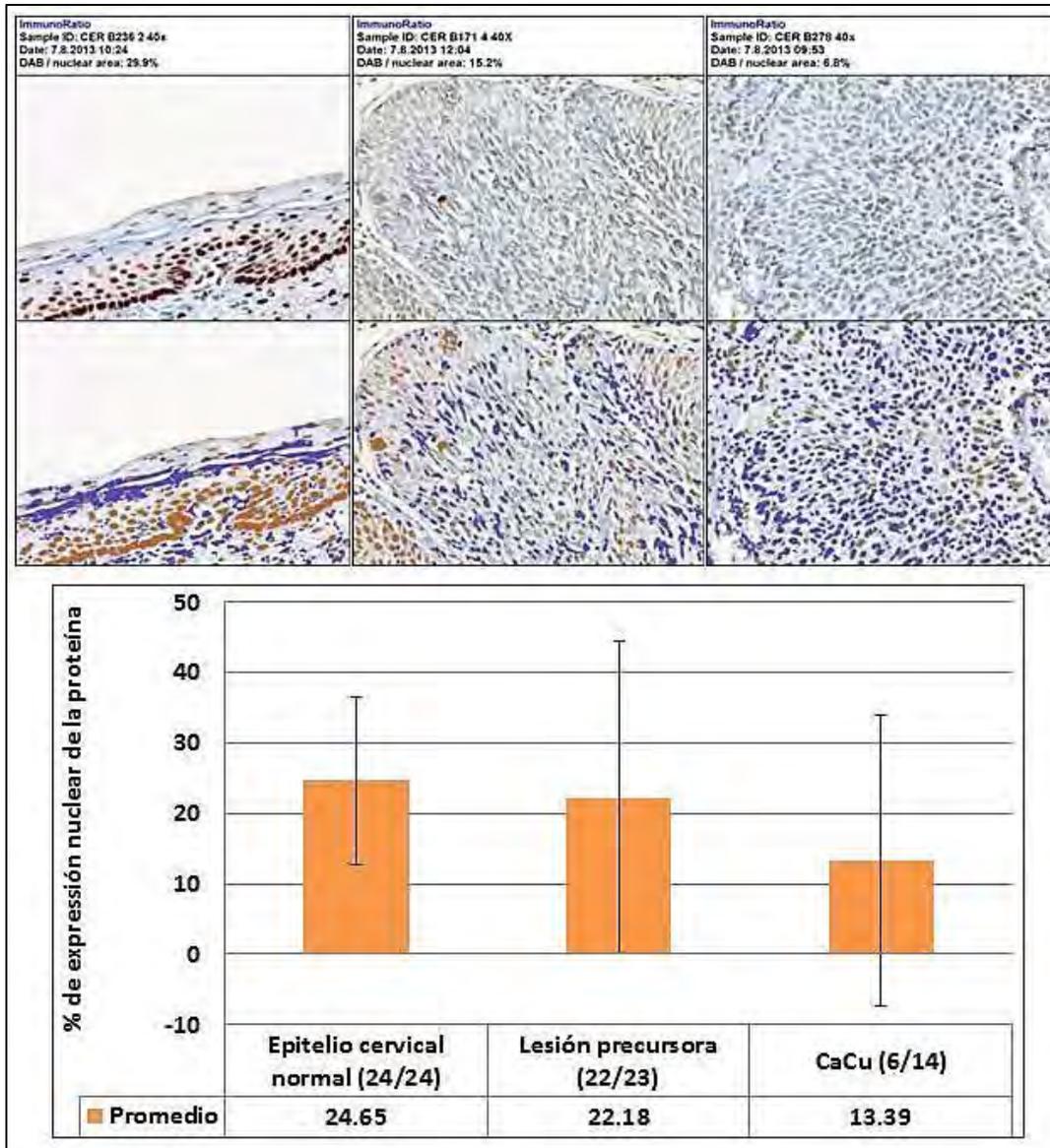


Figura 21. Análisis del porcentaje de expresión nuclear mediante *Image J* y promedio del porcentaje de expresión de la proteína RE- α en el grupo control y casos. ($p= 0.1888$)

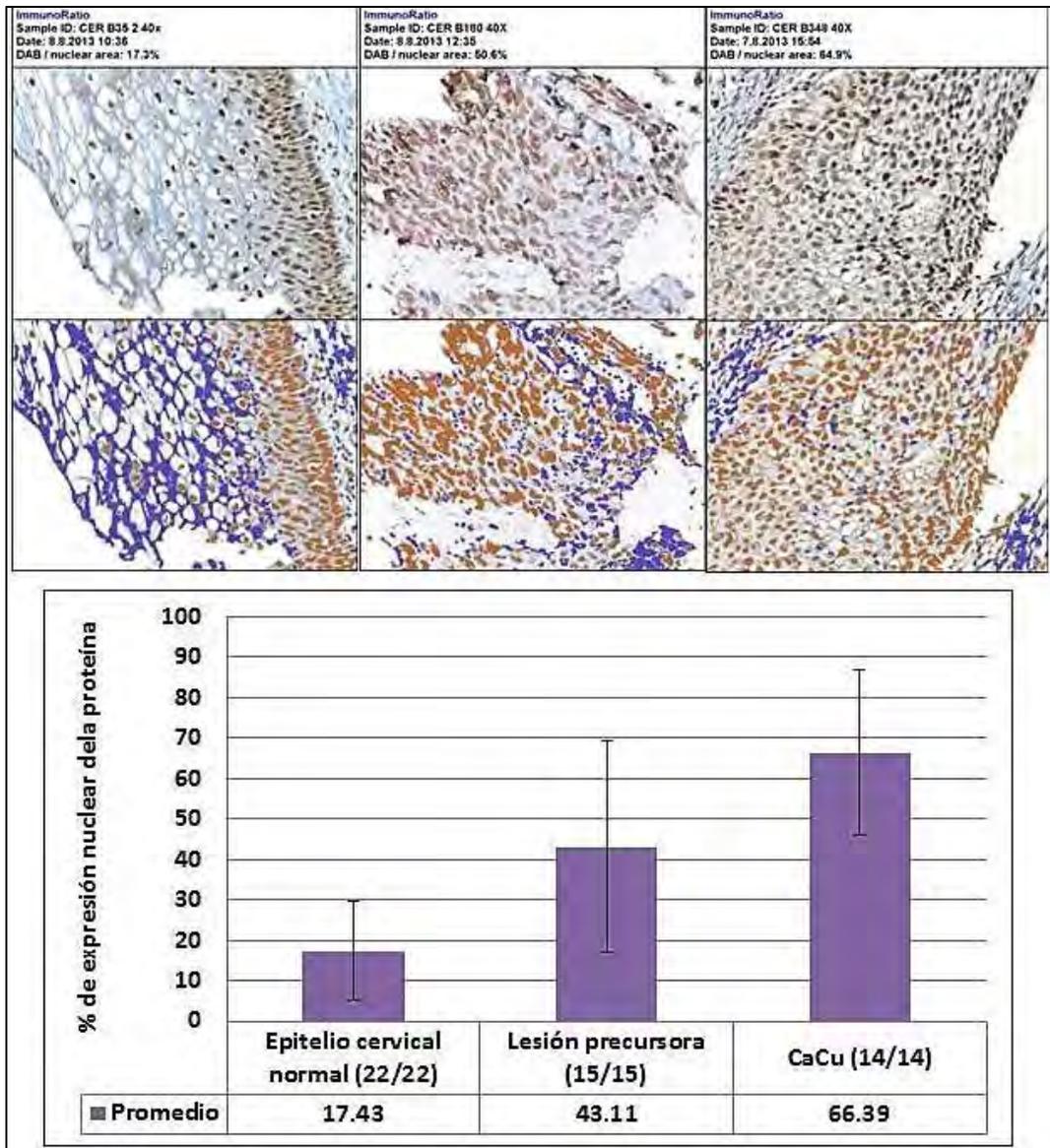


Figura 22. Análisis del porcentaje de expresión nuclear mediante *Image J* y promedio del porcentaje de expresión de la proteína RE- β en epitelio cervical normal, lesión precursora y CaCu. (ANOVA $p=0.00000001$)

Mediante el análisis de imágenes se identificó aumento en el porcentaje de expresión nuclear de las proteínas TWIST-1 y HOXD10 siendo mayor en los casos de CaCu (Figura 19 y 20 respectivamente). En los mismos casos analizados se identificó disminución en el porcentaje de expresión de la proteína del receptor de estrógenos α siendo menor en CaCu y en algunos casos de este mismo no hubo expresión de la proteína (Figura 21). Por último con respecto al receptor de estrógenos β hubo aumento en el porcentaje de expresión siendo mayor en CaCu (Figura 22).



7.2.3. Inmunocitoquímica

Se realizó inmunocitoquímica de las proteínas TWIST-1, HOXD10 y RE- α en líneas celulares de cérvix (HeLa, MS751, C33, Caski y SiHa) y líneas celulares de mama (T47D y MCF7) para evaluar la expresión de las proteínas en ambos tipos de líneas celulares para determinar diferencias en la expresión de las proteínas entre ambos tipos de líneas celulares. (Figura 23 y tabla 3).

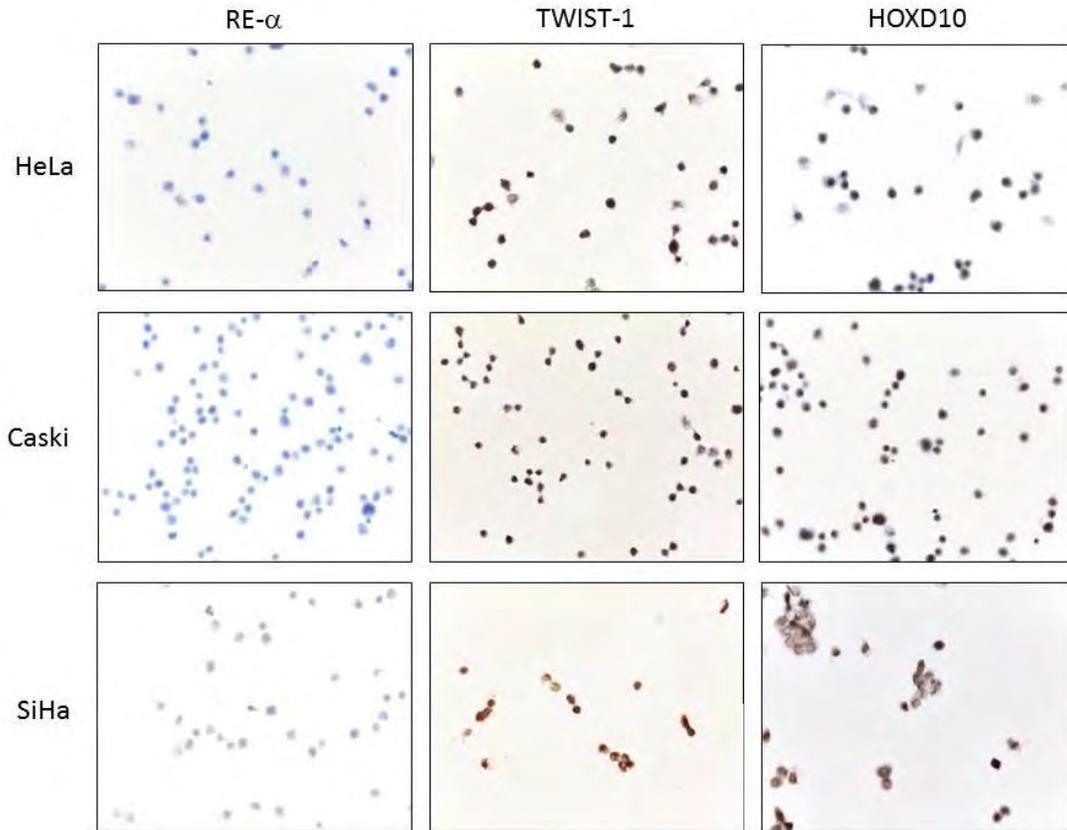


Figura 23. Inmunocitoquímica de las proteínas RE- α , TWIST-1 y HOXD10 en las líneas celulares de cérvix: HeLa, Caski y SiHa. Las imágenes fueron capturadas a un aumento de 400x.



Tabla 3. Expresión de las proteínas RE- α , TWIST-1 y HOXD10 en líneas celulares de cérvix (*) y mama (\approx).

Línea celular	RE- α	TWIST-1	HOXD10
* HeLa	-	+	+
* Caski	-	+	+
* SiHa	-	+	+
* MS751	-	+	+
* C33	-	+	+
* Inbl	-	+	+
\approx T47D	+	+	+
\approx MCF7	+	+	+

Nuestros resultados indican ausencia en la expresión de la proteína RE- α , en las 6 líneas celulares de CaCu, en contraste todos los modelos celulares expresaron tanto proteína TWIST-1 como HOXD10.

Adicionalmente, en 2 líneas celulares de cáncer de mama (T47D y MCF7), fue identificada la expresión de RE- α , TWIST-1 y HOXD10.

7.3. Detección de VPH

A partir del análisis del microarreglos de tejidos se llevó a cabo la detección de VPH en grupo control (epitelio cervical normal) y casos (lesiones precursoras y CaCu) mediante hibridación *in situ* de VPH's de alto riesgo (ISH) y la expresión de la proteína p16 (Figura 24).

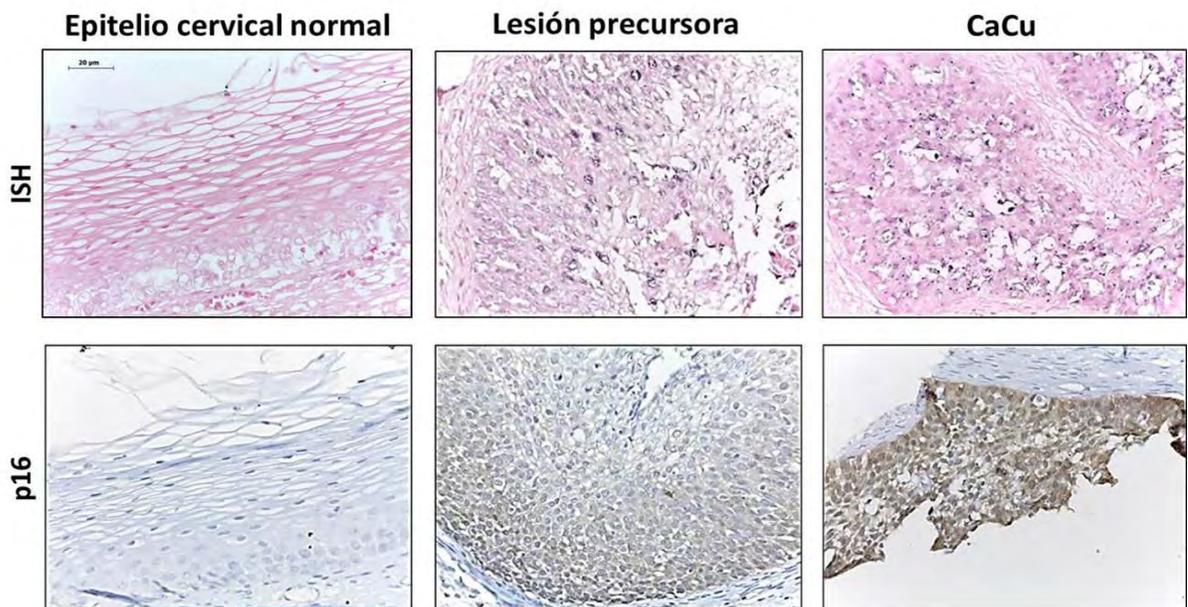




Figura 24. Hibridación in situ (ISH) y p16 en spots del grupo control (epitelio cervical normal) y casos (lesión precursora y CaCu). Imágenes capturadas con aumento total de 400x.

Mediante ISH, ninguno de los tejidos analizados (25 spots) de epitelio cervical normal fueron positivos, mientras que del grupo de casos: el 52.17% (12/23) correspondientes a lesiones precursoras fueron positivos y 46.15% (6/13) de los casos de CaCu fueron positivos.

Al evaluar la expresión de la proteína p16 por medio de ISH, ninguno de los epitelios de tejido cervical normal la expresaron, mientras que del grupo de casos: el 52.17% (12/23) de lesiones precursoras fueron positivos y CaCu todos los casos (13/13) expresaron la proteína.

En ningún caso el epitelio cervical normal expresó ambos marcadores asociados a VPH, mientras que del grupo de casos el 30.43% (7/23) y 46.15% (6/13) de CaCu expresó ambos marcadores.

Detección de VPH por medio de PCR

Respecto a la detección por medio de PCR, en lesiones precursoras y CaCu, incluidas en el microarreglo utilizando primers GP5+/ GP6+, permitió identificar infección por VPH en 85% (17/20) de lesiones precursoras y 92.30% en CaCu (12/13).. Adicional a esto, para descartar falsos negativos (debido a la degradación de la muestra) en la detección de VPH, se realizó PCR múltiple para evaluar la calidad del ADN, amplificando fragmentos de 200pb y 400pb del gen *GAPDH* (Figura 25).

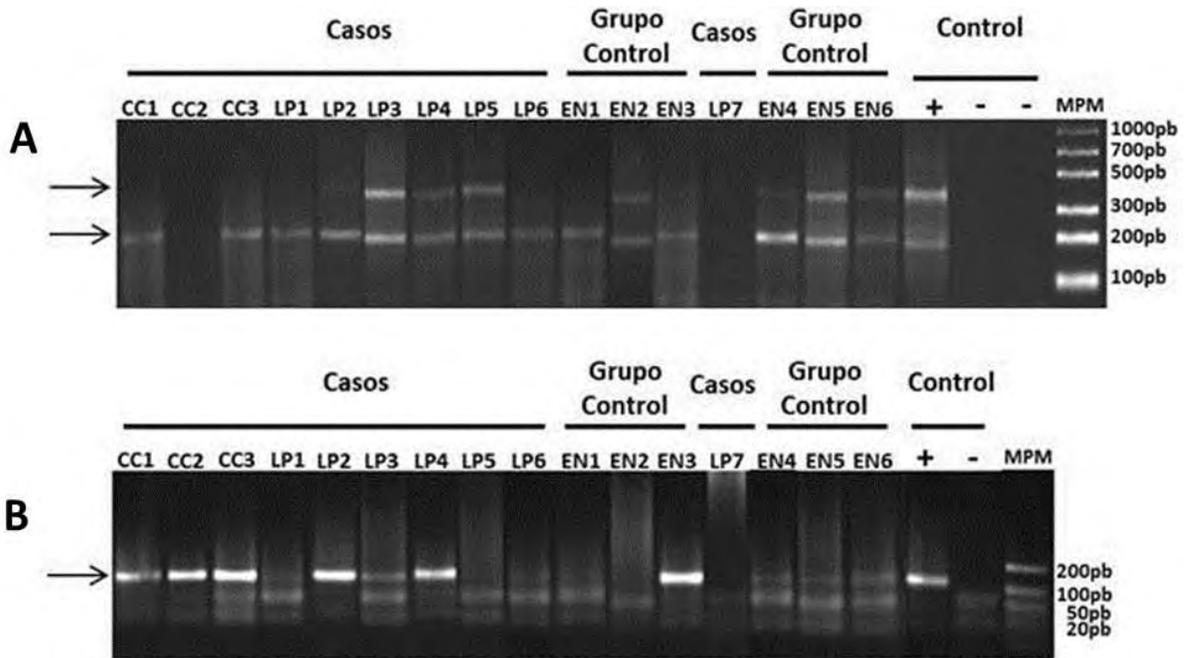


Figura 25. Evaluación de la calidad y detección de VPH en muestras del grupo control (epitelio cervical normal) y de casos (lesión precursora y CaCu). Detección de fragmentos de 400pb y 200pb del gen endógeno GAPDH por medio de PCR multiplex (A). Detección de VPH por medio de PCR punto final utilizando primers GP5+/ GP6+ (B). Como control positivo se utilizó la línea celular SiHa y para el control negativo se utilizó la reacción de PCR sin ADN. Los productos esperados se indican con una flecha. Marcador de peso molecular (MPM), cáncer cervico-uterino (CC), lesión precursora (LP) y epitelio cervical normal (EN).

Respecto a las muestras control, estas correspondían a tejido cervical sin alteraciones neoplásicas, adyacente a lesiones; debido a que no fue posible realizar microdissección para determinar en esa región del tejido la presencia de VPH, sólo se evaluó mediante CISH y la por expresión de p16. Dentro del microarreglo no se incluyeron 13 muestras de CaCu que si fueron consideradas para el análisis de la expresión de los genes(13/22) (Figura 13) ya que no se contaba con el tejido suficiente debido a que se les realizó la extracción de ARN y ADN. Solo 10 muestras que tenían ADN de buena calidad se les realizo la detección de VPH y posteriormente aquellas que fueron positivas se tipificaron (Figura 26).

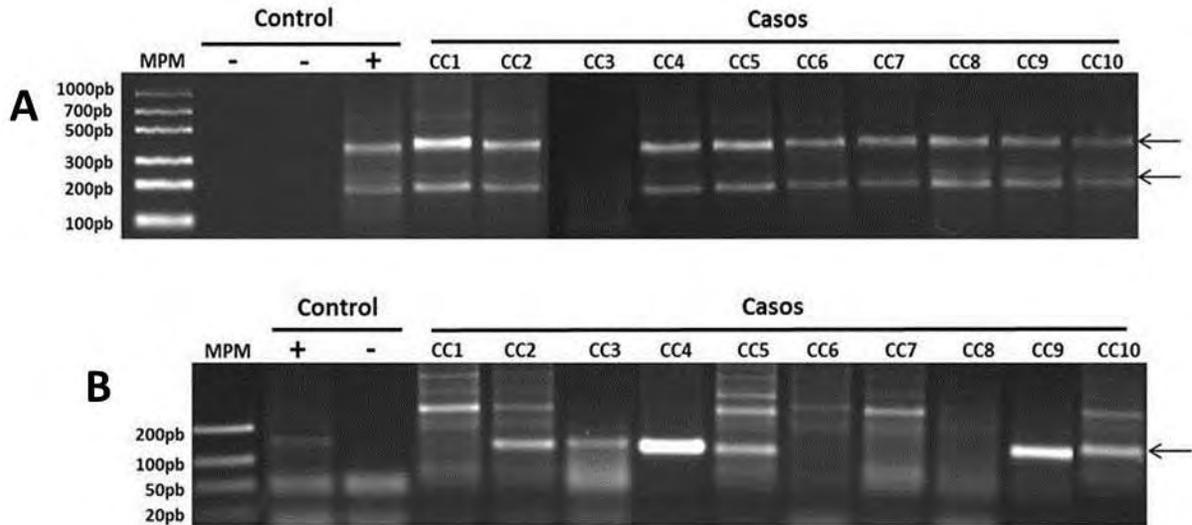


Figura 26. Evaluación de la calidad y detección de VPH en muestras (FFPE) de casos (CaCu). Detección de fragmentos de 400pb y 200pb del gen endógeno GAPDH por medio de PCR multiplex (A) Detección de VPH por medio de PCR punto final utilizando primers GP5+/GP6+ (B). Como control positivo se utilizó la línea celular SiHa y para el control negativo se utilizó la reacción de PCR sin ADN. Los productos esperados se indican con una flecha. Marcador de peso molecular (MPM) y cáncer cervico-uterino (CC)

Por medio de PCR se detectó 70% (7/10) de las muestras de CaCu infección por VPH. A partir de lo obtenido se realizó la tipificación a un total de 9 muestras, se incluyeron 2 muestras que habían sido negativas para PCR ya que correspondían a CaCu por lo que se decidió incluirlas para descartar infección por VPH. El 88.88%(8/9) de las muestras tuvieron VPH 16 y el 11.11%(1/9) tuvo VPH 39. Del 88.88% de las muestras que tuvo VPH 16, el 37.5% (3/8) de estas presentaron otros tipos virales en conjunto con VPH 16 (66, 18, y 45).

En la tabla 4 se muestra una comparación del número de muestras que fueron positivas por alguno de los tres métodos utilizados para la detección de VPH.



Tabla 4. Porcentaje y frecuencia de muestras con infección de VPH analizadas por medio de PCR, ISH y p16

Diagnóstico	PCR % (n)	ISH % (n)	p16 % (n)
Epitelio cervical normal %	N.D.	0% (0/25)	0% (0/25)
Lesión precursora	85% (17/20)	52.17% (12/23)	52.17% (12/23)
CaCu	85.71% (12/14)	46.15% (6/13)	100% (14/14)

De los tres métodos empleados para la detección de VPH se obtuvo un mayor porcentaje de positividad mediante ensayos por PCR, al analizar los diferentes epitelios cervicales.



8. *Discusión*

TWIST-1 regula a nivel transcripcional a *mir-10*, el cual a su vez regula a nivel post-transcripcional a *HOXD10*; lo cual promueve la invasión y metástasis en un modelo de cáncer de mama (Bourguignon *et al* 2010). Por otra parte, el ARNlnc *HOTAIR* participa en el silenciamiento transcripcional de *HOXD10*, también en un modelo de cáncer de mama (Gupta *et al*, 2010), sin embargo se desconoce si este modelo de regulación se presenta en otros tipos de cáncer como en CaCu. Existen reportes en la literatura sobre la expresión de *TWIST-1* (citas) en CaCu y sólo un reporte sobre alteraciones en la expresión del transcrito *HOXD10* (López, 2006); sin embargo a la fecha no se han analizado de manera simultánea la expresión de dichos genes, los cuales participan en una vía de señalización en metástasis. Por lo cual, en el presente trabajo se analizó en epitelios cervicales normales, lesiones precursoras y CaCu, la expresión a nivel transcripcional y proteína a *HOXD10*, y *TWIST-1*, así como la expresión del ARNlnc *HOTAIR*.

A partir de los resultados obtenidos se identificó la expresión de la proteína *TWIST-1* en epitelio cervical libre de alteraciones neoplásicas, específicamente en la capa basal, lo cual no había sido reportado previamente. Reportes recientes indican que *TWIST-1* puede participar en procesos de proliferación (Qian *et al* 2013), lo cual es característico del epitelio basal. Se identificó incrementó de expresión en lesiones precursoras y en CaCu, aunque sólo en 22% de los casos. La sobre expresión de *TWIST-1* está implicada en la progresión neoplásica ya que se asocia a pobre pronóstico en pacientes con CaCu (Shibata y 2008); por lo que las muestras precursoras con sobreexpresión, podrían tener potencial de progresión hacia una lesión de mayor grado; así como las muestras con CaCu asociadas a mal pronóstico. Estos resultados sugieren que los cambios en la expresión de genes involucrados en metástasis y mal pronóstico, pueden presentarse de manera temprana, desde lesiones precursoras, lo cual puede ser de utilidad en la clínica, sin embargo es necesario confirmar esta hipótesis en estudios prospectivos.

La expresión de *TWIST-1* ha sido descrita en procesos de desarrollo embrionario (Simpson, 1983; Thisse *et al* 1987), metástasis (Yang *et al* 2003) y quimioresistencia (Shiota *et al*, 2008; Wang, 2004; Zhu *et al*, 2011). En tejidos humanos de adulto, solo se conoce que su expresión se mantiene en algunos tejidos analizados derivados del mesodermo, tales como corazón, musculo esquelético, riñón y páncreas (Wang *et al* 1997). Sin embargo, al detectar



la expresión tanto del transcrito como de la proteína de TWIST-1 en epitelios cervicales normales podría estar realizando alguna función relacionada con el desarrollo y mantenimiento del epitelio, tal como la proliferación; y no solo como factor transformante del desarrollo oncológico de CaCu, aunque no se tienen reportes sobre esto a pesar de que el aparato genitourinario también deriva del mesodermo (Mann *et al* 2012), cuya formación es parcialmente dependiente de *TWIST-1*.

Respecto a *HOXD10* López *et al* (2006), no identificó su expresión en epitelio normal y sí en muestras con CaCu, en contraste en nuestro trabajo, detectamos la expresión tanto del transcrito como de la proteína. Estos resultados aparentemente contradictorios, podrían explicarse debido a las diferencias en sensibilidad de las técnicas empleadas, ya sea por PCR en punto final empleada en el trabajo de López y la empleada en este trabajo: PCR en tiempo real, además de la microdissección del epitelio cervical, eliminando tejido estromal..

Así mismo, existió expresión de la proteína HOXD10 en epitelios cervicales normales, lesiones precursoras y CaCu, siendo este trabajo el primer reporte sobre su expresión en tejido de cérvix. Por otra parte estudio previos han sugerido que HOXD10 participa como gen supresor de tumores en cáncer ya que la pérdida de expresión se relaciona al desarrollo del cáncer gástrico (Wang *et al*, 2012), endometrial (Osborne *et al*, 1998), mama (Carrio *et al* 2005) y angiogénesis (Carrio *et al*, 2002); sin embargo, la sobre-expresión de HOXD10 en CaCu, sugiere su participación en el desarrollo neoplásico, más que con funciones supresoras.

Adicionalmente respecto a la expresión simultanea de TWIST-1 como de HOXD10, en epitelios cervicales, sugiere incompatible el modelo de regulación pos-transcripcional, reportada previamente para TWIST-1 (Bourguignon *et al*, 2010), dado la expresión de ambas proteínas en los casos aquí estudiados. Por otro lado, no fue posible asociar la regulación de *HOXD10* relacionado con la presencia del ARNlnc, *HOTAIR* como reportes previos sugieren (Gupta *et al* 2007; Rinn *et al* 2007), ya que no hubo expresión o en algunos casos fue baja la expresión de *HOTAIR*. Sin embargo aquellos casos de CaCu (22 %) que expresaron *HOTAIR*, podrían estar asociados con riesgo de progresión de la enfermedad, al estar este gen involucrado en el desarrollo de procesos invasivos y la formación de metástasis como ya se ha mencionado en mama así como en algunos otros tipos de cáncer: gástrico (Yu *et al* 2013), páncreas (Kim *et al* 2013) y de esófago (Lv *et al* 2013).



Los receptores de estrógenos tanto α como β han sido asociados con el desarrollo de CaCu, y otros tipos de cáncer como cáncer de mama (Hyashi *et al*, 2003). Por su parte en CaCu, existen reportes controversiales respecto de la participación de ambos receptores.

Al respecto, en tejido epitelial analizado identificamos la expresión de RE- α en epitelio cervical normal y lesiones precursoras, localizado en células basales y para-basales. Mientras que en los casos de CaCu, en 60% no fue posible detectar la expresión de RE- α en epitelio, no obstante se detectó expresión en células estromales. Estos datos contrastan con lo reportado por López *et al* (2013), donde no detectó expresión de la proteína RE- α y propone que al detectar el transcrito es regulado a nivel pos-transcripcional, sin embargo no se especifica si dicho análisis de expresión se hizo específicamente del epitelio ya que de no ser así cabría la posibilidad de que lo expresado en las muestras de CaCu por PCR podría pertenecer a células del estroma. Adicionalmente, un reciente reporte de Chung *et al* (2013) determina que la expresión en células del estroma, favorece el desarrollo de este carcinoma. Desde el punto de vista funcional, Zhai *et al* (2010), reportaron que la pérdida de RE- α favorece la invasión de cancer cervical así mismo, también identifica la pérdida progresiva del RE-a en el desarrollo de CaCu..

La ausencia del RE- α también se observó en líneas celulares de cérvix y presencia de TWIST-1 al respecto se ha propuesto en líneas celulares de cáncer de mama, un mecanismo de inhibición mediado por TWIST-1, (Fu *et al* 2012); sin embargo, es necesario realizar análisis funcionales para establecer, si este es el mismo mecanismo de inhibición de RE- α .

Nuestro resultados en CaCu, indican que a pesar de la disminución de la expresión de RE- α , la expresión de RE- β se mantiene, incluso incrementa en la progresión histopatológica de las muestras analizadas (epitelio cervical normal, lesión precursora y CaCu). Tales resultados, respecto a la expresión de RE- β en CaCu difieren de lo reportado por Chung *et al* (2008), quienes no lo identificaron en carcinomas cervicales. Al respecto se ha propuesto que RE-b, participa en la invasión en carcinomas endometriales (Takama *et al*, 2001).. Por otra parte, en algunas muestras de CaCu se encontró la expresión de ambos receptores de estrógenos; sin embargo no se ha descrito esta co-expresión en CaCu, en contraste de cáncer de mama al identificar expresión del ARNm de ambos receptores, asociado con



tumores pobremente diferenciados, con nódulos positivos y pobre pronóstico, de acuerdo a lo reportado por Speirs *et al* (1999).

De acuerdo a todo lo anterior, en el presente trabajo fue posible identificar diferentes patrones de expresión en CaCu: (1) presencia del RE- α con ausencia de RE- β , (2) ausencia de RE- α y presencia de RE- β , mientras que (3) co-expresión de ambos receptores. Dichos patrones de expresión de las proteínas podrían indicarnos diferentes mecanismos de regulación en epitelio cervical humanos, lo cual ya ha sido previamente descrito en cáncer de mama (Endrogan *et al*, 2013).

Por otro lado, respecto a la detección de VPH en muestras de epitelios cervicales se identificó mayor porcentaje de positividad mediante ensayos de PCR empleando oligonucleótidos GP5+/GP6+, capaces de amplificar la región conservada de la cápside L1 de VPHs (Manos *et al* 1989). A diferencia de la PCR, la hibridación in situ (ISH) ofrece ventajas aportando información como el estado episomal o integrado del VPH, de acuerdo al patrón de expresión en células del tejido (homogéneo o puntual respectivamente) aunque con ciertas limitaciones no solo en el rango de detección de VPHs sino también en la intensidad de la reacción dificultando su interpretación (Guo *et al*, 2008). Por su parte p16 un marcador subrogado de infección por VPH de alto riesgo (Keating *et al*, 2001), también es usado para su detección en tejidos, sin embargo, es más evidente en lesiones de alto grado y CaCu excluyendo de cierta forma la detección de VPH de alto riesgo, desde lesiones de bajo grado (Klaes *et al* 2001).

Nuestros resultados a partir de las muestras analizadas indican que tanto ISH y la expresión de p16 son métodos de detección de VPH más accesibles en comparación con la PCR en aquellas muestras escasas de epitelio como las biopsias evitando descartarlas.

En la figura 27 se muestra un resumen sobre los modelos descritos en mama analizados en CaCu y los resultados obtenidos, así mismo el modelo propuesto en mama que podría estar también presente en el desarrollo de CaCu sobre la inhibición del RE- α .

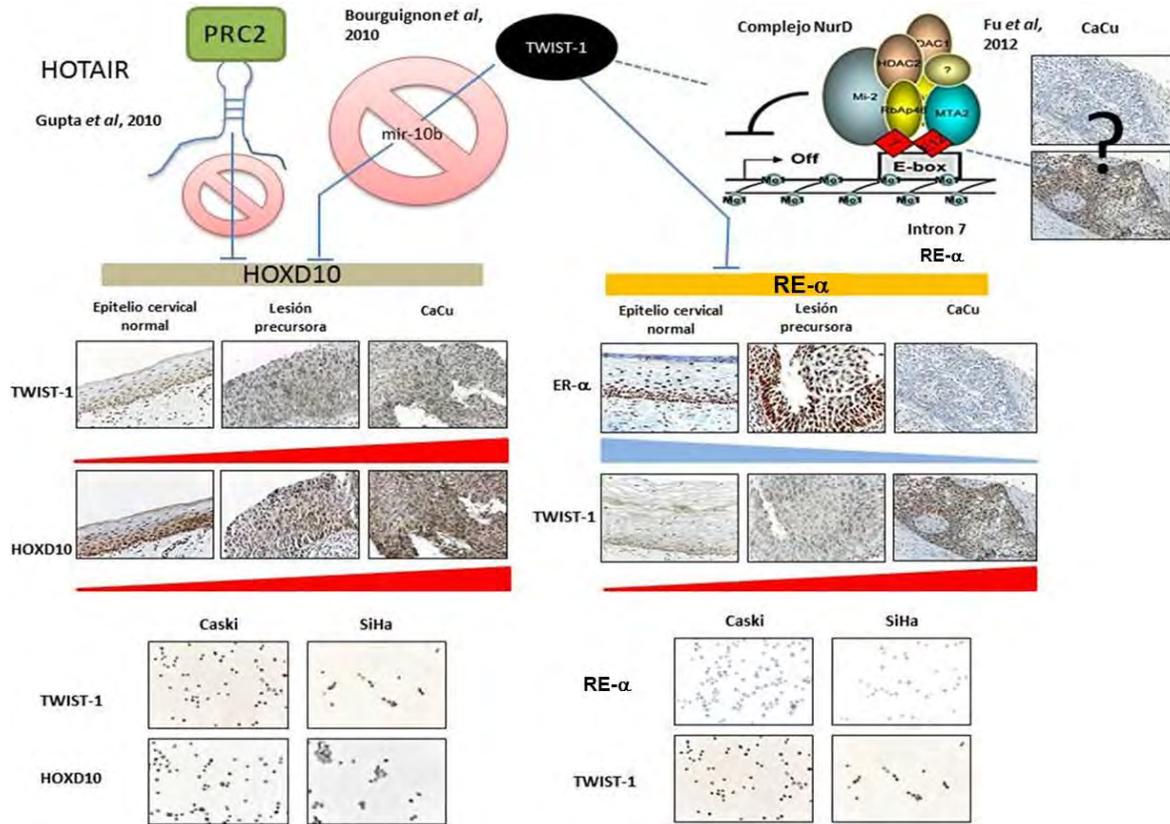


Figura 27. Análisis de genes en epitelios cervicales humanos asociados a invasión y metástasis. La regulación del homeobox HOXD10 por medio del largo no codificante HOTAIR no se pudo asociar en epitelios cervicales (A). La expresión simultánea de la proteína HOXD10 y el morfogenador TWIST-1 contradice el modelo propuesto en mama respecto a la regulación de la última sobre la primera (B) Posible regulación del RE- α por medio de TWIST-1 en CaCu (C). Modelo que explicaría la regulación del RE- α por medio de TWIST-1 descrito en mama (D).



9. Conclusión

- Se identificó la expresión de la proteína de TWIST-1 y HOXD10 en células basales de todos los epitelios cervicales normales analizados, por lo que su presencia sugiere su participación en el mantenimiento epitelial; sin embargo queda por dilucidar las funciones en este tipo de epitelios, siendo este el primer trabajo donde se reporta la presencia de estas proteínas.
- Se identificó en un grupo de lesiones precursoras y CaCu, sobre-expresión de TWIST-1 y HOXD10, lo cual podría asociarse a la progresión de dichas lesiones.
- No fue posible establecer una relación con la presencia de VPH y alteraciones en la expresión de los genes analizados.
- La presencia simultánea de TWIST-1 como HOXD10 en epitelios cervicales, sugiere que el modelo de regulación post-transcripcional descrito en cáncer de mama, no está presente en CaCu.
- Se identificó una relación inversa en los patrones de expresión de TWIST-1 con la disminución en la expresión de RE- α en CaCu, por lo que es compatible con el modelo de regulación transcripcional de TWIST-1 en el intron 7 de RE- α , sin embargo esto debe ser validado en ensayos funcionales.
- No se detectó expresión de HOTAIR en ninguno de los tejidos normales analizados; sin embargo en algunos casos de CaCu se identificó expresión, lo que podría sugerir su participación en mecanismos de invasión y metástasis, como previamente se ha asociado en tumores de origen epitelial entre ellos: cáncer de mama, cáncer gástrico, páncreas y esófago.
- Finalmente, la sobre-expresión de los genes TWIST-1 y HOXD10 en un grupo de lesiones precursoras y CaCu, sugiere que la expresión de genes involucrados en metástasis es un evento temprano en el desarrollo del CaCu.



10. *Literatura citada*

1. Abate-Shen C. 2002. Deregulated homeobox genes expression in cancer: cause or consequence?. Nature Publishing Group. (2): 777-784
2. Alba A, Cararach M y Rodríguez-Cerdeira C. 2009. The Human Papillomavirus(HPV) in Human Pathology: Description, Pathogenesis, Oncogenic Role, Epidemiology and Detection Techniques. The Open Dermatology Journal 3: 90-102.
3. Bernard Hans-Ulrich. 2004 The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of the human papillomaviruses. Journal of Clinical Virology 32s: s1-s6.
4. Bourguignon L Y W, Wong G, Earle C, Krueger K, y Speak C C. 2010. Hyaluron-CD44 interaction promotes c-Src-mediated Twist signaling, microRNA-10b expression, and RhoA/RhoC up-regulation, leading to Rho-kinase-associated cytoskeleton activation and breast tumor cell invasion. The journal of biological chemistry. 285 (47): 36721-36735.
5. Bosch F X, Manos M M, Muñoz N, Sherman M, Jansen A M, Peto J, Schiffman M H, Moreno V, Kurman R y Shah K V. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. Journal of the National Cancer Institute. 87: 796-802.
6. Bosch F X, Lorincz A, Muñoz N, Meijer C J L M y Shah K V. The causal relationship between the human papillomavirus and cervical cancer. 2002. Journal of Clinical Pathology. 55: 244-265.
7. Boyer S N, Wazer D E y Band V. 1996. E7 oncoprotein of human papillomavirus 16 induces degradation of retinoblastoma pretein through the ubiquitin-proteosome pathway. Cancer Research. 56: 4620-4624.
8. Broso P R y Buffetti G. 1993. The Papanicolaou classification in the Bethesda System. Minerva Ginecol Journal. 45: 557-563.
9. Camargo M, Soto- De León S, Sánchez R, Muñoz M, Vega E, Beltran M, Pérez-Prados A, Patarroyo M E y Patarroyo M A. 2011. Journal of Virological Methods. 178: 68-74.
10. Carrio M, Arderiu G, Myers C. y Boudreau N J. 2005. Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. Cancer research. 65: 7177-7185.



11. Chan S Y , Bernard H U, Ong C K, Chan S P, Hofman B y Delius H. 1992. Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a show case of the molecular evolution of DNA viruses. *Journal of Virology*. 66: 5714-5725.
12. Chung Sang-Chung, Wiedmeyer K, Shai A, Korach K S y Lambert P F. 2008. Requirement for estrogen receptor α in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Research*. 68(23): 9928-9934.
13. Clifford G M, Smith J S, Plummer M, Muñoz N y Franceschi S. 2003. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal Cancer*. 88: 63-73.
14. Cutts F T, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, de Sanjose S, Garnett G, Edmunds W J, Claeys P, Goldenthal K L, Harper D M y Markowitz. 2007. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bulletin of the World Health Organization*. 85:719-726.
15. Diablc M M, Hlupic L, Babic D, Jukic S y Seiwert S. 2004. Comparison of polymers chain reaction and catalysed signal amplification in situ hybridization Methods for human papillomavirus detections in paraffin-embedded cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *Archives of Medical Research*. 35: 511-516.
16. Depriest P D, Van Nagell J R y Powell D E. 1990. Microinvasive cervical cancer. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 33: 846-851.
17. de Villiers Ethel-Michel. 2013. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 445: 2-10.
18. Dobec M, Bannwart F, Kilgus S, Kaeppli F y Cassinotti P. 2011. *Journal of Medical Virology*. 83: 1370-1376.
19. Doorbar J. 2005. The papillomavirus life. *Journal of Clinical Virology*. 32S: S7-S15
20. Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*. 110: 525-541.
21. Fu J, Zhang L, He T, Xiao X, Liu X, Wang L, Yang L, Yang M, Zhang T, Chen R y Xu J. 2012. TWIST represses estrogen receptor- α expression by recruiting the NurD protein complex in breast cancer cells. *International Journal of Biological Sciences*. 8: 522-532.



22. Ghouzzi V, Legeai-Mallet L, *et al.* 2000. Saethre-Chotzen mutations cause TWIST-1 protein degradation or impaired nuclear location. *Human Molecular Genetics* 9(5): 813-819.
23. Gupta R A, Shah N, Wang K C, Kim J, Horlings H M, Wong D J, Tsai Miao-Chih, Hung T, Argani P, Rinn J L, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West R B, Van de Vijver M J, Sukumar S y Chang H Y 2010. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* Vol 454: 1071-1076.
24. Gutierrez-Xicoténcatl L, Plett-Torres T, Madrid-González C L y Madrid-Marina V. 2009. Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. *Salud Pública de México.* 51(3): 479-488.
25. Guo M, Gong Y, Deavers M, Silva E G, Jan Y J, Codgell D E, Luthra R, Lin E, Lai H C, Zhang W y Sneige N. 2008. Evaluation of a commercialized in situ hybridization assay for detecting human papillomavirus DNA in tissue specimens from patients with cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Journal of Clinical Microbiology.* 46(1): 274-280.
26. Hadzic B, Hadzic N, y Curcin N. 1999. Histological classification and terminology of precancerous lesions of the cervix. *Med Pregl.* 52: 151-155.
27. Hanahan D y Weinberg R A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646-674.
28. Heideman D A, Hesselink A T, Berkhof J, van Kemenade F, Melchers W J, Daalmeijer N F, Verkuijten M, Meijer CJ y Snijders PJ. 2011. *Journal of Clinical Microbiology.* 49: 3983-3985.
29. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci M R, McLaughlin-Drubin M E, Münger K, Feldman S, McKeon F D, Xian W y Crum C P. 2012. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 109(26): 10516-10521.
30. Hildesheim A, Schiffman M H, Graviutt P E, Glass A G, Greer C E, Zhang T, Scott D R, Rush B B, Lawler P, Sherman M. E, Kurman R J y Manos M M 1994. Persistence of the type-specific human papillomaviruses infection among cytologically normal women. *Journal of the Infectious Disease.* 169(2): 235-240.
31. Holowaty P Miller A B, Rohan T. 1999. Natural dysplasia of the uterine cervix. *Journal of the Natural Cancer Institute.* 91: 252-258.



32. Hunter K W, Crawford N P S y Alsarraj J. 2008. Mechanism of metastasis. *Breast Cancer Research*. 1-10.
33. Hwang S J, Shroyer K R. 2011. Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma. *Journal of Oncology*.
34. Jan Y N, Jan L Y. 1993. HLH proteins, fly neurogenesis,, and vertebrate myogenesis. *Cell*. 75: 827-830.
35. Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J. Ward E. y Forman D. 2011. Global CancerStatistics. *CancerJournal of Clinicians*.
36. Kalebic T. 2003. Epigenetic Changes: Potential Therapeutic Targets. *New York AcademySciences*. 983:278-285.
37. Kalluri R y Weinberg R A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*. 119: 1420-1428.
38. Keating J T, Ince T y Cum C P. 2001. Surrogates biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Advances in Anatomis Pathology*. 8: 83-92.
39. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W. Petry U, Dallenbach-Helweg G, Schmidt D y von Knebel Boeberitz . 2001. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific biomarker for dysplatic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *International Journal of Cancer*4. 92: 276-284.
40. Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G, Johnson G, Frank J, Burghardt R, Kim S y Safe S. 2013. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. *Oncogene* 32(13): 1616- 1625.
41. Lappin T R J, Grier D G, *et al.* 2006. Hox genes: Seductive Science, Mysterious Mechanisms. *The United Medical Society*. 75 (1) 23-31.
42. Lee J U, Shin J H, Kim J O, Choi Y J, Lee K Y, Park J S, Lee W C y Lee A. 2010. Evalutaion of the HPV ISH assay in cervical cáncer. *The Korean Journal of Pathology*. 44: 513-520.
43. Lengauer C, Kinzler K W y Vogelstein B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 396: 643-649.
44. Li J y Zhou B P. 2011. Activation of β -catenina and Akt pathways by Twist are critical fo the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BioMed Central Cancer*. 11:49.



45. López R, Garrido E, Vázquez G, Piña P, Pérez C, Alvarado I y Salcedo M. 2006. A subgroup of HOX Abd-B gene is differentially expressed in cervical cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* 16: 1289-1296.
46. López-Romero R, Garrido-Guerrero E, Rangel-López A, Manuel-Apolinar L, Piña-Sánchez P, Lazos-Ochoa M, Mantilla-Morales A, Bandala C y Salcedo M. 2013. The cervical malignant cells display a down regulation of ER- α but retain the ER- β expression. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 6 (8): 1594-1602.
47. Lv X B, Lian G Y, Wang H R, Song E, Yao H y Wang M H. 2013. Long noncoding RNA HOTAIR is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma progression and survival. *Plos ONE* 8(5): 6pp.
48. Madan-Erdogan Z, Charm Tze-Howe, Jiang Y, Liu E T, Katzenellenbogen J A y Katzenellenbogen B S. 2013. Integrative genomics of gene and metabolic regulation by estrogen receptors α and β , and their cognates. *Molecular Systems Biology*. 1-19.
49. Malle D, Pateinakis P, Chakka E y Destouni C. Experience with a thin-layer, liquid-based cervical cytologica screening method. *Act Cytologica*. 47: 129-134.
50. Mango L J 1996. Reducing false negatives in clinical practice: The role of neural network technology. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 175: 1114-1119.
51. Manos M M, Ting Y, Wrigt D K, Lewis A J, Broker T J y Wolinsky S M. 1989. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*. 7: 209-214.
52. Massad L S y Collins Y C 2003. Strength of correlations between colposcopic impression and biopsy histology. *GynecologicOncology*. 89:424-428.
53. Muñoz N, Bosch F X, de SanJose S, Herrero R, Castellsague S, Shan K V, Snijders S y Meijer C. J. 2003. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*. 348: 518-527.
54. Myers C, Charboneau A, Cheung I, Hanks D y Boudreau N. 2002. Sustained expression of homeobox D10 inhibits angiogenesis. *American Journal of Pathology*. 161(6): 2099-2109.
55. Osborne J, Hu C, Hawley C, Underwood L J, O'Brien T J, y Baker V V. 1998. Expression of HOXD10 gene in normal endometrial and endometrial adenocarcinoma. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 5: 277-280.



56. Parkin M, Almonte M, Bruni L, Clifford G, Curado Maria-Paula y Piñeros Mairon. 2008. Burden and trends of type-specific Human papillomavirus infections and related diseases in the Latin America and Caribbean Region. 26S: L1-L15.
57. Peto J, Gilham C, Fletcher O y Mathews F E. 2004. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. The Lancet. 346: 249-256.
58. Qian J, Luo Y, Gu X, Zhan W y Wang Xi. 2013. Twist1 promotes gastric cancer cell proliferation through up-regulation of FoxM1. Plos ONE 8(10): 7 pp.
59. Rinn J L, Kertesz M, Wang J K, Squazzo S L, Xu X, Bruggmann S A, Goodnough L H, Helms J A, Farnham P J, Segal E y Chang H Y. 2007. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human *Hox* loci by noncoding RNAs. Cell. 129: 1311-1323.
60. Roberts I, Grace Ng, Foster N, Stanley M, Herdman M T, Pett M R, Teschendorff A y Coleman N. 2008. BioMed Central Biotechnology. 8:57.
61. Scheffner M, Werness B A, Huibregtse J M, Levine A J y Howley P M. 1990. The E6 oncoprotein encoded by the human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell. 63: 1129:1136.
62. Sellors J W y Sankaranarayanan R. 2003. Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: A beginner's manual. Lyon, France: IARC Press.
63. Shibata K, Kajiyama H, Ino M, Terauchi E, Yamamoto A, Nawa S, Nomura y Kikkawa F. 2008. Twist expression in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome. Annals of Oncology. 19: 81-85.
64. Shiota M, Izumi H, Onitsuka T, Miyamoto N, Kashiwagi E, Kidani A, Yokomizo A, Naito S y Kohno K. 2008. Twist promotes tumor cell growth through YB-1 expression. Cancer Research. 68 (1): 98-105.
65. Simpson P. 1983. Maternal-zigotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in *Drosophila* embryos. Genetics. 105: 615-632.
66. Speirs V, Parkes A T, Kerin M J, Walton D S, Carleton P J, Fox J N y Atkin S L. 1999. Coexpression of estrogen receptor α and β : poor prognostic factors in human breast cancer. Cancer Research. 59: 525-528.
67. Shibata K, Kajiyama H, Ino K, Teracuchi M, Yamamoto E, Nawa A, Nomura S y Kikkawa F. 2008. Twist expression in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome. Annals of Oncology. 19(1):81-85



68. Talmadge J E. 2012. Clonal selection of metastasis within the life history of a tumor. *CancerResearch*. 67: 11471-11475.
69. Takama F, Kanuma T, Wang D, Kagami I y Mizinuma H. 2001. Oestrogen receptor β expression and depth of myometrial invasion in human endometrial cancer. *British Journal of Cancer*. 84: 545-549.
70. Thisse B, el Messal M, Perrin-Schmitt F. 1987. The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucliec Acid Research*. 15:3439-3453.
71. van Beers E H, Joose S A, Ligtenberg M J, Fles R, Hogervorst F B L, Verhoef S y Nederfof P M. 2006. A multiplex PCR predictor for aCGH succes of FFPE samples. *British Journal of Cancer*. 95: 333-337
72. van Hamont D, van Ham M A, Bakkers J M, Massuger L F y Melchers W J. 2006. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 3122-3129.
73. Villa L L y Denny L. 2006. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 94: 71-80.
74. Walboomers M J, Jacobs Vm, Manos M M, Muñoz N, Bosch X F, Kummer A J, Shah V K, Snijders J P, Peto J, Meijer J C, y Muñoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal Pathology*. 12-19.
75. Walts A E y Thomas P. Endometrial cells and the AutoPap System for primary screening of cervicovaginal Pap smears. *DuagnosticCytopathology*. 27: 232-237.
76. Wang L, Chen S, Xue M, Zhong J, Wang X, Gan L, Lam E Y K, Liu X, Zhang J, Tianhua Z, Yu J, Jin H y Si J. 2012. Homeobox D10 gene, a candidate tumor suppressor, is downregulated through promoter hypermethylation and associated with gastric carcinogenesis. *Molecular Medicine*. 18: 389-400.
77. Wang X, Ling MT, Guan XY, et al. 2004. Identification of a novel function of TWIST-1, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells. *Nature Publishing Group* 23:474–82. Yang J, Mani S A, Donaher J L. *et al.* 2004. Twist-1, a master regulator of morphogenesis plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117: 927-939.
78. Xu Z Y, Yu Q M, Du Y A, Yang L T, Dong R Z, Huang L, Yu P F y Cheng X D. 2013. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR supresses tumor invasión and reverses epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *International Journal of Biologicas Sciences*. 9: 587- 597.



-
79. You S J y Jones P A. 2012. Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin?. *Cancer Cell*. 22(1): 9–20.
 80. Yu W, Kamara H y Svoboda K K H. 2008. The role of Twist during palate development. *Developmental Dynamics*. 237: 2716-2725.
 81. Zhai Y, Bommer G T, Feng Y, Wiese A B, Fearon E R, y Cho K R, 2010. Loss of estrogen receptor 1 enhances cervical cancer invasion. *177(2)*: 884-895.
 82. Zhu K, Chen L, Han X, Wang J y Wang J. 2011. Short-hairpin RNA targeting Twist1 suppress cell proliferation and improves chemosensitivity to cisplatin in HeLa human cervical cancer cells. *Oncology reports*. 27: 1027-1034.