



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**IDENTIFICACION DE GENES REGULADOS POR LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN
HOXC9 y HOXB13 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

SALGADO BERNABÉ MANUEL EDUARDO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. PATRICIA PIÑA SÁNCHEZ
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

COMITÉ TUTOR: DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA
DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 28 de septiembre de 2015, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **SALGADO BERNABÉ MANUEL EDUARDO** con número de cuenta **303183316**, con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE GENES REGULADOS POR LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN HOXC9 Y HOXB13 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. PATRICIA PIÑA SÁNCHEZ**:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Vocal: DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA
Secretario: DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO
Suplente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
Suplente: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de noviembre de 2015

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por el apoyo recibido en el transcurso de la Maestría.

El presente proyecto se registró ante el Fondo de Investigación en Salud con el número R y recibió financiamiento del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo el convenio FIS/IMSS/PROT/G11/947

Al CONACYT por su invaluable apoyo al otorgar la beca 294553 para la realización de este trabajo de investigación.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo económico con folio 2015-080.

Finalmente agradezco a la Dra. Patricia Piña Sánchez por su incondicional apoyo y confianza durante los años que he sido su alumno. Comité Tutor, al Dr. Federico Ávila Moreno, a la Dra. Gisela Ceballos Cancino por sus comentarios para mi desarrollo académico y profesional durante el progreso de la maestría.

ÍNDICE	2
LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	V
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CÁNCER CERVICO UTERINO (CACU)	3
ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SE ASOCIAN CON DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER Y CACU	5
GENES HOX	8
ACTIVACIÓN Y REPRESIÓN DE LOS GENES HOX POR POLICOMB Y TRITORAX	10
ALTERACIONES MOLECULARES EN LOS GENES HOX EN	12
GENES HOX EN CÁNCER CACU Y REGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN	15
BLANCOS GÉNICOS DE HOX	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
METODOLOGÍA	26
INMUNOCITOQUÍMICA	26
FRAGMENTACIÓN DE CROMATINA	26
INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA	27
AMPLIFICACIÓN GENÓMICA DEL DNA INMUNOPRECIPITADO	28
MARCAJE Y AMPLIFICACIÓN PARA HIBRIDACIÓN EN MICROARREGLOS 3x720k	28
OBTENCIÓN DE LA IMAGEN (ESCÁNER DE IMAGEN) A PARTIR DE MICROARREGLOS DE SECUENCIAS PROMOTORAS (3x720k NIMBLEGEN ROCHE)	29
ANÁLISIS DEIMAGEN DE MICROARREGLOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BLANCOS GÉNICOS DE HOXB13 Y HOXC9	29
RESULTADOS.....	31
EXPRESIÓN DE HOXB13 Y HOXC9 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CACU: HELA Y CASKI	31
ANÁLISIS DE ANOTACIONES ENRIQUECIDAS PARA LOS BLANCOS GÉNICOS IDENTIFICADOS DE HOXB13 Y HOXC9 EN CÉLULAS HELA.....	32
<i>Funciones moleculares asociadas a los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células HeLa</i>	<i>33</i>
<i>Proceso biológicos asociados a los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células HeLa.....</i>	<i>34</i>
<i>Vías moleculares en las cuales se identificaron involucrados los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células HeLa</i>	<i>36</i>
ANÁLISIS DE ANOTACIONES DE LOS BLANCOS GÉNICOS EXCLUSIVOS DE HOXB13 HOXC9 ASÍ COMO LOS GENES IDENTIFICADOS CON POSICIONAMIENTO DE AMBOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN HOXB13 Y HOXC9 EN CÉLULAS HELA.....	37
<i>Funciones molecular de los blanco génicos exclusivos de HOXB13, HOXC9 y con co-posicionamiento de HOXB13 y HOXC9 en células HeLa</i>	<i>38</i>
<i>Procesos biológicos asociados los blancos génicos exclusivos de HOXB13, HOXC9 y genes con co-posicionamiento por HOXB13 y HOXC9 en HeLa</i>	<i>39</i>
<i>Vías moleculares asociadas a los blancos génicos exclusivos de HOXB13, HOXC9 y con co-posicionamiento de HOXB13 y HOXC9 en células HeLa</i>	<i>41</i>

ANÁLISIS DE ANOTACIONES ENRIQUECIDAS PARA LOS BLANCOS GÉNICOS IDENTIFICADOS DE HOXB13 Y HOXC9 EN CÉLULAS CASKI	41
<i>Funciones Moleculares asociadas a los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células CaSki</i>	42
<i>Procesos biológicos asociados a los blancos de HOXB13 y HOXC9 en células CaSki.....</i>	44
<i>Vías moleculares asociadas a los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células CaSki.....</i>	46
ANÁLISIS DE ANOTACIONES DE LOS BLANCOS GÉNICOS EXCLUSIVOS DE HOXB13, HOXC9 ASÍ COMO LOS GENES IDENTIFICADOS CON POSICIONAMIENTO DE AMBOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN HOXB13 Y HOXC9 EN CÉLULAS CASKI	47
<i>Funciones molecular de los blanco génicos exclusivos de HOXB13, HOXC9 y con co-posicionamiento de HOXB13 y HOXC9 en células CaSki.....</i>	48
<i>Procesos biológicos asociados los blancos génicos exclusivos de HOXB13, HOXC9 y genes con co-posicionamiento por HOXB13 y HOXC9 en células CaSki</i>	49
<i>Vías moleculares asociadas a los blancos génicos exclusivos de HOXB13, HOXC9 y con co-posicionamiento de HOXB13 y HOXC9 en CaSki</i>	51
IDENTIFICACIÓN DE LAS DIFERENCIAS EN BLANCOS GÉNICOS DE ACUERDO AL TIPO VIRAL, HPV18 (HELA) Y HPV16 (CASKI) ..	52
<i>Procesos Biológicos asociados a los blancos génicos de HOXB13 en relación a VPH16, VPH18 y VPH16-VPH18</i>	53
<i>Funciones moleculares asociadas a los blancos génicos de HOXB13 en relación a VPH16, VPH18 y VPH16-VPH18</i>	55
<i>Vías moleculares asociadas a los blancos génicos de HOXB13 en relación a VPH16, VPH18 y VPH16-VPH18</i>	56
ANÁLISIS DE ANOTACIONES DE LOS BLANCOS GÉNICOS DIFERENCIALMENTE ENRIQUECIDOS POR POSICIONAMIENTO DE HOXC9 EN LÍNEAS CELULARES HPV18 Y HPV16.	57
<i>Procesos Biológicos asociados a los blancos génicos de HOXC9 en relación a VPH16, VPH18 y VPH16-VPH18</i>	57
<i>Funciones moleculares de los blancos génicos de HOXC9 en relación a VPH16, VPH18 y VPH16-VPH1859</i>	
<i>Vías moleculares asociadas a los blancos génicos de HOXC9 en relación a VPH16, VPH18 y VPH16-VPH18</i>	60
IDENTIFICACIÓN DE LOS POTENCIALES BLANCOS GÉNICOS ACTIVOS TRANSCRIPCIONALMENTE DE HOXB13 Y HOXC9 EN HELA 61	
<i>Vías moleculares asociadas a los blancos génicos potencialmente activos transcripcionalmente de HOXB13, HOXC9 y HOXB13-HOXC9 en células HeLa.....</i>	62
VALIDACIÓN DE RESULTADOS.....	63
DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES.....	76
LITERATURA CITADA	77

Lista de Figuras

- FIGURA 1. VPHAR PROMUEVE ALTERACIÓN DEL CICLO CELULAR POR LA INHIBICIÓN DE P53 Y PRB.** LA INTEGRACIÓN DEL ADN VIRAL EN INFECCIONES PERSISTENTES SE DA POR LA RUPTURA DEL GENOMA VIRAL EN LA REGIÓN CODIFICANTE E2 QUE TIENE LA FUNCIÓN DE REGULAR LA EXPRESIÓN DE LAS ONCOPROTEÍNAS E6 Y E7 PROMOViendo LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR AL SECUESTRAR A PRB Y EVITAR LA REPARACIÓN DEL ADN MEDIANTE P53. 4
- FIGURA 2. ALTERACIONES EN EL PERFIL DE EXPRESIÓN EN CACU.** A) MAPA DE CALOR DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR MICROARREGLOS EN TEJIDO NORMAL, LESIONES PRECURSORAS DE ALTO GRADO Y CACU, EN AMARILLO SON SEÑALADOS HOXC6, HOXC10 Y HOXD3 QUE FUERON IDENTIFICADOS COMO SOBRE EXPRESADOS EN CACU EN RELACIÓN AL TEJIDO NORMAL. PARA MAYOR DETALLE EN LA INFORMACIÓN SE PUEDE CONSULTAR EL ARTÍCULO COMPLETO EN [HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/PUBMED/17974957](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17974957). B) A PARTIR DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN QUE SE MUESTRA A LA DERECHA, LOS GENES SOBRE EXPRESADOS (ROJO) Y SUB EXPRESADOS (VERDE) EN CACU Y FUERON AGRUPADOS EN VÍAS MOLECULARES POR MEDIO DE KEGG, LA IMAGEN Y EL ARTÍCULO COMPLETO PUEDEN SER REVISADOS EN [WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/PUBMED/17822553](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17822553). TOMADOS Y MODIFICADOS DE A) ZHAI, 2007 Y B) PÉREZ, 2007. 6
- FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LOS CLUSTERS Y PROTEÍNAS HOX.** A) HOMOLOGÍA DEL CLUSTER HOX EN DROSOFILA SP. Y HUMANO, TOMADO Y MODIFICADO DE LAPPING, 2006. B) ESTRUCTURA DE LOS GENES HOX Y LAS REGIONES Y EL HOMEODOMINIO QUE RECONOCE LA SECUENCIA CONSERVADA TAATT POR MEDIO EN LOS SURCOS MAYOR Y MENOR DE ADN, TOMADO Y MODIFICADO DE SVINGEN Y TONISSEN, 2006. LA REVISIÓN COMPLETA PUEDE SER CONSULTADA EN [WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/PUBMED/16721389](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16721389). 9
- FIGURA 4. FUNCIÓN DE POLYCOMB EN LA REPRESIÓN POR COMPACTACIÓN DE CROMATINA.** REPRESENTACIÓN DE LA FUNCIÓN REPRESORA DE LA CROMATINA POR POLYCOMB MEDIANTE MODIFICACIONES DE HISTONAS PARA GENERAR EL SILENCIAMIENTO DE LA CROMATINA Y REPRESIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN. PRC2 RECONOCE SECUENCIAS DE DINUCLEOTIDOS CPG METILADOS PARA ESTABLECER LA MARCA DE HISTONAS H3K27ME3 QUE SIRVE POSTERIORMENTE COMO SEÑAL DE RECONOCIMIENTO PARA PRC1 QUE ESTABLECE LA MARCA DE REPRESIÓN H2K119UB EN LA CROMATINA. LA IMAGEN FUE EDITADA Y PUEDE SER CONSULTADA AL IGUAL QUE LA REVISIÓN COMPLETA SOBRE LA FUNCIÓN DE POLYCOMB EN [HTTP://WWW.NATURE.COM/NSMB/JOURNAL/V20/N10/FULL/NSMB.2669.HTML](http://www.nature.com/nsmb/journal/v20/n10/full/nsmb.2669.html) 12
- FIGURA 5. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNAS HOX EN LESIONES CERVICALES Y CACU** A, EN LAS IMÁGENES DE EPITELIOS SE MUESTRA EL INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE HOXB⁷ Y HOXB¹³, LAS GRÁFICAS REPRESENTAN LA CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE EXPRESIÓN. EXPRESIÓN DE HOXB² Y HOXB¹³ EN EPITELIO SIN NEOPLASIA (CONTROL), NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL I (NIC¹), NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL II-III (NIC 2-3) Y CÁNCER CERVICAL (CACU). B, SE OBSERVA EL INCREMENTO GRADUAL EN LA EXPRESIÓN DE HOXC⁹, EN TEJIDO SIN ALTERACIONES NEOPLÁSICAS LA EXPRESIÓN SÓLO SE PRESENTA EN LA REGIÓN BASAL DEL EPITELIO Y SU EXPRESIÓN INCREMENTA CONFORME LA PROGRESIÓN DE LESIONES PRECURSORAS Y CACU. EN LA GRÁFICA DE ABAJO SE MUESTRA LA CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DE HOXC⁹ MOSTRADA EN LA IMAGEN Y LA EXPRESIÓN DE HOXC¹² Y HOXD⁹, LOS CUALES NO PRESENTARON INCREMENTO PROGRESIVO EN SU EXPRESIÓN. BG, BAJO GRADO. AG, ALTO GRADO. EL ARTÍCULO COMPLETO SOBRE LA EXPRESIÓN DE HOXB² Y HOXB¹³ PUEDE SER CONSULTADO EN [WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/PUBMED/25743797](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25743797) Y LA TESIS SOBRE LA EXPRESIÓN DE HOXC⁹, HOXC¹² Y HOXD⁹ EN [HTTP://148.206.53.84/TESIUAMI/UAMI15759](http://148.206.53.84/tesiuami/uami15759). 17

FIGURA 6. REPROGRAMACIÓN GENÉTICA POR ONCOPROTEÍNA E7-VPH16. A) LA INTERACCIÓN DE E7 CON PROTEÍNAS DEL COMPLEJO POLYCOMB Y E2F6 FAVORECEN LA REPROGRAMACIÓN GENÉTICA GENERANDO UN NUEVO PATRÓN DE MODIFICACIONES DE HISTONAS (H3K27ME3) ADEMÁS DE LA ASOCIACIÓN DE E7 CON EL INCREMENTO EN EL NIVEL DE LAS HISTONA DESMETIL-TRANSFERASAS KDM6A/B COMO ACTIVADORAS DE LA CROMATINA EN LOS GENES HOX IDENTIFICADOS COMO GENES MAESTROS EN LA REGULACIÓN GENÉTICA COMO SE MUESTRA EN B Y C. C) LA PRESENCIA DE E6 – VPH16 PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE LAS DESMETILASAS DE HISTONAS KDM6A Y B LO CUAL TIENE IMPACTO EN PROLIFERACIÓN E IDENTIDAD CELULAR. LA IMAGEN DE A, COMO EL TEXTO COMPLETO DEL ARTÍCULO PUEDE SER CONSULTADO EN JVI.ASM.ORG/CONTENT/82/17/8695.FULL . LA IMAGEN DE C, FUE TRADUCIDA A PARTIR DEL TRABAJO DE MCLAUGHLIN EN 2011; WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/PUBMED/21245294	19
FIGURA 7. BLANCOS GÉNICOS DE HOX EN MAMÍFEROS. SE REPRESENTAN ALGUNOS DE LOS BLANCOS GÉNICOS DE LOS GENES HOX EN MAMÍFEROS Y EL PROCESO BIOLÓGICO CON EL CUAL SE RELACIONAN. TOMADO Y TRADUCIDO DE LA REVISIÓN DE SVINGEN Y TONISSEN 2006; WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/PUBMED/16721389	20
FIGURA 8. ANÁLISIS DE ANOTACIONES DE Ubx. FUNCIONES MOLECULARES ENRIQUECIDAS POR POSICIONAMIENTO DE Ubx EN DISCOS ALARES DE DROSOFILA. LA LISTA DE GENES DE CADA CATEGORÍA SE ENCUENTRA DISPONIBLES EN HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/GENO/WITHACCESSIONNUMBER GSE28778 . TOMADO Y MODIFICADO DE AGRAWAL, 2011	21
FIGURA 9. EXPRESIÓN DE HOXB13 Y HOXC9 EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CACU, HeLa Y CaSKI. A), ANÁLISIS DEL PORCENTAJE DE EXPRESIÓN NUCLEAR DE HOXB13 Y HOXC9 EN HeLa Y CaSKI A PARTIR DE 4 CAMPOS ÓPTICOS DE IMAGEN, EN CAFÉ SE MUESTRA LA EXPRESIÓN DE HOXB13 Y HOXC9 IDENTIFICADA POR EL SOFTWARE Y EN COLOR AZUL LA TINCIÓN POR HEMATOXILINA, SE SUMAN AMBOS CONTEOS Y SE DIVIDE ENTRE EL CONTEO CAFÉ, MEDIANTE EL USO DEL PROGRAMA IMAGEJ. EN B), ANÁLISIS DE DATOS OBTENIDOS DE LAS MICROFOTOGRAFÍAS QUE FUERON GRAFICADOS COMO EXPRESIÓN RELATIVA DE HOXB13 Y HOXC9. LAS LÍNEAS EN CADA BARRA REPRESENTAN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.....	31
FIGURA 10. GENES IDENTIFICADOS COMO POSIBLES BLANCOS GÉNICOS DE HOXB13, HOXC9 Y RNAPOL IIP EN HeLa. LAS GRÁFICAS MUESTRAN LOS GENES ENRIQUECIDOS POR POSICIONAMIENTO CADA INMUNOPRECIPITACIÓN REALIZADA CON LOS RESPECTIVOS ANTICUERPO HOXB13 (A), HOXC9 (B) Y RNAPOL II (C), EN HeLa, EL RECUADRO EN ROJO INDICA LOS GENES CONSIDERADOS COMO POTENCIALES BLANCOS GÉNICOS DE ACUERDO EL FDR, EN EL CASO DE HOXB13 (A) Y HOXC9 (B) <0.05 Y RNAPOL II<0.25 (C).	32
FIGURA 11. GENES IDENTIFICADOS COMO POTENCIALES BLANCOS GÉNICOS DE HOXB13 Y HOXC9 EN HeLa. LOS CÍRCULOS REPRESENTAN AL NÚMERO DE PROMOTORES IDENTIFICADOS CON PICOS DE FLUORESCENCIA QUE INDICAN POSICIONAMIENTO DE HOXB13 (CÍRCULO AZUL) Y HOXC9 (CÍRCULO NARANJA), RESPECTIVAMENTE, MEDIANTE EL ANÁLISIS CON VALORES DE FDR<0.05.	33
FIGURA 12. FUNCIONES MOLECULARES DE GENES BLANCO DE HOXB13 Y HOXC9. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE LOS PROGRAMAS DAVID-PANTHER. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P, PARA EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	34
FIGURA 13. PROCESOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS CON GENES BLANCO DE HOXB13 Y HOXC9. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	35
FIGURA 14. VÍAS MOLECULARES RELACIONADAS CON GENES BLANCO DE HOXB13 Y HOXC9. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS	

VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FIGURA 15. GENES IDENTIFICADOS COMO POTENCIALES BLANCOS GÉNICOS DE HOXB13 Y HOXC9 EN HELA DE MANERA DIFERENCIAL. DIAGRAMA DE VENN QUE INCLUYE EL NÚMERO DE GENES IDENTIFICADOS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE PICOS DE POSICIONAMIENTO EXCLUSIVOS PARA HOXB13 O HOXC9, ASÍ COMO GENES CON POSICIONAMIENTO COMPARTIDOS ENTRE AMBOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EMPLEANDO VALORES CON FDR<0.05.	37
FIGURA 16. FUNCIONES MOLECULARES DE GENES BLANCO DE HOXB13 Y HOXC9 DE MANERA DIFERENCIAL. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	39
FIGURA 17. PROCESOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS CON GENES BLANCO DE HOXB13 Y HOXC9 DE MANERA DIFERENCIAL. SE PRESENTAN GRÁFICAS CON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL POSICIONAMIENTO DE HOXB13, HOXC9 Y HOXB13/HOXC9. FUERON GENERADAS A PARTIR DE LOS DATOS OBTENIDOS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS VALORES NUMÉRICOS JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE DATOS.	40
FIGURA 18. VÍAS MOLECULARES RELACIONADAS CON GENES BLANCO DE HOXB13 Y HOXC9 DE MANERA DIFERENCIAL. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	41
FIGURA 19. GENES IDENTIFICADOS COMO POTENCIALES BLANCOS GÉNICOS DE HOXB13 Y HOXC9 EN CÉLULAS CaSKI. REPRESENTAN LOS PROMOTORES CON PICOS DE POSICIONAMIENTO DE HOXB13 Y HOXC9 RESPECTIVAMENTE CON VALORES DE FR<0.05.	42
FIGURA 20. FUNCIONES MOLECULARES DE GENES BLANCO DE HOXB13 Y HOXC9. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	44
FIGURA 21. PROCESOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS CON GENES BLANCO DE HOXB13 Y HOXC9. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	46
FIGURA 22. VÍAS MOLECULARES RELACIONADAS CON GENES BLANCO DE HOXB13 Y HOXC9. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	47
FIGURA 23. GENES IDENTIFICADOS COMO POTENCIALES BLANCOS GÉNICOS DE HOXB13 Y HOXC9 EN CaSKI DE MANERA DIFERENCIAL. DIAGRAMA DE VENN CON LOS GENES QUE FUERON IDENTIFICADOS CON PICOS DE POSICIONAMIENTO DE MANERA EXCLUSIVA POR HOXB13 O HOXC9 Y GENES CON POSICIONAMIENTO DE LOS DOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN CON VALORES DE FDR<0.05.	48
FIGURA 24. FUNCIONES MOLECULARES DE GENES BLANCO DE HOXB13 Y HOXC9. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	49
FIGURA 25. PROCESOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS CON GENES BLANCO DE HOXB13 Y HOXC9. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	51
FIGURA 26. VÍAS MOLECULARES RELACIONADAS CON GENES BLANCO DE HOXB13 Y HOXC9. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS	

VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	52
FIGURA 27. GENES IDENTIFICADOS COMO BLANCOS GÉNICOS DE HOXB13 Y HOXC9 DE MANERA DIFERENCIAL EN RELACIÓN AL TIPO VIRAL VPH16 Y VPH18. DIAGRAMAS DE VENN CON LOS GENES QUE FUERON IDENTIFICADOS CON PICOS DE POSICIONAMIENTO POR HOXB13 AL COMPARARSE EN BASE AL TIPO VIRAL, COMPARACIÓN ENTRE LOS BLANCOS DE HOXC9 DE ACUERDO A VPH16 (LÍNEA DE CÍRCULO EN AZUL), VPH 18 (LÍNEA DE CÍRCULO EN ROJO) Y COMPARACIÓN DE LA SUMA DE LOS BLANCOS DE HOXB13 Y HOXC9 EN RELACIÓN AL TIPO VIRAL. GENES CON POSICIONAMIENTO DE LOS DOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN CON VALORES DE FDR<0.05.	53
FIGURA 28. PROCESOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS CON GENES BLANCO DE HOXB13 EN RELACIÓN A VPH. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	54
FIGURA 29. FUNCIONES MOLECULARES DE GENES BLANCO DE HOXB13 EN RELACIÓN A VPH. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	56
FIGURA 30. VÍAS MOLECULARES RELACIONADAS CON GENES BLANCO DE HOXB13 EN RELACIÓN A VPH. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	57
FIGURA 31. PROCESOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS CON GENES BLANCO DE HOXC9 EN RELACIÓN A VPH. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	58
FIGURA 32. FUNCIONES MOLECULARES DE GENES BLANCO DE HOXC9 EN RELACIÓN A VPH. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	60
FIGURA 33. VÍAS MOLECULARES RELACIONADAS CON GENES BLANCO DE HOXC9 EN RELACIÓN A VPH. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	61
FIGURA 34. GENES BLANCO DE HOXB13 Y HOXC9 POTENCIALMENTE ACTIVOS POR POSICIONAMIENTO DE RNAPOL IIP. DIAGRAMA DE VENN CON LOS GENES QUE FUERON IDENTIFICADOS CON PICOS DE POSICIONAMIENTO DE MANERA EXCLUSIVA POR HOXB13 O HOXC9 Y GENES CON POSICIONAMIENTO DE LOS DOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y COMPARACIÓN CON LOS GENES IDENTIFICADOS CON POSICIONAMIENTO DE RNAPOL IIP. LOS VALORES DE FDR PARA LOS BLANCOS DE HOX ES <0.05 Y DE RNAPOL IIP <0.25.	62
FIGURA 35. VÍAS MOLECULARES RELACIONADAS CON GENES BLANCO DE HOXC9 POTENCIALMENTE ACTIVAS TRANSCRIPCIONALMENTE. SE GRAFICARON LAS ANOTACIONES ENRIQUECIDAS POR EL ANÁLISIS DE DAVID-PANTHER DE LOS GENES IDENTIFICADOS CON PICOS DE POSICIONAMIENTO PARA HOXB13, HOXC9 Y RNAPOL IIP. LOS VALORES JUNTO A LAS BARRAS REPRESENTAN EL VALOR DE P EN EL AGRUPAMIENTO DE CADA ANOTACIÓN.	63
FIGURA 36. ENSAYOS DE VALIDACIÓN DEL ENRIQUECIMIENTO EN SECUENCIAS PROMOTORAS COMO BLANCOS GÉNICOS DE HOXB13 Y HOXC9 EN LÍNEAS CELULARES DE CACU, HeLa Y CaSKI. EN A, SE MUESTRAN LA COMPARACIÓN ENTRE LOS VALORES DE AMPLIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL APARTIR DEL ADN INMUNOPRECIPITADO POR LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN HOXB13 Y HOXC9	

EN HELA Y CASKI RESPECTO AL ADN INPUT DE CADA LÍNEA CELULAR. B, COMPARACIÓN ENTRE EL ADN INMUNOPRECIPITADOS POR HOXB13, HOXC9 Y RNAPOL IIP EN HELA, SE OBSERVA UN MAYOR ENRIQUECIMIENTO DE RNAPOL IIP EN LAS SECUENCIAS PROMOTOR DE WNT2 Y KRAS EN CONTRASTE CON EL PROMOTOR DE HOXA5. C, MAPAS DE POSICIONAMIENTO EN LA REGIÓN PROMOTOR DE WNT1 GENERADO POR ANÁLISIS DE MICROARREGLOS DONDE SE OBSERVA EL ENRIQUECIMIENTO POR POSICIONAMIENTO DE HOXC9 EN HELA (BARRAS EN COLOR NARANJA) LO CUAL CONCUERDA CON LOS RESULTADOS MOSTRADOS EN EL INCISO A). EN D) SE PUEDE OBSERVAR EN EL PANEL SUPERIOR, ENRIQUECIMIENTO POR EL ADN INMUNOPRECIPITADO DE HOXB13 (BARRA EN ROJO) EN CONTRASTE CON EL INMUNOPRECIPITADO DE RNAPOL IIP DONDE NO SE OBSERVA ENRIQUECIMIENTO, LO CUAL CONCUERDA CON LOS RESULTADOS DE B..... 64

Lista de Tablas

TABLA 1 GENES HOX EN CÁNCER. SE PRESENTAN ALGUNOS EJEMPLOS DE GENES HOX RELACIONADOS CON CÁNCER DE DIFERENTE ORIGEN EPITELIAS ASÍ COMO EL EFECTO RELACIONADO A ESTOS GENES. PARA CONSULTAR LA TABLA COMPLETA ASÍ COMO EL TEXTO COMPLETO CONSULTAR EN HTTP://WWW.NATURE.COM/NRC/JOURNAL/V10/N5/ABS/NRC2826.HTML	13
TABLA 2. PROMOTORES DE GENES WNT IDENTIFICADOS COMO BLANCOS DE HOXB13 Y HOXC9 Y SU CLASIFICACIÓN EN LAS VÍAS CANÓNICA Y NO CANÓNICA. SE ENLISTAN LOS 19 GENES DELA FAMILIA WNT EN HUMANOS DE LOS CUALES 14 PRESENTARON PICOS DE POSICIONAMIENTO POR HOXB13, HOXC9 Y RNAPOL IIP. **PICOS CON VALORES DE FDR<0.05, *PICOS CON VALORES EN EL RANGO DE FDR>0.05 Y 0.25. EN ROJO SE INDICAN LOS GENES QUE YA HAN SIDO REPORTADOS EN EL MODELO DE CÁNCER DE CÉRVIX.	69

RESUMEN

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en México y el factor etiológico para su desarrollo es la infección persistente por VPH de alto riesgo. El CaCU es precedido por lesiones precursoras de bajo y alto grado. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se identificó el incremento gradual en la expresión de las proteínas HOXB13 y HOXC9 en lesiones precursoras y CaCU. Los genes HOX, son factores de transcripción relacionados con diferentes tipos de cáncer, y el incremento de expresión en CaCU, podría estar implicado en el desarrollo de la enfermedad, lo mismo que sus blancos génicos. Sin embargo se desconocen los blancos de estos factores de transcripción en el modelo de CaCU. Por lo que en este trabajo se identificaron los blancos génicos de HOXC9 y HOXB13 en líneas celulares derivadas de CaCU, HeLa (VPH18+) y CaSki (VPH16+), por medio de inmunoprecipitación de cromatina e hibridación en microarreglos de promotores. Se identificó el posicionamiento de HOXB13 en 549 y 517 secuencias promotoras en las líneas HeLa y CaSki respectivamente. HOXC9 se identificó en 2012 y 912 secuencias promotoras en las líneas HeLa y CaSki respectivamente. Las principales anotaciones enriquecidas por los genes blanco de HOXB13 y HOXC9 fueron factores de transcripción, polaridad y adhesión celular, las vías Cadherinas y WNT de los cuales, siendo más enriquecidos los blancos génicos de HOXC9. Los genes identificados fueron validados por medio de qPCR con lo cual podemos plantear que HOXB13 y HOXC9 ocupan regiones regulatorias de la transcripción en genes involucrados en las vías moleculares de WNT y cadherinas en líneas celulares de CaCU

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is the second leading cause of cancer death in women in Mexico and the etiological factor for development is the persistent infection with high-risk HPV. The CC is preceded by precursor lesions of low and high grade. In previous work in our laboratory we identified the gradual increase in Hoxc9 and HOXB13 protein expression related to progression of cervical cancer and precursor lesions. HOX genes, are transcription factors associated with different types of cancer, alterations in expression levels in cervical cancer, may be involved in development of the disease, therefore, this paper Hoxc9 gene targets were identified and HOXB13 CC cell lines using chromatin immunoprecipitation and Hoxc9 HOXB13 and microarray analysis of promoters in cell lines derived from cervical cancer, HeLa (HPV18 +) and CaSki (HPV16 +). HOXB13 positioning in promoter sequences 549 and 517 in lines CaSki and HeLa respectively identified. Hoxc9 was identified in 2012 and 912 promoter sequences in HeLa and CaSki lines respectively. The main annotations enriched genes targeted by Hoxc9 were HOXB13 and transcription factors, cell polarity and adhesion, cadherin and wnt pathways which, as many molecular pathways related genes were identified as targets Hoxc9 gene. The genes identified as gene targets HOXB13 and Hoxc9 by analysis micriarreglos were validated by qPCR with which we can argue that HOXB13 and Hoxc9 take regulatory regions of transcription of genes involved in molecular pathways of WNT and cadherins in cell lines CC..

INTRODUCCIÓN

Cáncer Cervico Uterino (CaCU)

A nivel mundial, el cáncer cervicouterino (CaCU) ocupa el tercer lugar en incidencia en mujeres¹ siendo más frecuente en países en vías de desarrollo². En México el CaCU ocupa el segundo lugar de mortalidad por cáncer en mujeres sólo después de cáncer de mama de acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud³.

El Virus de Papiloma Humano (VPH) es el factor etiológico para el desarrollo de CaCU, sin embargo no es suficiente para conducir el establecimiento de esta neoplasia⁴. La mayoría de las infecciones por VPH se resuelven por la respuesta inmune ante la infección en un lapso de 6 a 12 meses⁵. En algunos casos se ha determinado que la infección puede persistir generando lesiones precursoras de bajo grado, alto grado y CaCU, en un periodo aproximado de 10 años a partir de la infección viral⁶. Los tipos virales asociados al desarrollo de cáncer se consideran de alto riesgo oncogénico (VPHar) siendo los tipos más comunes VPH16 y 18, mientras que los de bajo riesgo (VPHbr) son asociados al desarrollo de lesiones benignas como verrugas, siendo los tipos VPH6 y VPH11 los más comunes⁷.

El VPH es un virus de DNA circular de doble cadena con longitud de aproximadamente 8 kb, contiene un marco de lectura de 6 genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) denominados así por su expresión en las etapas tempranas de la infección; dos genes tardíos (L1 y L2) codificantes para las proteínas de la cápside que se expresan en etapas tardías del ciclo infeccioso y una región larga de control (LCR).⁸

El potencial oncogénico de VPH está directamente relacionado con la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 de VPHar, las cuales, en infecciones persistentes aumentan su nivel de expresión. La principal causa de alteraciones en la regulación de las oncoproteínas, es debido al rompimiento del genoma viral en la secuencia codificante del gen E2 de VPHar y su posterior integración en el genoma del hospedero⁹ ya que la proteína producto del gen E2 es la responsable de reprimir la transcripción de E6 y E7. De este modo, la desregulación de E6 y E7 promueve la transformación celular. El principal mecanismo descrito por el cual E6 y E7 favorece el desarrollo de cáncer, es la interacción directa de E6 con p53 y el secuestro de pRB por parte de E7 para su degradación por proteosoma, esto trae como consecuencia la activación de genes involucrados al ciclo celular, blancos de E2F (inhibido en presencia de pRB) y la pérdida de p53 como supresor de tumor^{10 11} (Figura 1).

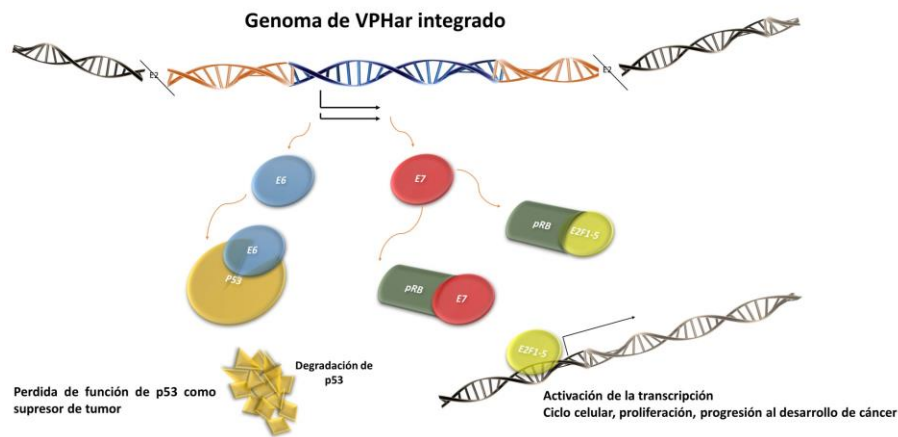


Figura 1. VPHar promueve alteración del ciclo celular por la inhibición de p53 y pRB. La integración del ADN viral en infecciones persistentes se da por la ruptura del genoma viral en la región codificante E2 que tiene la función de regular la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 promoviendo la progresión del ciclo celular al secuestrar a pRB y evitar la reparación del ADN mediante p53.

Alteraciones en la expresión de factores de transcripción se asocian con diferentes tipos de cáncer y CaCU

Además de la infección por VPH, existen alteraciones moleculares frecuentes en CaCU como las translocaciones, ganancias cromosómicas, mutaciones y alteraciones en el nivel de expresión a nivel ARN o proteína. Una de las aproximaciones para identificar genes involucrados en el desarrollo de cáncer se basa en identificar los genes cuya expresión este presente sólo en CaCU y ausente en epitelios sin alteraciones neoplásicas, o bien, genes con expresión significativamente superior en cáncer respecto a epitelios sin alteraciones neoplásicas. Con esto se ha logrado identificar grupos de genes que son activados sólo en cáncer, por tanto, potencialmente pueden estar relacionados en el desarrollo de la neoplasia. Ejemplo de algunos genes que incrementan su expresión en células transformadas respecto a células sin alteraciones neoplásicas son; CCND3, LRP5, TCF7, FZD3, E2F1, así mismo se han reportado genes que su expresión se ve disminuida en tumores respecto a tejido normal como es el caso de ESR1, ZNF447, CCND2, WNT7A, TCF3^{12 13}. En este sentido, la identificación de alteraciones en el perfil global de expresión y el uso de herramientas bioinformáticas han permitido agrupar estos a los genes, en vías moleculares relacionadas con la proliferación celular, adhesión celular y la vía de WNT y ciclo celular (figura 2). Dichas vías potencialmente están siendo alteradas en su regulación, favoreciendo el desarrollo de CaCU sin dejar de lado otras alteraciones moleculares como son mutaciones y alteraciones epigenéticas ^{14 15 16 17 18}.

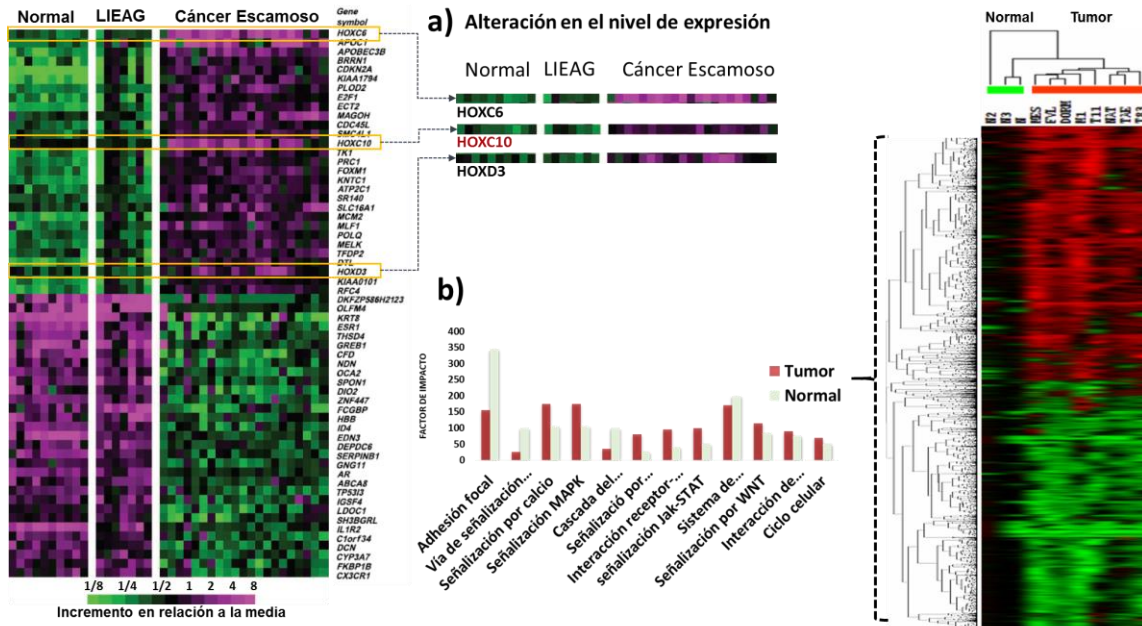


Figura 2. Alteraciones en el perfil de expresión en CaCU. a) Mapa de calor del análisis de expresión por microarreglos en tejido normal, lesiones precursoras de alto grado y CaCU, en amarillo son señalados HOXC6, HOXC10 y HOXD3 que fueron identificados como sobre expresados en CaCU en relación al tejido normal. Para mayor detalle en la información se puede consultar el artículo completo en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17974957>. b) A partir del análisis de expresión que se muestra a la derecha, los genes sobre expresados (rojo) y sub expresados (verde) en CaCU y fueron agrupados en vías moleculares por medio de KEGG, la imagen y el artículo completo pueden ser revisados en www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17822553. Tomados y modificados de a) Zhai, 2007 y b) Pérez, 2007.

Dentro del grupo de genes diferencialmente expresados se encuentran los factores de transcripción, los cuales pueden regular la expresión de múltiples genes involucrados en procesos celulares relacionados con el desarrollo de cáncer, entre ellos; ciclo celular, apoptosis, proliferación, crecimiento celular y reparación del daño al ADN. Se ha reportado que algunos de los oncogenes y genes supresores de tumor son factores de transcripción, cuyas alteraciones en su patrón de expresión son causadas por mutación o translocación y que estas alteraciones juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer^{19 20 21 22}. Ejemplo de ello es E2F como factor de transcripción el cual está relacionado con la regulación del ciclo celular, proliferación, diferenciación y desarrollo de distintos tipos de cáncer. E2F es

regulado negativamente por pRb mediante dominios de interacción proteína-proteína, mutaciones en este dominio en E2F o la pérdida en la expresión de pRb permiten que E2F se transloque al núcleo y promueva la progresión del ciclo celular^{23 24 25}.

Dentro de los factores de transcripción diferencialmente expresados en tejido tumoral respecto a tejido normal, se encuentran los factores de transcripción hormonales tales como el receptor de estrógeno (ER) en cáncer de mama⁵⁰ y el receptor de andrógenos (RA) en cáncer de próstata⁵¹. Otro grupo de factores de transcripción involucrados con el desarrollo de cáncer son las proteínas nucleares como JUN el cual puede ser fosforilado por cinasas y su fosforilación, promueve que sea activado como factor de transcripción. Un ejemplo más, son las proteínas STAT, estas pueden interactuar con proteínas modificadoras de histonas como p300 capaz de alterar la regulación transcripcional de los genes blanco de STAT²⁶. Alteraciones en la expresión de los factores de transcripción homeóticos como los genes HOX están relacionadas con el desarrollo de leucemias y tumores sólidos, entre ellos; cáncer de mama, colon, próstata, pulmón glioblastoma, tiroides, vejiga, ovario y riñón²⁷. En particular, en CaCU se han identificado varios miembros de la familia HOX cuya expresión a nivel de ARNm se ve alterada en lesiones precursoras de alto grado, cáncer e invasión, tal es el caso de los genes HOXB2, HOXB13, HOXC9, HOXC10, HOXC11, HOXC12^{28 29 30 31 32 33 34} sin embargo hasta el momento no se ha estudiado el impacto que puede tener la alteración en la expresión de estos genes.

Genes HOX

Los genes HOX son una familia de factores de transcripción que se expresan esencialmente durante el desarrollo embrionario y son conservados evolutivamente desde las esponjas hasta mamíferos³⁵. La descripción de estos genes se dio a partir de 1978 por Lewin, quien nombró complejo bitorax a los genes que controlan la segmentación torácica y abdominal en *Drosophila sp.*³⁶, posteriormente este grupo de genes se dividió en dos complejos, antenapedia y bitorax; el primer complejo asociado a la formación y desarrollo de la región anterior de *Drosophila sp.*, mientras que el segundo complejo se asocia al desarrollo posterior del organismo. Los 8 genes *Hox* de *Drosophila sp.* se encuentran en un solo *cluster* a diferencia del humano, donde existen 39 genes HOX ubicados en cuatro *clusters* con 9 a 13 genes cada uno, denominados *cluster -A, -B, -C y -D* en los cromosomas 7, 17, 2 y 12 respectivamente³⁷. Al igual que en *Drosophila sp.*, los genes HOX son subclasificados de acuerdo a su relación morfogénica y a su posición dentro de cada *cluster*, en genes anteriores (HOX1-8) y posteriores o abdominal B (HOX9-13)³⁸ (figura 3).

Los genes HOX pertenecen al grupo de genes Homeóticos debido a la presencia de un homeodominio conformado por tres alfa hélices que a su vez generan una estructura de hélice-giro-hélice en el extremo amino de la proteína. El Homeodominio es conformado por 60 aminoácidos altamente conservado en diferentes especies. A través del homeodominio, las proteínas HOX interactúan con el ADN en secuencias comunes (dominio TAAT) (figura 3), sin embargo la especificidad para reconocimiento de sus elementos de respuesta, se debe a la

interacción con co-factores de transcripción como las proteínas de la familia TALE, MEIS y PBX³⁹.

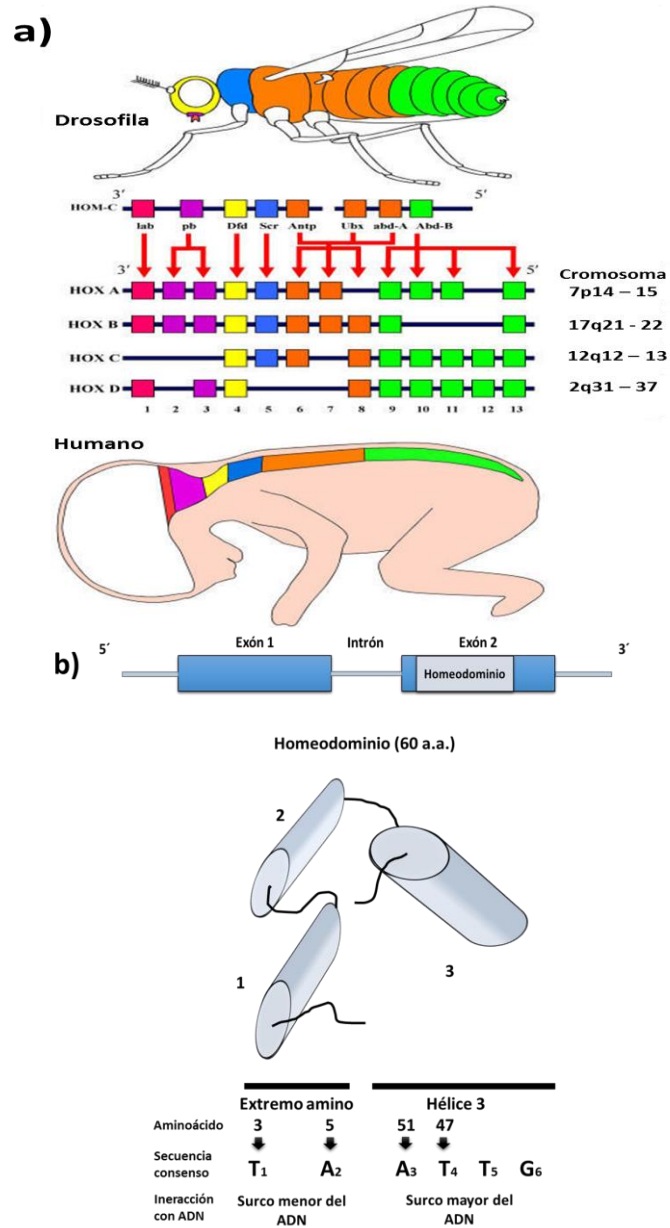


Figura 3. Estructura de los clusters y proteínas HOX. a) Homología del cluster *hox* en *Drosophila sp.* y humano, tomado y modificado de Lapping, 2006. b) Estructura de los genes HOX y las regiones y el homeodominio que reconoce la secuencia conservada TAATT por medio en los surcos mayor y menor de ADN, tomado y modificado de Svingen y Tonissen, 2006. La revisión completa puede ser consultada en www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16721389.

Específicamente, los genes Abdominal B del cromosoma 7 o cluster A (HOXA9, HOXA10, HOXA11 y HOXA13), participan en el desarrollo embrionario de estructuras genitales y reproductivas femeninas, además, su expresión continúa en la vida adulta con el mismo patrón que durante el desarrollo embrionario⁴⁰, sin embargo la expresión y regulación de los genes HOX de otros *clusters* (B, C y D) en el desarrollo embrionario como en la etapa adulta, es poco descrita. Actualmente, se sabe que la expresión de los genes HOX durante el desarrollo, es altamente regulada de manera espacio-temporal por modificaciones epigenéticas por medio de los complejos Polycomb (PC) y Trithorax (TX) como reguladores clásicos de los genes Homeóticos^{41 42}.

Activación y represión de los genes HOX por Policomb y Tritorax

La compactación de la cromatina es un mecanismo mediante el cual se puede regular la expresión de genes, de manera general se conocen dos procesos para llevar a cabo esta regulación; las modificaciones postraduccionales de las histonas y el remodelamiento de la cromatina por medio de ATP. Con estos mecanismos la célula es capaz de asegurar la regulación de grupos completos de genes sin modificar la información genética a lo largo de generaciones celulares, a este proceso se le denomina memoria epigenética. Los complejos PC y TX participan en el mantenimiento del patrón de expresión de los genes, favoreciendo la compactación y relajación de la cromatina por la modificación de histonas en diferentes aminoácidos lo cual genera un código de activación y represión (código de histonas). Como se mencionó, los genes HOX son genes en *cluster* que se

expresan de manera organizada, temporal y espacialmente, este patrón de expresión es mediado por los complejos PC y TX^{43 44 45}.

En mamíferos se conocen dos principales complejos del grupo PC, Polcomb Repressive Complex 1 y 2 (PRC1 y PRC2). Las proteínas esenciales para el funcionamiento de PRC1 son: PCGF, CBX, PHC, SCML, L3MBTL y RING1, de las cuales RING1 posee la función de ubiquitin-ligasa sobre el residuo de Lisina 119 de la histona H2A (H2AK119ub), cuya marca es asociada a genes inactivos por compactación de la cromatina. Respecto a PRC2, las proteínas principales del complejo son: SUZ12, EDD, EZH1 y EZH2, estas últimas involucradas con la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3). El mecanismo general mediante el cual los dos complejos favorecen la compactación de la cromatina es por el reconocimiento de secuencias con dinucleótidos CpG metilados en el ADN por parte de PRC2, lo cual permite el marcaje de H3K27me3 en las histonas asociadas al ADN, esta marca posteriormente es reconocida por PRC1 que se encarga de mantener el estado represivo por la ubiquitinación de la lisina 119 de la histona 2A. Por su parte el complejo TX se encuentra conformado principalmente por las proteínas SWI/SNF, NURF y MLL1-3. De manera general se plantea que SWI/SNF y NURF favorecen el reclutamiento de factores de transcripción mediante el desplazamiento de nucleosomas por medio del consumo energético de ATP, mientras que MLL (enzima con actividad de histona metil-transferasa) promueve la relajación de la cromatina a través de la trimetilación del residuo 4 de lisina en la histona 3 (H3K4me3), en consecuencia promueve la activación de los genes situados en esa región citogenética de la cromatina, tal como ocurre en las regiones cromosómicas donde se encuentran los genes HOX^{43 44 45} (figura 4).

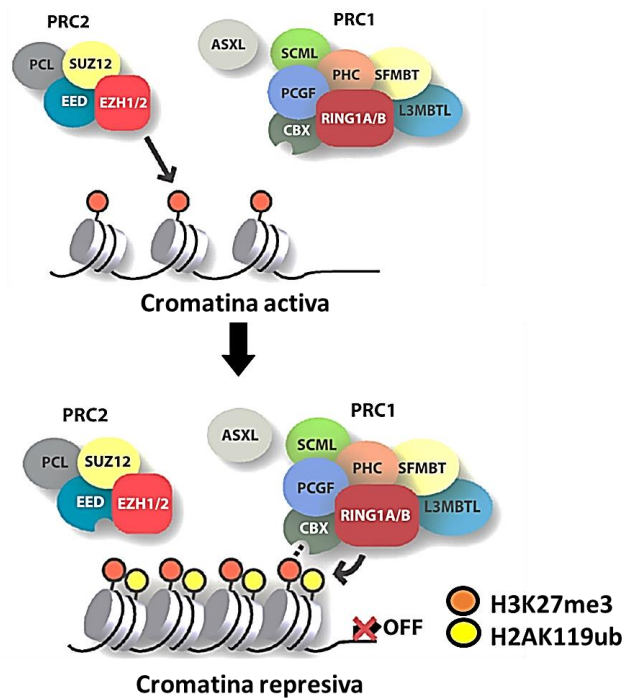


Figura 4. Función de Polycomb en la represión por compactación de cromatina. Representación de la función represora de la cromatina por Polycomb mediante modificaciones de histonas para generar el silenciamiento de la cromatina y represión de la transcripción. PRC2 reconoce secuencias de dinucleótidos CpG metilados para establecer la marca de histonas H3K27me3 que sirve posteriormente como señal de reconocimiento para PRC1 que establece la marca de represión H2K119ub en la cromatina. La imagen fue editada y puede ser consultada al igual que la revisión completa sobre la función de polycomb en <http://www.nature.com/nsmb/journal/v20/n10/full/nsmb.2669.html>

Alteraciones moleculares en los genes HOX en cáncer

Alteraciones moleculares en los genes HOX (HOXA1, HOXA2, HOXA11, HOXA13, HOXC13, HOXD4, HOXD10 y HOXD13) entre ellas mutaciones germinales, se asocian al desarrollo de síndromes y malformaciones. Por ejemplo, la inserción 175-176insG en HOXA1 se relacionan con el síndrome de Bosley-Salih-Alorani, el cual es característico por la pérdida en la motilidad ocular, malformaciones en el oído interno, anormalidades cerebrovasculares y alteración en las capacidades cognitivas⁴⁶. Mientras que en el caso de HOXD13 la expansión de codones de

alanina en el extremo terminal se asocia con la sinpolidactilia, cuyos individuos portadores presentan la unión tisular entre los dedos de los pies y/o manos⁴⁷.

Por otra parte, incremento en la transcripción de genes HOX (HOXA4, HOXA5, HOXA7 HOXA9, HOXA10 y HOXD13) y translocaciones están asociadas con leucemias. HOXA9 y la nucleoporina nup98 forman una proteína quimérica debida a la translocación t(7-11)(p15-p15), cuya proteína promueve la actividad transcripcional de genes como HOXB6, HOXC6 y HEY1, además, su expresión se asocia con el incremento en la proliferación y supervivencia celular en Leucemia Mieloide Aguda (AML)⁴⁸. Adicionalmente alteraciones en el perfil transcripcional por activación o inactivación de los genes HOX se encuentra relacionada con el desarrollo de cáncer en diferentes órganos y epitelios (HOXA1, HOXA5, HOXA7, HOXA10, HOXB2, HOXB5, HOXB6, HOXB8, HOXB9, HOXC4, HOXC5, HOXC6, HOXC8, HOXC9, HOC10, HOXC11, HOXC13 y HOXD13), entre los cuales destacan algunos tipos de cáncer más estudiados como cáncer de próstata, mama, pulmón y colon. Algunos ejemplos se muestran en la tabla 1.

Tipo de tumor	Gen HOX	Cambio en gen HOX	Efecto
Cáncer de pulmón	Genes HOX 5' -HOXD, HOXA1, HOXC5, HOXA7 y HOXA9	Sobre - expresión	Asociado con tumores primarios
Neuroblastoma	HOXD1, HOXD8, HOXC6, HOXC11 y HOXC9	Expresión y reducción en el nivel de expresión	Expresados en células susceptibles a diferenciación
Cáncer de próstata	HOXB13	Reducción en el nivel de expresión	Pérdida de la diferenciación, la co-expresión con AR se asocia a la proliferación celular
Cáncer de mama	HOXA5, HOXB13 y HOXA10	Desregulación epigenética por metilación del promotor	Se asocia con la desregulación de p53 en tumores primarios
Leucemia	HOXA9, HOXA10, HOXC6 y HOXA9	Sobre - expresión por translocaciones	Indicados de mal pronóstico en AML. Promueve proliferación la proteína de fusión NUP98-HOXA9
Cáncer cervicouterino	HOXC10- HOXC13	Sobre- expresión	Asociado a tumores primarios y a invasión

Tabla 1 Genes HOX en Cáncer. Se presentan algunos ejemplos de genes HOX relacionados con cáncer de diferente origen epitelias así como el efecto relacionado a estos genes. Para consultar la tabla completa así como el texto completo consultar en <http://www.nature.com/nrc/journal/v10/n5/abs/nrc2826.html>.

Adicionalmente la sustitución de residuos de amino ácidos como Glicina por Ácido glutámico G84E en HOXB13 se ha encontrado en pacientes con diagnóstico temprano de Cáncer de próstata (CP). Dicha mutación G84E se localiza en el dominio de interacción de HOXB13 con su co-regulador MEIS y se relaciona con la progresión y agresividad del tumor⁴⁹. También, se ha reportado que HOXB13 participa como co-regulador del Receptor de Andrógenos por la interacción proteína-proteína favoreciendo la expresión y represión de genes relacionados con proliferación y migración en líneas celulares de CP.

A partir de ensayos de expresión de genes reportero, mediante el uso de los respectivos elementos de respuesta mutados de AR y HOXB13 (ARE-mut y HOXRE-mut) los autores proponen tres mecanismos por los cuales se logra la colaboración entre HOXB13 y AR para regular sus blancos génicos. El primer mecanismo es el colaborativo, en el cual los dos factores de transcripción se unen a sus elementos de respuesta dentro de la secuencia del mismo gen, como sucede en TMPRSS2 y NKX3.1. El segundo mecanismo es el de atadura o cebo, el cual consiste en el reconocimiento del dominio HOXRE por HOXB13, esto sirve como señal para el reclutamiento de RA en genes como ORM1. Por último, el tercer mecanismo propuesto es el represivo, en el cual HOXB13 se une al dominio de interacción de ADN de AR, evitando así, que AR sea capaz de reconocer sus elementos de respuesta y de este modo no se logre la activación de genes blanco de AR como PSA, STEAP4 y FASN⁵⁰.

En cáncer de mama se ha estudiado a HOXB13 y se ha demostrado que activa la transcripción de Interleucina-6 (IL6) y reprime la expresión del Receptor de

Estrógenos alfa (ESR1), por su interacción directa con los promotores de estos genes. Con ensayos de resistencia fármacos en cultivos celulares y xenotransplantes, se observa que la represión de ESR1 por HOXB13 genera resistencia a tratamiento con Tamoxifeno (TAM) y la expresión de IL6 promueve la activación de la vía AKT-mTOR, favoreciendo de este modo la proliferación celular y el reclutamiento de fibroblastos⁵¹.

En CaCU se ha identificado un grupo de genes HOX cuya expresión a nivel de ARNm es sobre activada en cáncer en contraste con el tejido normal: HOXB13, HOXC9, HOXC11, HOXC12, HOXC13, HOXD9 y HOXD10, mientras que la expresión de los genes HOXA_{AbdB} del clúster A (HOXA9, HOXA10, HOXA11 y HOXA13) no mostró diferencias en la expresión en CaCU respecto a epitelio normal^{31 32}.

Genes HOX en cáncer CaCU y regulación de su expresión

A la fecha son escasos los trabajos donde se ha estudiado a los genes HOX en CaCU, mientras que la mayoría de los trabajos se enfocan en describir perfiles de expresión del tumor respecto de su epitelio adyacente libre de alteraciones neoplásicas^{28 29 30 31 32 33 34}.

En contraste, en el trabajo realizado por Zhai en 2007 se analiza funcionalmente la participación de HOXC10 en el proceso de invasión de la línea celular HeLa derivada de CaCU. A partir del análisis masivo de expresión por microarreglos, comparando muestras de tejido normal, lesiones precursoras de alto grado y tumor de cáncer cervical escamoso: Se identificó el incremento significativo en el nivel de expresión de HOXC10, cuyo resultado fue validado por qRT-PCR e hibridación *in-*

situ, mientras que funcionalmente, a través de ensayos de transfección de la secuencia codificante de HOXC10 (en células Hela), se demostró incremento en la formación de colonias así como incremento en la capacidad de invasión¹⁶.

Cabe mencionar que han sido publicados solo 2 trabajos que abordan la participación de factores de transcripción HOX en CaCU ^{16 33} En nuestro laboratorio, se realizó el análisis en la expresión de diferentes proteínas HOX en microarreglos de tejidos de lesiones precursoras de bajo grado, alto grado y CaCU. Con lo cual se observó el incremento gradual en la expresión de las proteínas HOXB2, HOXB13 y HOXC9 de acuerdo a la progresión de la neoplasia (figura 5) ³⁴

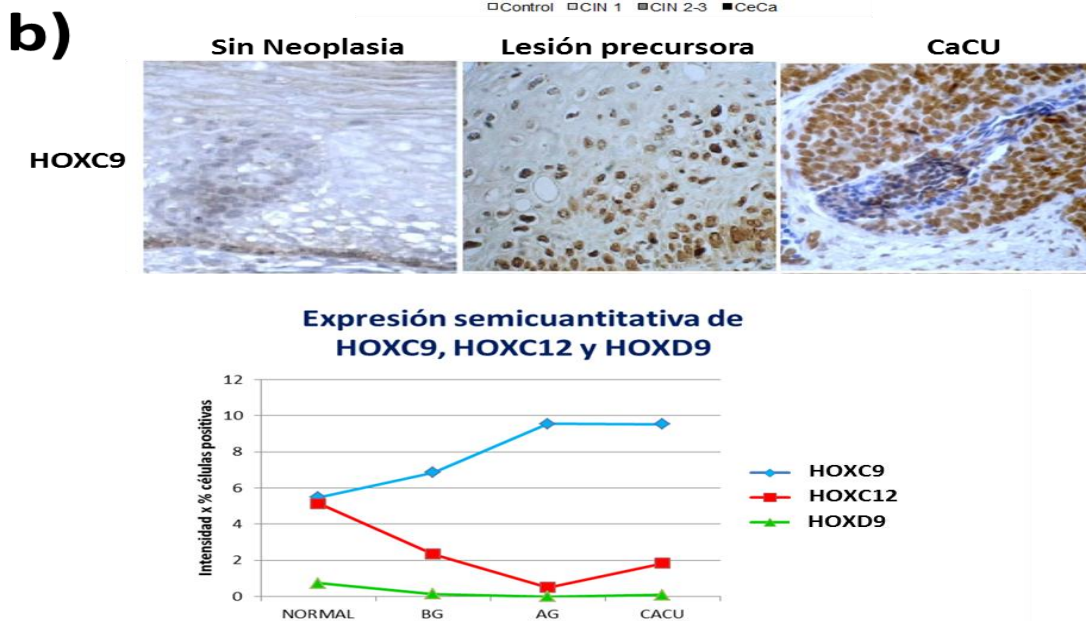
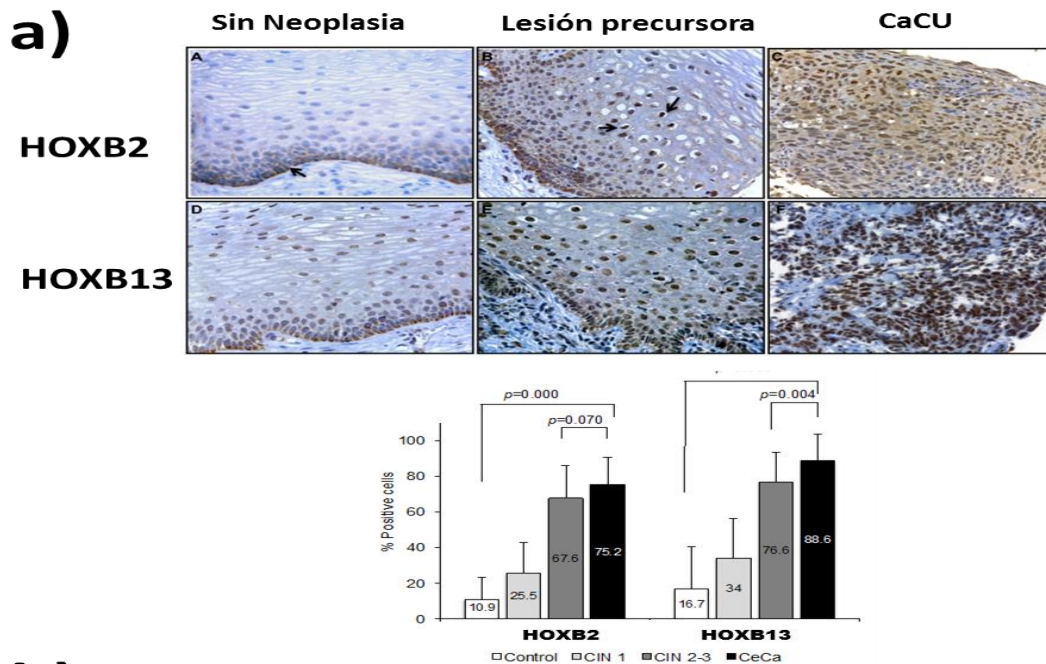


Figura 5. Expresión de las proteínas HOX en lesiones cervicales y CaCU. a), en las imágenes de epitelios se muestra el incremento en la expresión de HOXB2 y HOXB13, las gráficas representan la cuantificación relativa de expresión, en epitelio sin neoplasia (control), neoplasia intraepitelial cervical I (NIC1), neoplasia intraepitelial cervical II-III (NIC 2-3) y cáncer cervical (CeCa). b), se observa el incremento gradual en la expresión de HOXC9, en tejido sin alteraciones neoplásicas, la expresión sólo se presenta en la región basal del epitelio y su expresión incrementa conforme la progresión de lesiones precursoras y CaCU. En la gráfica de abajo se muestra en la expresión relativa de HOXC9 mostrada en la imagen así como la expresión de HOXC12 y HOXD9, los cuales no presentaron incremento progresivo en su expresión. BG, bajo grado. El artículo completo sobre la expresión de HOXB2 y HOXB13 puede ser consultado en www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25743797 y la tesis sobre la expresión de HOXC9, HOXC12 y HOXD9 en <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI15759>.

Algunas de las aproximaciones metodológicas que se han realizado para identificar la alteración en el patrón de expresión de los genes HOX en CaCU han sido estudiar su regulación por medio del complejo represivo Policomb (CRP) ya que como se mencionó con anterioridad, los genes HOX son regulados transcripcionalmente a nivel de cromatina por medio de modificaciones en las histonas a través del complejo Policomb. En este sentido, se ha demostrado el incremento en el nivel de expresión de la histona metil transferasa EzH2 (sub-unidad enzimática del complejo Policomb) en CaCU por la presencia de la oncoproteína E7 de VPH16⁵³, sin embargo, al evaluar la presencia de la marca H3K27me3 generada por EzH2 en queratinocitos de prepucio de humano transfectados con la secuencia codificante de E7, el incremento en la expresión de EzH2 no se asocia con el efecto esperado de su actividad enzimática, ya que se observó disminución en la marca represiva de histonas H3K27me3. De manera conjunta, también en queratinocitos, se reportó que en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH16, se promueve el incremento en la expresión de las des-metilases de histonas KDM6A y KDM6B⁵⁴ (figura 6). Los autores de estos trabajos plantean que la infección por VPHar puede generar alteraciones en el patrón de expresión de los genes HOX en el modelo de CaCU por la sobre expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7, lo cual puede generar como consecuencia, alteraciones en la regulación de los genes HOX a nivel de cromatina por la inactivación de EzH2 y la activación de KDM6A y KDM6B, ya que al evaluar la expresión de los 39 genes HOX a nivel de ARNm por RT-PCR, se identificaron diferencias en el perfil de expresión de los genes HOX. Los genes que presentaron mayores diferencias en su expresión en presencia de las oncoproteínas virales E6 y E7 respecto células sin las oncoproteínas fueron;

HOXA1-HOXA7, HOXA9-HOXA11, HOXB1, HOXB4, HOXB9, HOXC4-HOXC6, HOXC8, HOXC11, HOXC12 y HOXD10⁵⁵.

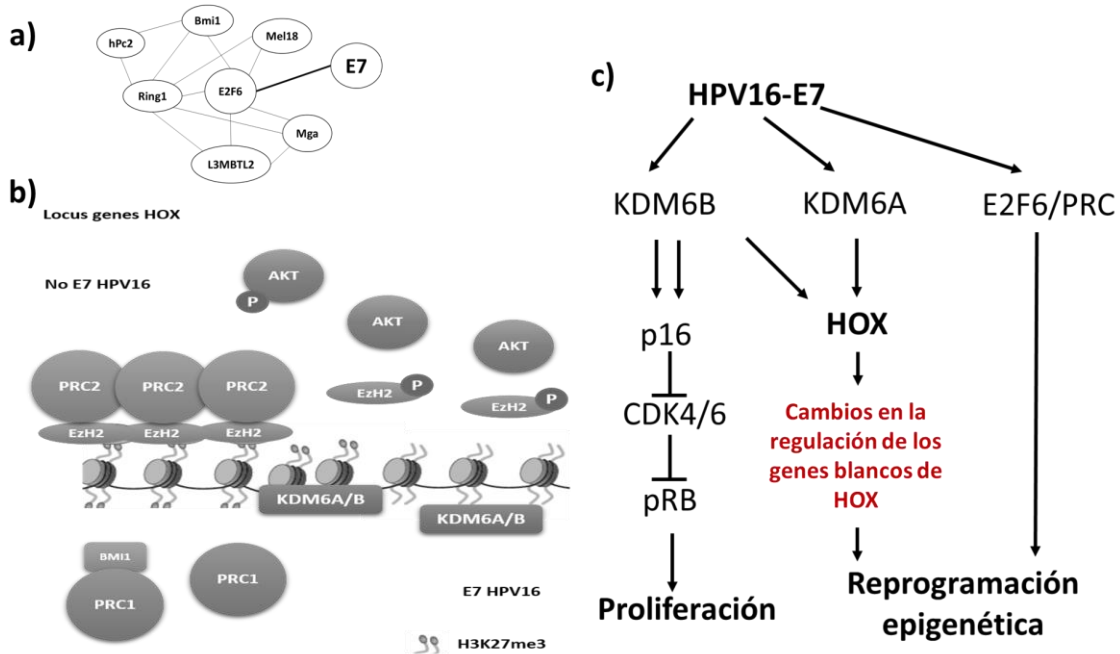


Figura 6. Reprogramación genética por oncoproteína E7-VP16. a) La interacción de E7 con proteínas del complejo Polycomb y E2F6 favorecen la reprogramación genética generando un nuevo patrón de modificaciones de histonas (H3K27me3) además de la asociación de E7 con el incremento en el nivel de las histona desmetil-transferasas KDM6A/B como activadoras de la cromatina en los genes HOX identificados como genes maestros en la regulación genética como se muestra en b y c. c) La presencia de E6 – VP16 promueve la activación de las desmetilasas de histonas KDM6A y B lo cual tiene impacto en proliferación e identidad celular. La imagen de a, como el texto completo del artículo puede ser consultado en jvi.asm.org/content/82/17/8695.full. la imagen de C, fue traducida a partir del trabajo de McLoughlin en 2011; www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245294.

Blancos génicos de HOX

Los genes HOX son factores de transcripción involucrados en la regulación de diferentes procesos biológicos como organogénesis, diferenciación morfológica, ciclo celular, adhesión y migración celular principalmente durante el desarrollo embrionario, aunque su expresión también se mantiene en etapas adultas de manera localizada tejido específico. En cáncer, alteraciones en la expresión de los

genes HOX respecto al tejido normal, se han relacionado con angiogénesis, invasión celular y alteraciones en el ciclo celular (figura 7)⁵⁶. La mayoría del conocimiento sobre los blancos génicos de HOX se relaciona al desarrollo embrionario^{57 58} y es poco lo que se sabe al respecto de los genes que regulan en humanos y en particular en cáncer.

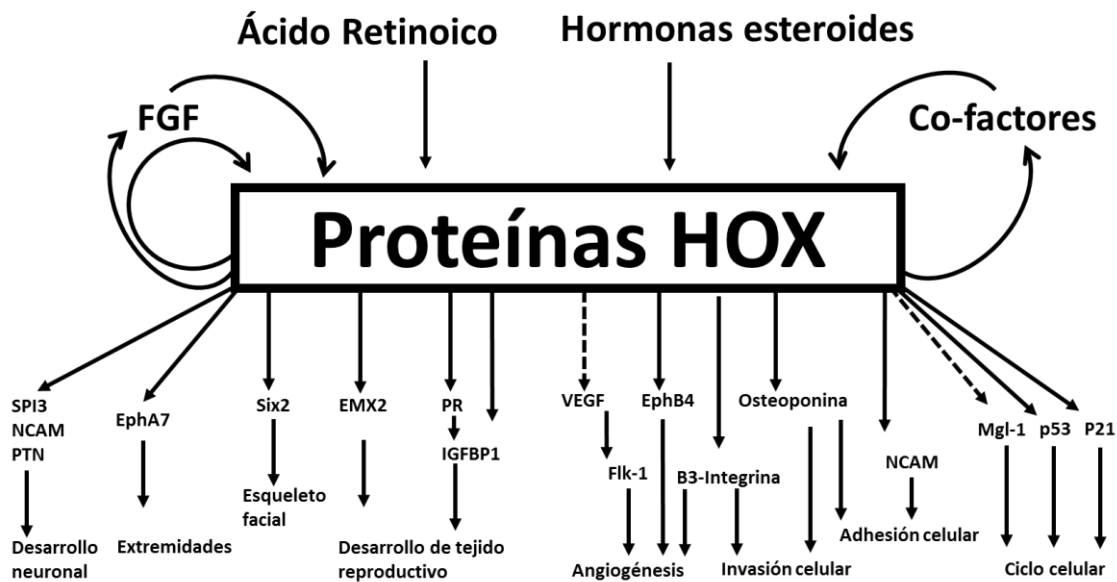


Figura 7. Blancos génicos de HOX en mamíferos. Se representan algunos de los blancos génicos de los genes *hox* en mamíferos y el proceso biológico con el cual se relacionan. Tomado y traducido de la revisión de Svingen y Tonissen 2006; www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16721389.

En *Drosophila sp.* se han identificado los blancos génicos de la proteína Ultrabitorax (Ubx) por ChIP-chip en las células del disco alar del tercer estadio larval. Al realizar el análisis de las funciones moleculares enriquecidas por los blancos de Ubx se encuentran entre las principales: enzimas metabólicas, genes involucrados en la regulación de la transcripción y traducción de ARNm, así como genes de las vías Wnt, Notch y EGFR. De acuerdo a la función celular, ciclo celular y reparación por daño a DNA, proliferación – apoptosis, citoesqueleto, adhesión celular, transporte

celular y fagocitosis son las principales anotaciones relacionadas a los blancos génicos de Ubx⁵⁹ (figura 8).

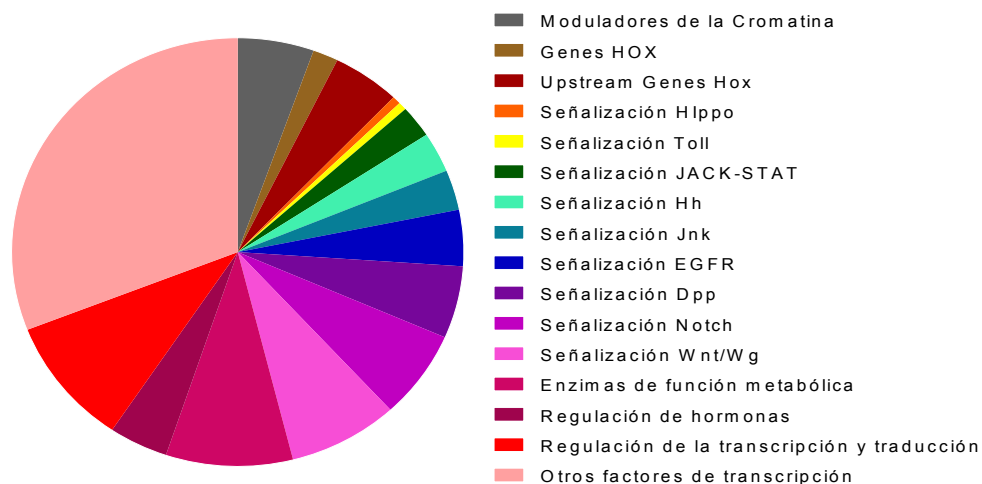


Figura 8. Análisis de anotaciones de Ubx. Funciones moleculares enriquecidas por posicionamiento de Ubx en discos alares de drosophila. La lista de genes de cada categoría se encuentra disponibles en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/with accession number GSE28778>. Tomado y modificado de Agrawal, 2011

En embriones de ratón de 13.5 días se identificó que Hoxc9 regula la diferenciación de neuronas motoras las cuales durante el desarrollo embrionario proyectan sus axones de la medula espinal hacia los músculos y glándulas. Esta regulación implica el posicionamiento de Hoxc9 sobre la región anterior de los *clústeres* Hoxa y Hoxc, en particular de Hox4 – 6 promoviendo su represión. En contraste, en ratones mutantes Hoxc9 *-/-* se observó la desorganización de los axones de las neuronas motoras y el incremento en la expresión de Hox4 – 6⁶⁰.

En cuanto a los blancos génicos de HOX en cáncer, se han identificado los blancos génicos de HOXC9 en la línea celular BE derivada de neuroblastoma por medio de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina para HOXC9 y secuenciación masiva del ADN inmunoprecipitado (ChIP – seq) y análisis de expresión por micro arreglos de expresión para identificar los genes regulados por HOXC9. 4,992 genes

presentaron enriquecimiento de lecturas por secuenciación, de los cuales, 879 se clasificaron como sobre expresados y 1491 sub expresados. Por medio de herramientas como *Database for Annotation Visualitation and Integrated Discovery* (DAVID), *GeneOntoly* (GO) y *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) se realizó el análisis de anotaciones de los genes sobre y sub expresados con lecturas por posicionamiento de HOXC9, con lo cual se determinó que los procesos biológicos como ciclo celular, reparación del ADN y la diferenciación neuronal son potencialmente regulados por HOXC9 en neuroblastoma mediante la regulación de genes como CDC45L, MCM3, CCNB1, CDCA8, FANCM, FEN1, ASCL1, GFRA3, RET y NTN3, entre otros. Adicionalmente en este trabajo se revisó el papel de E2F6 como co-regulador de HOXC9 favoreciendo la represión de genes relacionados con el ciclo celular y la diferenciación en la línea celular BE de neuroblastoma⁶¹.

En cuanto a HOXB13 no hay reportes globales de sus genes blanco, sin embargo un estudio realizado con su gen parálogo HOXA13 en 2008 por Rinn y colaboradores, permitió analizar el perfil de expresión de fibroblastos primarios derivados de pie e ingle de humano por medio de micro arreglos de expresión enfocándose principalmente en un grupo de 44 genes previamente identificados por su grupo cómo genes que se expresan en regiones distales. En el mismo modelo celular se llevaron a cabo ensayos de CHIP – chip de HOXA13 en microarreglos de promotores. De este modo lograron identificar los potenciales blancos génicos de HOXA13 que estuvieran siendo regulados de manera positiva o negativa de acuerdo a los datos obtenidos de los micros arreglos de expresión. Algunos de los blancos identificados fueron; HOXA13, HOXB6, BMP2, y MAB21L1. Dentro de los datos obtenidos, sobresale la correlación en la expresión de HOXA13 y WNT5A, este

último a pesar de no ser reconocido como gen blanco de HOXA13, es parte del grupo de 44 genes relacionados con el desarrollo de regiones distales, por tanto los autores plantean que WNT5A es un gen regulado indirectamente por HOXA13 que participa en el desarrollo de estructuras distales durante el desarrollo⁶².

A pesar de la constante generación de información sobre los genes regulados por los genes HOX aún permanecen sin ser identificados los blancos génicos y el efecto biológico de la alteración en la expresión de estos genes además de su posible participación en el desarrollo de cáncer, particularmente en CaCU.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A la fecha la mayor parte del conocimiento que se tiene sobre los blancos génicos de los genes HOX ha sido generado a través de su estudio durante el desarrollo embrionario, donde se ha demostrado su importancia en la regulación de múltiples procesos biológicos. En las últimas dos décadas, se han identificado modificaciones en el perfil de expresión de algunos miembros de la familia HOX en distintos tipos de Cáncer, así como en CaCU. En nuestro grupo de investigación se ha realizado el análisis en la expresión de algunas proteínas HOX en biopsias de lesiones precursoras de bajo, alto grado y CaCU con lo cual, se ha logrado identificar el incremento gradual en la expresión de HOXB13 y HOXC9 conforme la progresión de lesiones precursoras y CaCU. Sin embargo se desconocen los blancos génicos de estos dos factores de transcripción y cuáles son los procesos biológicos que pueden ser afectados por la alteración en la expresión de HOXB13 y HOXC9 en tejido tumoral respecto a tejido libre de alteraciones neoplásicas.

Con base a lo anterior en este trabajo se pretende identificar los genes potencialmente regulados por estos dos factores de transcripción mediante el análisis genómico por microarreglos de promotores y de este modo contribuir al conocimiento de los posibles mecanismos moleculares asociados con el desarrollo de CaCU.

OBJETIVO GENERAL

- Identificar los genes potencialmente regulados por los factores de transcripción HOXC9 y HOXB13 en líneas celulares de CaCU.

Objetivos particulares

1. Identificar a las proteínas HOXB13 y HOXC9 en líneas celulares derivadas de CaCU.
2. Identificar los blancos génicos de los factores de transcripción HOXC9 y HOXB13 en líneas celulares derivadas de CaCU.
3. Identificar los blancos génicos susceptibles de regulación por HOXC9 y HOXB13, así como los blancos diferencialmente regulados.
4. Identificar los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 potencialmente activos.
5. Identificar si existen diferencias en los blancos génicos de acuerdo al tipo viral presente (VPH16 y 18).
6. Realizar la validación de los genes blanco más significativo mediante Chip-PCR.

METODOLOGÍA

Inmunocitoquímica

A partir de citologías en capa fina de líneas celulares HeLa y CaSki donadas por el Dr. Alberto Monroy García (UIMEO-Centro Médico Siglo XXI) colocadas en *spots*, se realizó la cuantificación relativa de la expresión de las proteínas HOXC9 y HOXB13 por medio de inmunohistoquímica utilizando el sistema automatizado de VENTANA (ROCHE). Se utilizaron los anticuerpos HOXC9 (Santa Cruz, sc-82913) en la dilución 1:200, para HOXB13 (Santa Cruz, sc-28333) dilución 1:50. De cada *spot* se obtuvieron 4 fotografías de distintos campos, las cuales, fueron analizadas con el software ImageJ considerando el promedio de cuatro campos ópticos (40x, Leica DM750) de cada *spot* de células. Se realizaron cultivos de 1×10^7 células. Estas líneas celulares ya han sido certificadas por la ATCC en octubre de 2013. Las células HeLa son derivadas de adenocarcinoma con VPH18, CaSki, son células derivadas de cáncer escamoso de cérvix con VHP16.

Fragmentación de cromatina

Se realizó fragmentación de cromatina a partir de 10 millones de células, para el entrecruzamiento de la cromatina durante 10 minutos, utilizando 10ml PBS 1x con 270µl de formaldehído (concentración final 1%). La reacción de entrecruzamiento se detuvo agregando 0.98g de glicina (SIGMA ALDRICH) para mantener una concentración final de 0.125M. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS1x estéril para retirar los restos de formaldehído y glicina. Finalmente para recuperar las células, se agregaron 5ml de PBS 1x a cada caja de cultivo con el fin de recuperar las células utilizando un *scraper*. Las células obtenidas se

centrifugaron durante 10 minutos a 4000rpm, se retiró el sobrenadante y el botón de células fue re-suspendido en 600µl de buffer de lisis celular (HEPES-KOH 50mM pH 7.5, NaCl10mM, EDTA 1 mM pH8, Triton x-100 1%, Deoxicolato de Sodio 0.1% y SDS 0.1%) para posteriormente colocar las muestras en hielo y realizar la fragmentación de cromatina, aplicando 20 pulsos de 15 segundos con amplitud de onda de 60% y descansos de 10 segundos entre cada pulso con sonicador (Vibra Cell), de este modo se obtuvieron fragmentos de ADN en el rango de 200 –1000 pb. Se tomó una alícuota de cromatina fragmentada en dilución 1:100 para utilizarse posteriormente como Input para la posterior hibridación en micro arreglos de cada línea celular y se almacenó a -20°C.

Inmunoprecipitación de cromatina

Se realizó inmunoprecipitación de cromatina con 2µg de anticuerpo, HOXC9 (Santa cruz, sc-8293) y HOXB13 (Santa cruz, sc-28333) con el kit de Millipore EZ MagnaChip (Millipore, 17-409) incubando a 4°C durante la noche de acuerdo a las instrucciones de fabricante a partir del equivalente a 10µg de cromatina de cada línea celular, HeLa y CaSki. En el caso de la línea celular Hela se realizó adicionalmente la Inmunoprecipitación de RNAPol II utilizando el anticuerpo Anti-RNAPol IIP que es capaz de reconocer la RNA polimerasa con el extremo carboxilo fosforilado en residuo 5 de serina (04-1571, Millipore) mismo que se asocia al estado activo de la enzima. Se llevó a cabo la cuantificación del ADN inmunoprecipitado del cual se tomaron 30ng para realizar la validación del experimento mediante PCR punto final con primers GAPDH (Millipore).

Amplificación genómica del DNA inmunoprecipitado

A partir de 10ng de DNA inmunoprecipitado se realizó la amplificación genómica completa mediante el sistema WGA1 (SIGMA, WGA1-50RXN) para su posterior re-amplificación genómica completa por WGA3 (SIGMA, WGA3-50RXN). El producto de inmunoprecipitación re-amplificado se dividió en alícuotas de 1µg de DNA y se almacenó a -20°C.

Marcaje y amplificación para hibridación en microarreglos 3x720k

Se realizó la identificación de los blancos de HOXB13 y HOXC9 por medio de microarreglos de promotores de Nimblegen (ROCHE), los cuales contienen 720,000 sondas de ADN de 50 – 75pb cada una abarcando en conjunto regiones de 4000pbs; 3,200pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de 22,542 promotores y 800pb río abajo del sitio de inicio de la transcripción correspondientes a 30,893 transcritos. El diseño de los microarreglos fue generado en base a la construcción 18 del genoma humano.

Con el ADN inmunoprecipitado y re-amplificado se realizó el marcaje de 1ug de cada muestra (HeLa HOXB13, HOXC9, RNApol IIp y CaSki HOXB13 y HOXC9) e Input de acuerdo a las instrucciones del Nimblegen, con lo cual se llega a obtener hasta 20µg de ADN marcado. La única modificación realizada en el protocolo fue combinar la química de marcaje de Agilent para aumentar la intensidad de fluorescencia (Cy3-Input y Cy5-IP-HOX) mediante el sistema de dUTP-Cy3, Cy5. Las muestras se purificaron por columna y cuantificaron.

La hibridación se realizó de acuerdo a las indicaciones de Nimblegen utilizando 15µg de DNA marcado con Cy5 y Cy3 (con ratio de 260/280 en el rango de 1.8 – 2) experimental e input respectivamente. Para poder identificar el alineamiento y corroborar la correcta hibridación de los microarreglos se utilizaron los *sample tracking* número 20 para las hibridaciones de HOXB13/Input, número 5 para las muestras de HOXC9/Input y número 1 para las muestras de RNA pol IIp/Input para ambas líneas celulares Hela y CaSki. El tiempo de hibridación fue de 17 horas y los lavados se realizaron sin modificación alguna al protocolo original del fabricante.

Obtención de la Imagen (Escáner de imagen) a partir de microarreglos de secuencias promotoras (3x720k Nimblegen ROCHE)

La captura de imagen por scanner se llevó a cabo utilizando los parámetros default del software de Roche en el equipo ms 200 Microarray Scanner con la mayor resolución en área de captura de imagen de 2µm con ajuste automático de ganancia en la adquisición de imagen.

Análisis de imagen de microarreglos para la Identificación de blancos génicos de HOXB13 y HOXC9

Para la extracción de los datos a partir de las imágenes obtenidas de cada micro arreglo se utilizó el software DEVA 1.2 de Roche ya que este software permite alinear de manera automática las imágenes de micro arreglo evitando que en cada alineamiento se acumule el error manual. Con el mismo software se generaron los archivos .GFF que contienen los datos de intensidad para cada sonda hibridada. Los archivos .GFF fueron analizados con el software NimbleScan 2.6 de Roche considerando longitud de sonda de 50pb, Cy3/Cy5 (IP/Input). El análisis estadístico

consideró validas aquellas *probes* que tuvieran como longitud al menos 100pb con valor de $p \geq 99$. Finalmente se generó mapa de picos de los *probes* con valor de $FDR \leq 0.05$ con el cual se obtuvieron las listas de promotores enriquecidos por posicionamiento de las proteínas HOXB13, HOXC9 y RNAPol IIp.

Adicionalmente se realizó el análisis de anotaciones de los genes identificados como posibles blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 mediante el empleo del programa de análisis bioinformático DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). A partir de los resultados generados, se tomaron en consideración para este trabajo el agrupamiento de anotaciones a través de las siguientes herramientas en línea Gene Ontology, KEGG y PANTHER. Las anotaciones de un gen, son los atributos que se han descrito en trabajos previamente publicados, sean como la función molecular que tiene cada gen o la participación que tienen en procesos biológicos o vías moleculares. Mediante el análisis por el programa PANTHER se decidió llevar a cabo el análisis final de los datos el cual permite agrupar los genes identificados de acuerdo a su relación evolutiva así como en función de su participación funcional a nivel molecular, procesos biológicos y vías de señalización celular.

RESULTADOS

Expresión de HOXB13 y HOXC9 en las líneas celulares de CaCU: HeLa y CaSki

Se identificó la expresión nuclear de las proteínas HOXB13 y HOXC9 en líneas celulares HeLa y CaSki derivadas de CaCU. Nuestro análisis del valor promedio de cuantificación relativa de HOXC9 en células HeLa fue casi 5 veces mayor que la expresión de HOXB13. En células CaSki la expresión de HOXB13 y HOXC9 mostraron valores cercanos al 50% de núcleos, sin embargo la expresión de HOXB13 presentó mayor variabilidad respecto del número de núcleos HOXB13 positivos (figura 9).

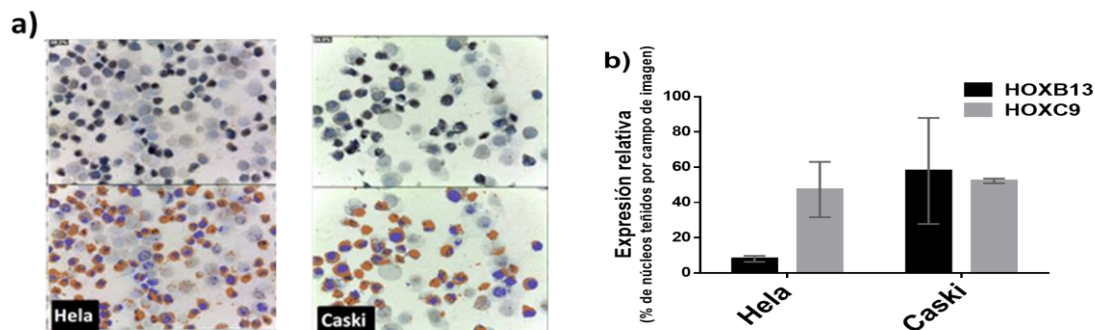


Figura 9. Expresión de HOXB13 y HOXC9 en líneas celulares derivadas de CaCU, HeLa y CaSki. a), Análisis del porcentaje de expresión nuclear de HOXB13 y HOXC9 en HeLa y CaSki a partir de 4 campos ópticos de imagen, en café se muestra la expresión de HOXB13 y HOXC9 identificada por el software y en color azul la tinción por hematoxilina, se suman ambos conteos y se divide entre el conteo café, mediante el uso del programa ImageJ. En b), Análisis de datos obtenidos de las microfotografías que fueron graficados como expresión relativa de HOXB13 y HOXC9. Las líneas en cada barra representan la desviación estándar.

Con los productos inmunoprecipitados se realizó la identificación de los blancos génicos para los factores de transcripción HOXB13 y HOXC9, empleando valores de FDR <0.05 mediante el programa NimbleScan con lo cual se obtuvieron 549

potenciales blancos génicos para HOXB13, 2,212 blancos de HOXC9 en células HeLa y 517 secuencias promotoras para HOXB13 así como 912 blancos del factor transcripcional HOXC9 en células CaSki (figura 10).

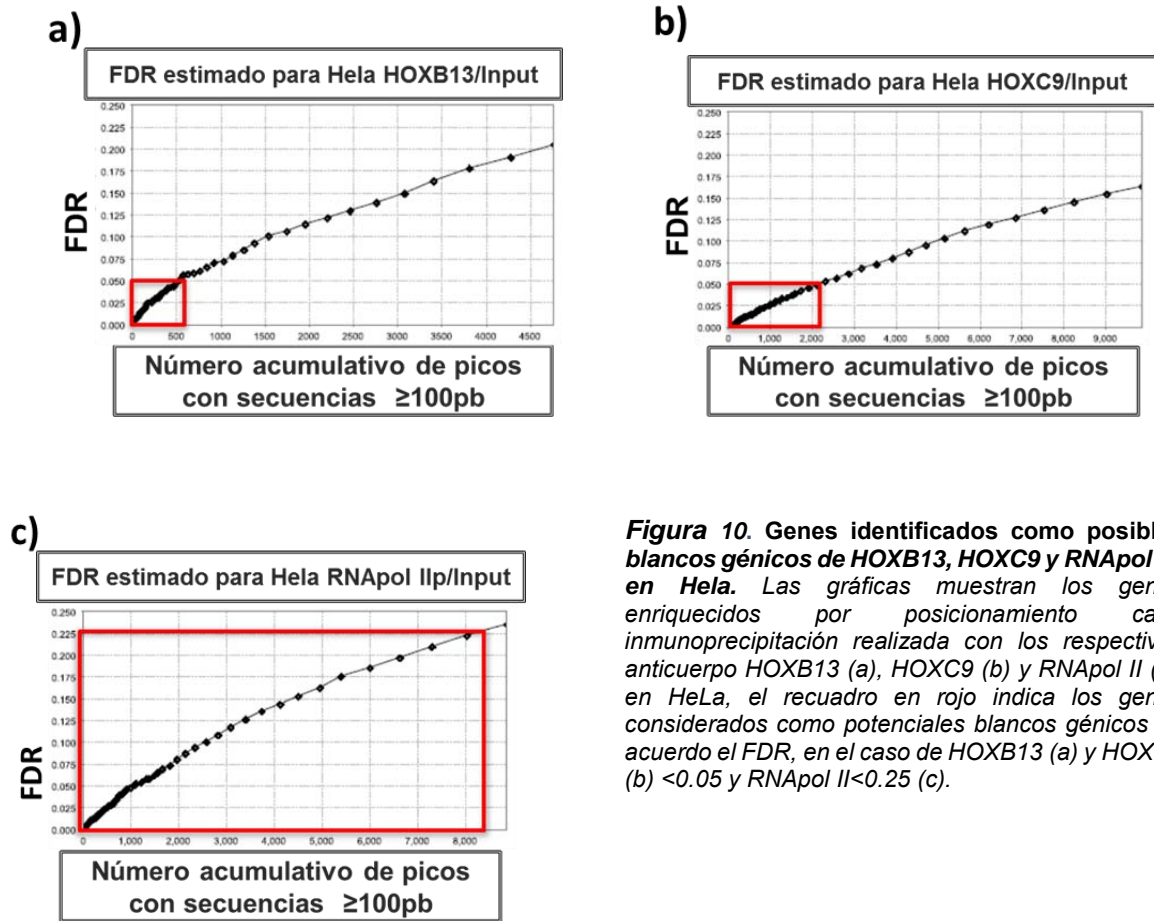


Figura 10. Genes identificados como posibles blancos génicos de HOXB13, HOXC9 y RNApol II en HeLa. Las gráficas muestran los genes enriquecidos por posicionamiento cada inmunoprecipitación realizada con los respectivos anticuerpo HOXB13 (a), HOXC9 (b) y RNApol II (c), en HeLa, el recuadro en rojo indica los genes considerados como potenciales blancos génicos de acuerdo el FDR, en el caso de HOXB13 (a) y HOXC9 (b) <0.05 y RNApol II <0.25 (c).

Análisis de anotaciones enriquecidas para los blancos génicos Identificados de HOXB13 y HOXC9 en Células HeLa

Para el análisis de anotaciones de blancos génicos identificados para cada factor de transcripción se utilizó el listado de genes totales, siendo este de 549 genes para HOXB13 y 2,212 para el caso de HOXC9 (figura 11) considerando los valores

asignados por default en el programa bioinformático DAVID como se indica en material y métodos.

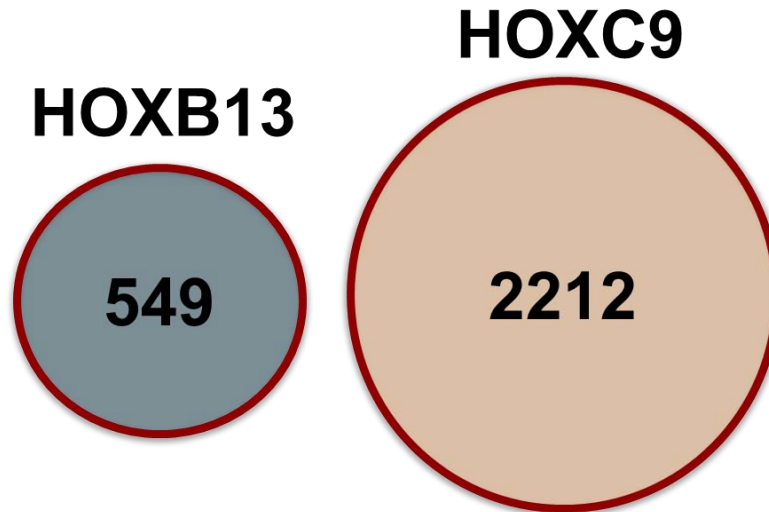


Figura 11. Genes identificados como potenciales blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células HeLa. Los círculos representan al número de promotores identificados con picos de fluorescencia que indican posicionamiento de HOXB13 (circulo azul) y HOXC9 (circulo naranja), mediante el análisis con valores de $FDR \leq 0.05$.

Funciones moleculares asociadas a los blancos génicos de HOXB13 y

HOXC9 en células HeLa

Las principales funciones moleculares enriquecidas por los blancos génicos de HOXB13 fueron: receptores asociados a proteínas G, moléculas de adhesión celular, proteínas de unión selectoras de calcio, cadherinas, proteínas estructurales, filamentos intermediario, proteínas transportadoras y acarreadoras. Para HOXC9, las principales funciones identificadas fueron: factores de transcripción, moléculas de adhesión celular, factores de transcripción Homeóticos, proteínas de unión a DNA, cadherinas, factores de transcripción hélice-vuelta-hélice básico, axidasas, histonas, transportadores de amino ácidos y receptores GABA. En base al análisis

independiente, tanto HOXB13 como HOXC9 están involucrados en la regulación de genes asociados a funciones moleculares como cadherinas y moléculas de adhesión celular (figura12).

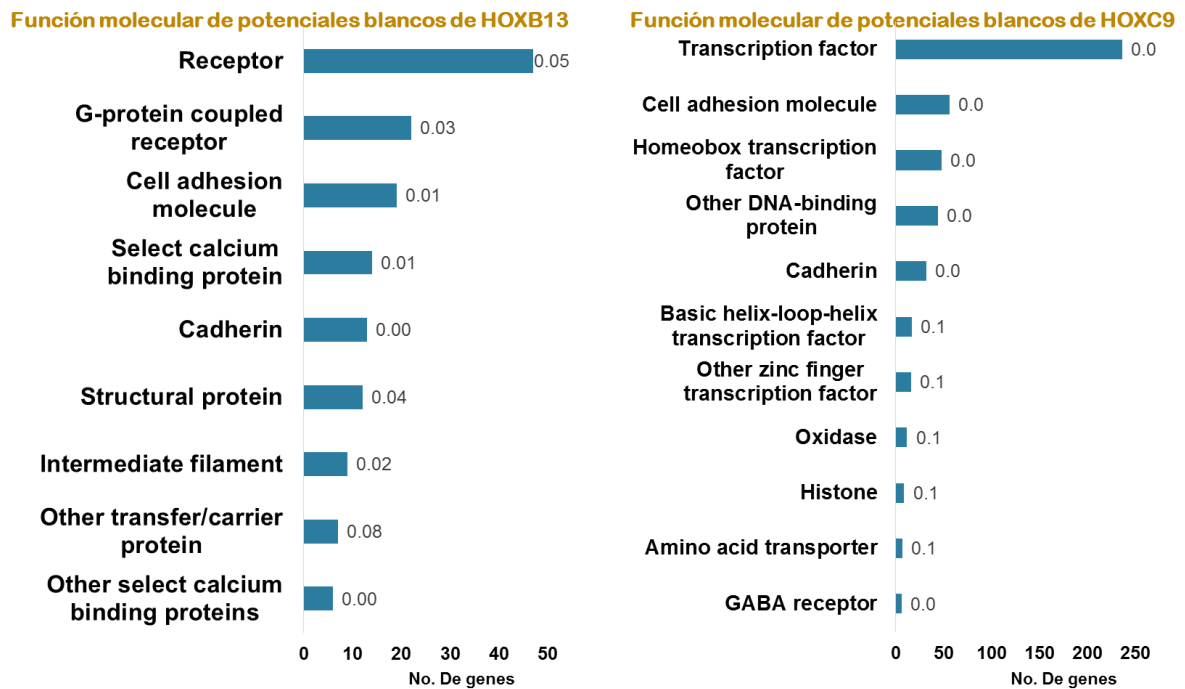


Figura 12. Funciones moleculares de genes blanco de HOXB13 y HOXC9. Gráficas de genes identificados como blancos génicos de HOXB13 y HOXC9, agrupados en funciones moleculares enriquecidas por el análisis de los programas DAVID-PANTHER. Los valores a la derecha de las barras representan el valor estadístico de p, de acuerdo a la relación de los genes con las anotaciones de función molecular.

Proceso biológicos asociados a los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células HeLa

Al realizar el análisis de anotaciones con los genes regulados HOXB13 los procesos biológicos enriquecidos fueron; transducción de señales, procesos de desarrollo, desarrollo de ectodermo, desarrollo de mesodermo, percepción sensorial, adhesión celular, señalización mediada por adhesión celular, percepción quimiosensorial,

olfato, visión, embriogénesis, patrón antero-posterior, otras proteínas de tráfico intracelular y unión de lípidos y ácidos grasos. Los procesos biológicos enriquecidos por los genes regulados por HOXC9 fueron; metabolismo de nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos, procesos de desarrollo, transcripción de ARNm, regulación de transcripción de ARNm, adhesión celular, actividad neuronal, neurogénesis, señalización mediada por adhesión celular, empaquetamiento y remodelación de cromatina, otras actividades neuronales, desarrollo de esqueleto, fosforilación oxidativa, metabolismo de ARNm y desarrollo de corazón. De manera independiente tanto HOXB13 como HOXC9 regulan genes involucrados con señalización mediada por adhesión celular y procesos del desarrollo (figura13).

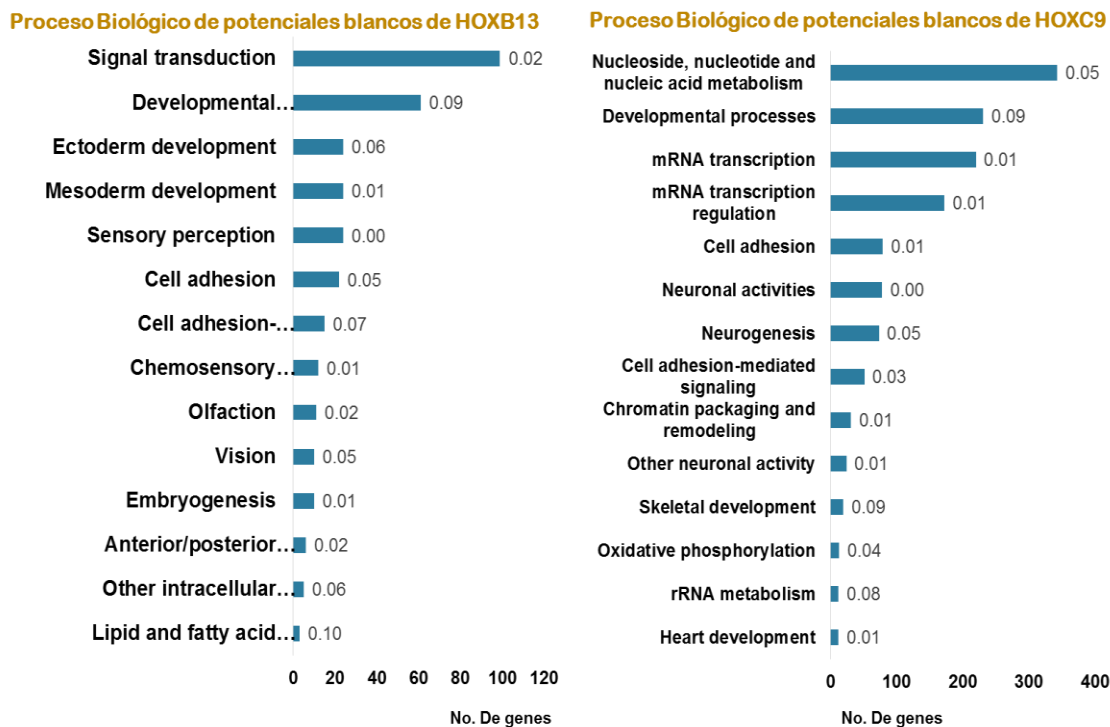


Figura 13. Procesos biológicos relacionados con genes blanco de HOXB13 y HOXC9. Gráficas de los genes identificados como blancos génicos de HOXB13 y HOXC9, agrupados en procesos biológicos identificados por el análisis de las herramientas bioinformáticas DAVID-PANTHER. Los valores a la derecha de las barras representan el valor estadístico de p, de acuerdo a la relación de los genes con las anotaciones de función molecular.

Vías moleculares en las cuales se identificaron involucrados los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células HeLa

Además de las funciones moleculares y procesos biológicos en los cuales están involucrados los genes potencialmente regulados por HOXB13 y HOXC9, se identificaron las potenciales vías moleculares en las cuales participan los blancos génicos de los dos factores de transcripción HOX. Las vías enriquecidas por los blancos de HOXB13 son; la vía Wnt, señalización de cadherinas, vía de FGF y la vía de PI3K. Las vías enriquecidas por los blancos de HOXC9 son; la vía Wnt, señalización por cadherinas, señalización por integrinas y la vía de preseniilinas de la enfermedad de Alzheimer. De manera independiente, tanto HOXB13 como HOXC9 regulan genes involucrados en las vías de Wnt y señalización por cadherinas (figura14).

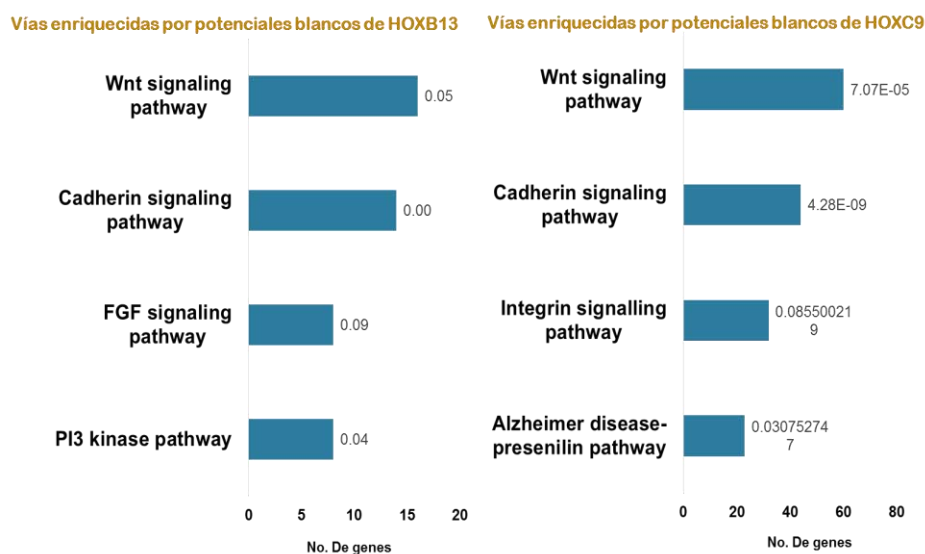


Figura 14. Vías moleculares relacionadas con blancos génicos de HOXB13 y HOXC9. Gráficas de los genes identificados como blancos génicos de HOXB13 y HOXC9, agrupados en vías moleculares identificados por el análisis de las herramientas bioinformáticas DAVID-PANTHER. Los valores a la derecha de las barras representan el valor estadístico de p, de acuerdo a la relación de los genes con las anotaciones de función molecular.

Análisis de anotaciones de los blancos génicos exclusivos de HOXB13 HOXC9 así como los genes identificados con posicionamiento de ambos factores de transcripción HOXB13 y HOXC9 en células HeLa

Para realizar el análisis de anotaciones de los genes diferencialmente regulados por cada factor de transcripción y ambos factores de transcripción se consideraron, blancos génicos exclusivos de HOXB13 y HOXC9, aquellos que únicamente presentaron enriquecimiento por el posicionamiento de un factor de transcripción, ya sea HOXB13 o HOXC9 y, se consideraron como genes con co-posicionamiento, aquellos donde se identificaron ambos factores de transcripción HOXB13 y HOXC9 en el mismo gen. En base a esta clasificación, se identificaron 424 blancos génicos exclusivos de HOXB13, 2087 blancos génicos exclusivos de HOXC9 y 125 blancos génicos con co-posicionamiento de HOXB13 y HOXC9 en HeLa (figura 15).

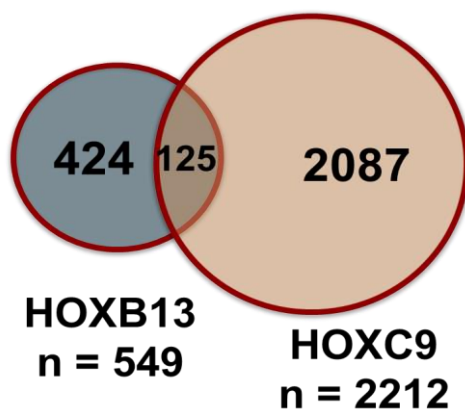


Figura 15. Genes identificados como potenciales blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células HeLa de manera diferencial. Diagrama de Venn que incluye el número de genes identificados mediante el análisis de picos de posicionamiento exclusivos para HOXB13, HOXC9, así como genes con co-posicionamiento.

Funciones molecular de los blanco génicos exclusivos de HOXB13, HOXC9 y con co-posicionamiento de HOXB13 y HOXC9 en células HeLa

Al realizar la selección de los blancos génicos exclusivamente regulados por HOXB13 en la línea celular Hela, se observó enriquecimiento en genes asociados a las funciones moleculares de; receptores, proteínas G asociadas a receptores, proteínas de unión selectoras de calcio y otras proteínas transportadoras. Las funciones moleculares enriquecidas por los genes potencialmente regulados exclusivamente por HOXC9 son; unión a ácidos nucleicos, factores de transcripción, factores de transcripción Homeóticos, otras proteínas de unión a DNA, deshidrogenasas, cadherinas, histonas y receptores GABA. Por otra parte los con co-posicionamiento de HOXB13 y HOXC9 están involucradas con; moléculas de adhesión celular, cadherinas, proteínas del cito esqueleto, matriz extracelular, proteínas estructurales, filamentos intermediarios y otras proteínas de unión selectoras de calcio (figura16).

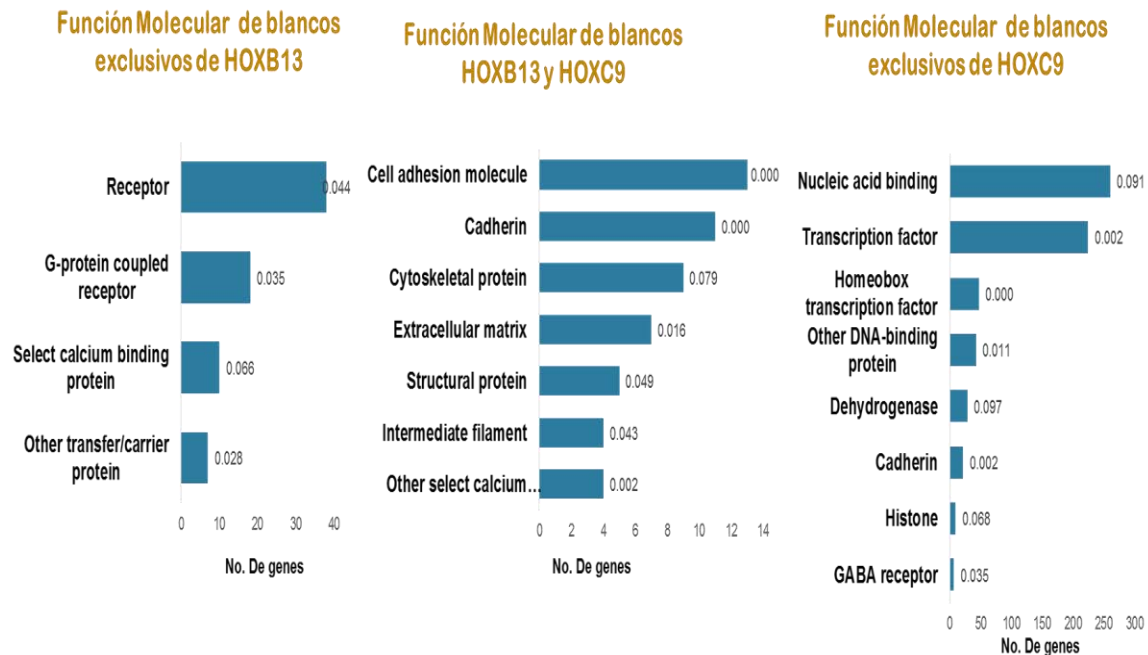


Figura 16. Funciones moleculares de los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 de manera diferencial en células HeLa. Se graficaron las anotaciones enriquecidas por el análisis de DAVID-PANTHER. Los valores junto a las barras representan el valor de p en el agrupamiento de cada anotación.

Procesos biológicos asociados los blancos génicos exclusivos de HOXB13, HOXC9 y genes con co-posicionamiento por HOXB13 y HOXC9 en HeLa

Los procesos biológicos enriquecidos por los blancos génicos exclusivos de HOXB13 identificados son; transducción de señales mediada por receptores de superficie, proliferación celular y diferenciación, ciclo celular, señalización mediada por proteínas G, desarrollo del ectodermo, desarrollo del mesodermo, percepción sensorial, percepción quimiosensorial, olfato, embriogénesis, vía de señalización de proteínas tirosina-cinasa, patrón antero-posterior, otras proteínas de tráfico intracelular y unión de lípidos y ácidos grasos. En el caso de HOXC9, los procesos biológicos enriquecidos son; metabolismo de nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos, transcripción de ARNm, actividad neuronal, neurogénesis, remodelación y empaquetamiento de cromatina, otras actividades neuronales, metabolismo de

lípidos, desarrollo de esqueleto, transmisión sináptica nervio – nervio, fosforilación oxidativa, metabolismo de ARNr, desarrollo de corazón y exocitosis regulada. Los procesos enriquecidos por los blancos génicos con co-posicionamiento de HOXB13 y HOXC9 son; transducción de señales, comunicación celular, adhesión celular y señalización mediada por adhesión celular (figura17).

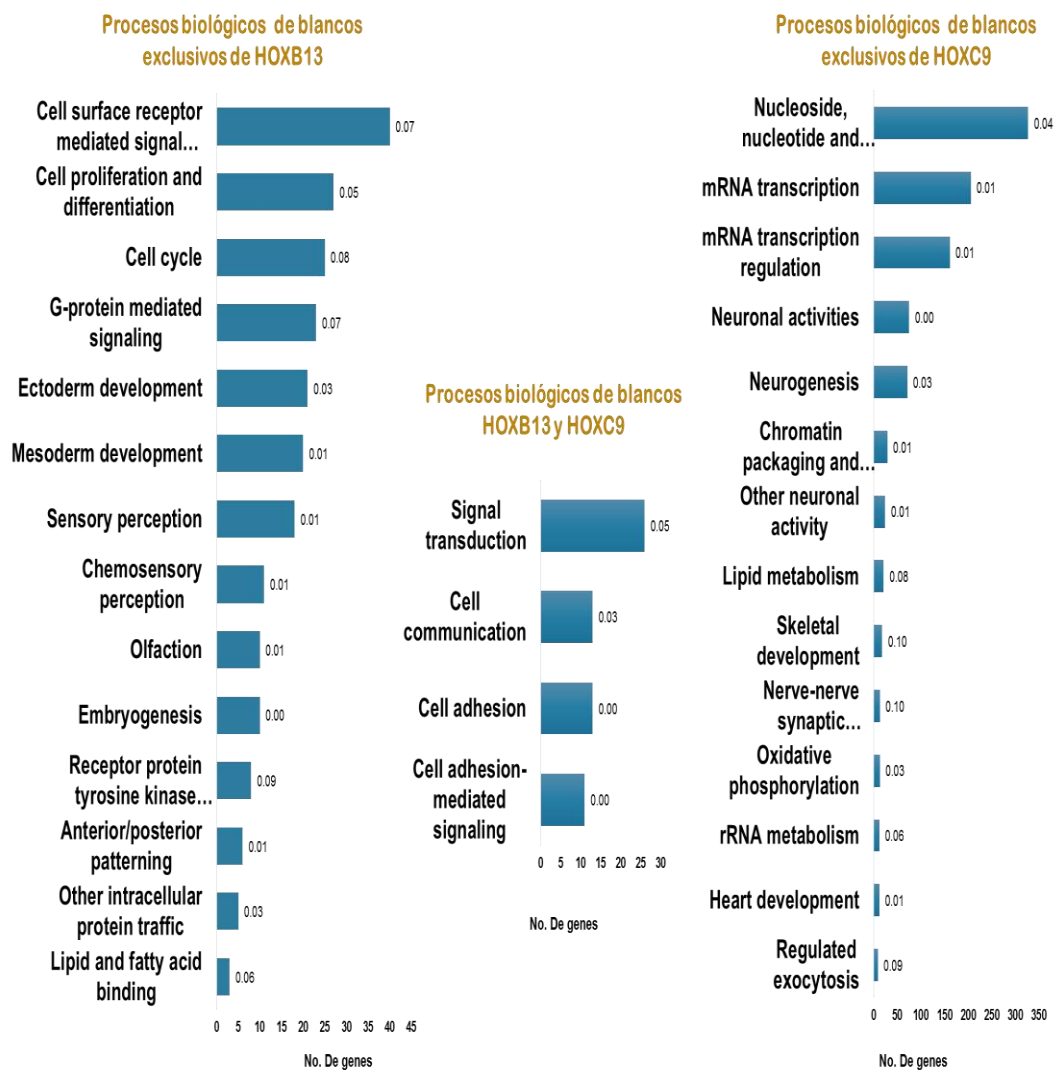


Figura 17. Procesos biológicos relacionados con los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 de manera diferencial en células HeLa. Se presentan gráficas con las anotaciones enriquecidas por el posicionamiento de HOXB13, HOXC9 y HOXB13/HOXC9. Fueron generadas a partir de los datos obtenidos por el análisis de DAVID-PANTHER. Los valores numéricos junto a las barras representan el valor de p en el agrupamiento de datos.

Vías moleculares asociadas a los blancos génicos exclusivos de HOXB13, HOX9 y con co-posicionamiento de HOXB13 y HOXC9 en células HeLa

En cuanto a las vías moleculares enriquecidas por los potenciales blancos exclusivos de HOXB13 se encuentran; la vía de señalización de FGF y la vía de PI3K. En el caso de HOXC9 las principales vías enriquecidas son; la vía de Wnt, señalización por cadherinas, señalización por integrinas y la vía de presenilina de la enfermedad de Alzheimer. Finalmente, los genes con co-posicionamiento de HOXB13 y HOXC9 están involucrados en las vías de Wnt y señalización por Cadherinas (figura18).

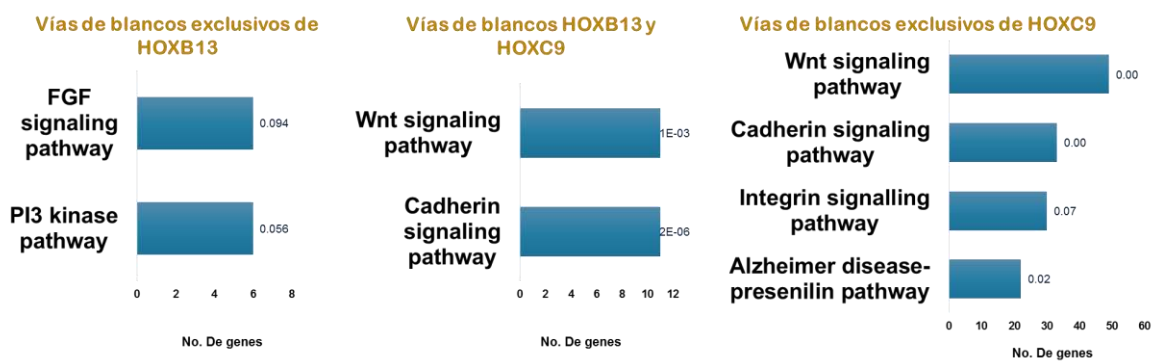


Figura 18. Vías moleculares relacionadas con los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 de manera diferencial en células HeLa. Se graficaron las anotaciones enriquecidas por el análisis de DAVID-PANTHER. Los valores junto a las barras representan el valor de p en el agrupamiento de cada anotación.

Análisis de anotaciones enriquecidas para los blancos génicos Identificados de HOXB13 y HOXC9 en Células CaSki

En el análisis de anotaciones para cada factor de transcripción se utilizaron las listas de genes totales para cada HOX, 517 genes para HOXB13 y 912 en el caso de

HOXC9 (figura19) considerando los valores predeterminados de la herramienta bioinformática DAVID.

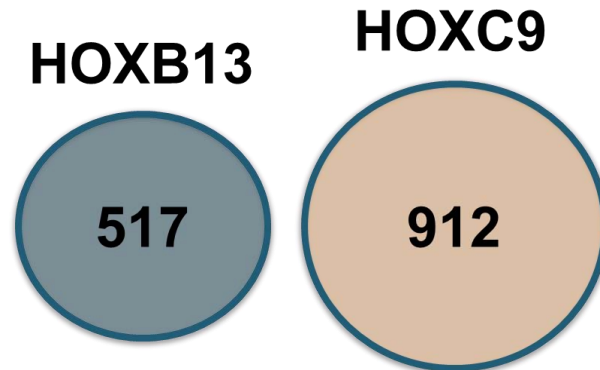


Figura 19. Genes identificados como potenciales blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células CaSki. Los círculos representan al número de promotores identificados con picos de fluorescencia que indican posicionamiento de HOXB13 (círculo azul) y HOXC9 (círculo naranja), mediante el análisis con valores de FDR<0.05.

Funciones Moleculares asociadas a los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células CaSki

Las funciones moleculares enriquecidas por los genes blanco de HOXB13 en CaSki son; factor de transcripción, moléculas de señalización, factores de transcripción Homeóticos, otras proteínas de unión a DNA, moléculas de adhesión celular, matriz extracelular, canales iónicos, cadherinas, proteínas estructurales, canales de gradiente de voltaje, filamentos intermediarios, factores de transcripción básicos hélice – vuelta – hélice, cierre de canales de voltaje de potasio, citosinas, hormonas péptido y receptores transmembranales regulador / adaptador. Las funciones moleculares enriquecidas por los blancos de HOXC9 son; factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, moléculas de señalización, proteasas, moléculas de adhesión celular, canales iónicos, factores de transcripción homeóticos, otras

proteínas de unión a DNA, proteínas estructurales, proteínas de defensa del sistema inmune, cadherinas, filamentos intermedarios, proteínas de unión a calcio, proteasas de serina, canales iónicos de voltaje, factores de transcripción básicos hélice – vuelta – hélice, hormonas péptido y canales de voltaje de potasio. De manera independiente los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 comparten 13 funciones moleculares; hormonas péptido, canales de voltaje de potasio, factores de transcripción básicos hélice – vuelta – hélice, filamentos intermedarios, canales iónicos de voltaje, proteínas estructurales, cadherinas, canales iónicos, moléculas de adhesión celular, otras proteínas de unión a DNA, factores de transcripción Homeóticos, moléculas de señalización y factores de transcripción (figura 20).

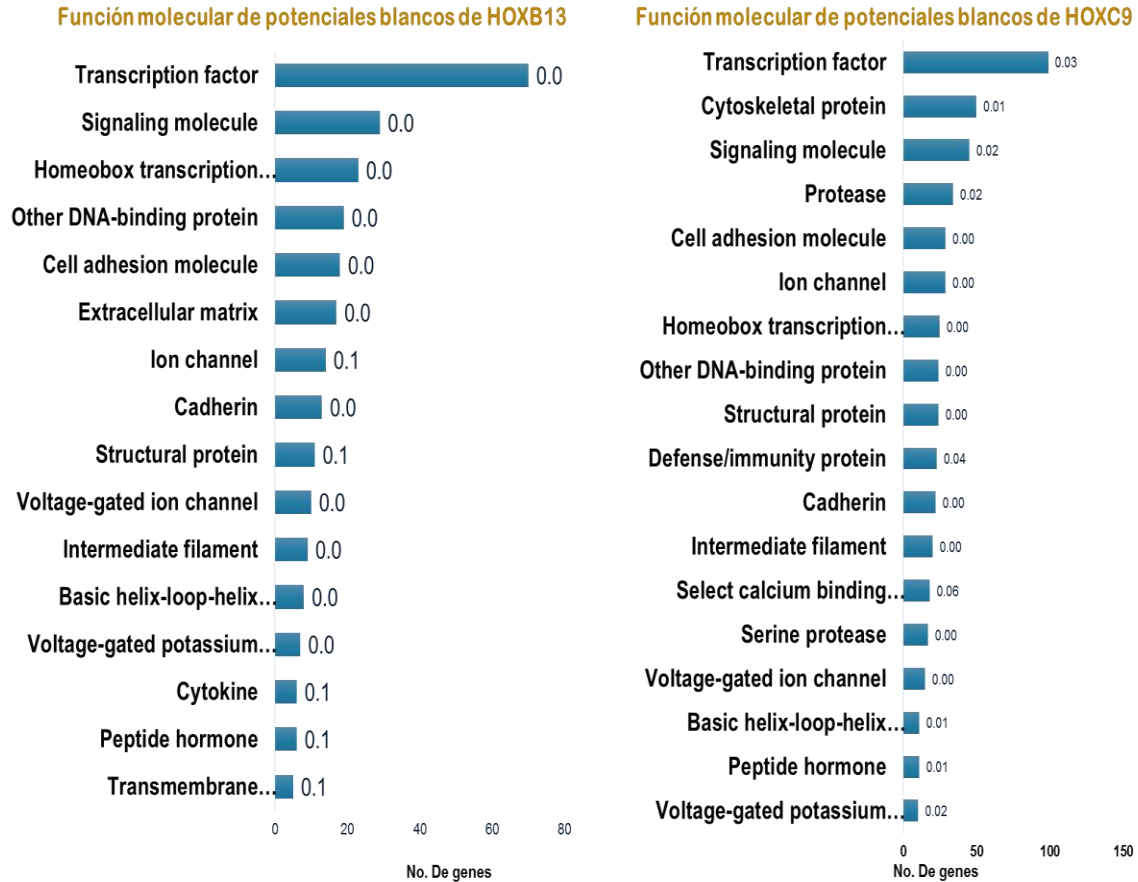


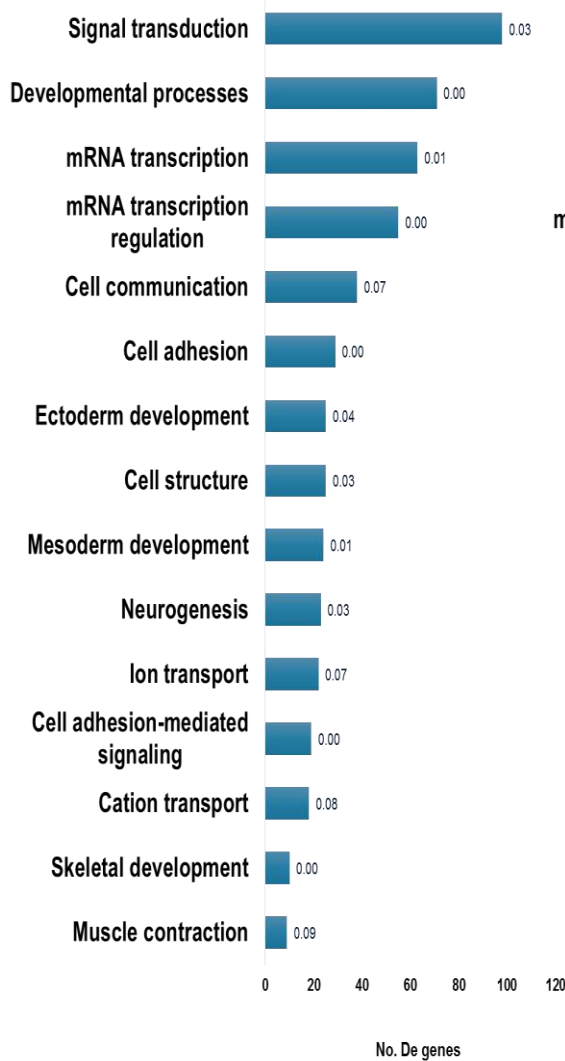
Figura 20. Funciones moleculares de los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células CaSki. Gráficas de genes identificados como blancos génicos de HOXB13 y HOXC9, agrupados en funciones moleculares enriquecidas por el análisis de los programas DAVID-PANTHER. Los valores a la derecha de las barras representan el valor estadístico de p, de acuerdo a la relación de los genes con las anotaciones de función molecular.

Procesos biológicos asociados a los blancos de HOXB13 y HOXC9 en células CaSki

El análisis de los genes totales potencialmente regulados por cada factor de transcripción se asociaron diferentes procesos biológicos, para HOXB13; transducción de señales, procesos de desarrollo, transcripción de ARNm, regulación de transcripción de ARNm, comunicación celular, adhesión celular, desarrollo del ectodermo, estructura celular, desarrollo del mesodermo, neurogénesis, transporte de iones, señalización mediada por adhesión celular,

transporte de cationes, desarrollo de esqueleto y contracción muscular. En cuanto a HOXC9 los procesos biológicos enriquecidos por los genes blanco fueron; transducción de señales, procesos de desarrollo, transcripción de RNAm, transducción de señales mediada por receptores de superficie celular, regulación de transcripción de ARNm, comunicación celular, desarrollo de ectodermo, señalización mediada por proteínas G, actividades neuronales, adhesión celular, estructura celular, transporte de iones, neurogénesis, señalización mediada por adhesión celular, desarrollo de mesodermo, transporte de cationes, homeostasis, otras actividades neuronales, embriogénesis y transporte de aniones. Los procesos biológicos enriquecidos por los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 son; transporte de cationes, señalización mediada por adhesión celular, transporte de iones, neurogénesis, desarrollo de mesodermo, estructura celular, desarrollo de ectodermo, adhesión celular, comunicación celular, regulación de transcripción de ARNm, transcripción de ARNm, procesos del desarrollo y transducción de señales (figura 21).

Proceso Biológico de potenciales blancos de HOXB13



Proceso Biológico de potenciales blancos de HOXC9

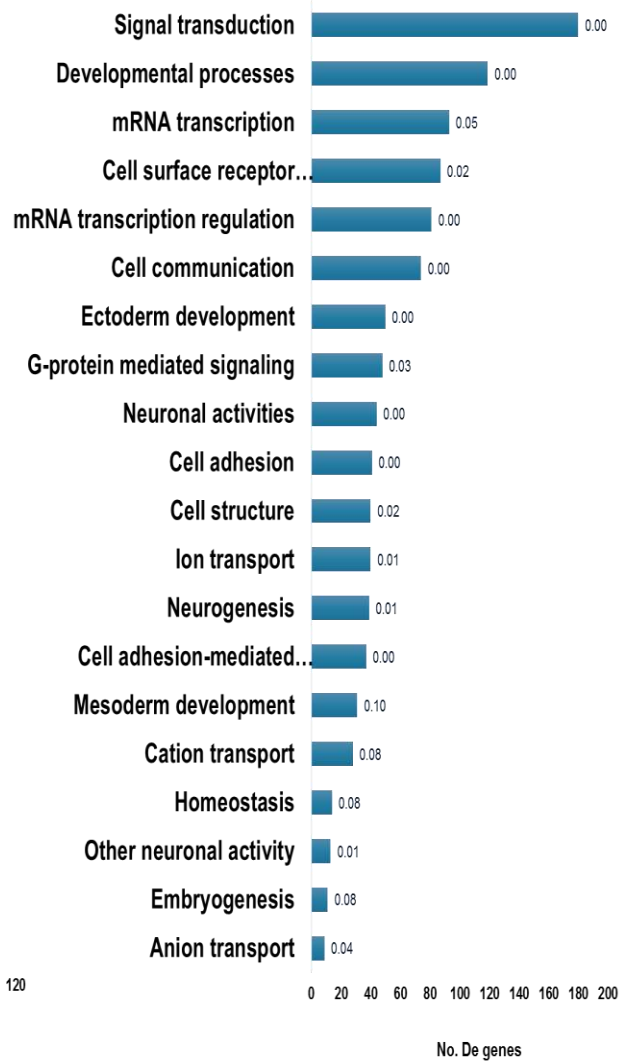


Figura 21. Procesos biológicos relacionados con los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células CaSki. Gráficas de genes identificados como blancos génicos de HOXB13 y HOXC9, agrupados en procesos biológicos enriquecidos por el análisis de los programas DAVID-PANTHER. Los valores a la derecha de las barras representan el valor estadístico de p, de acuerdo a la relación de los genes con las anotaciones de función molecular.

Vías moleculares asociadas a los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células CaSki

Tanto para HOXB13 como para HOXC9 el resultado del análisis de anotaciones de vías moleculares fue el mismo, los dos factores de transcripción regulan genes asociados a las vías de señalización por Wnt y cadherinas (figura 22).

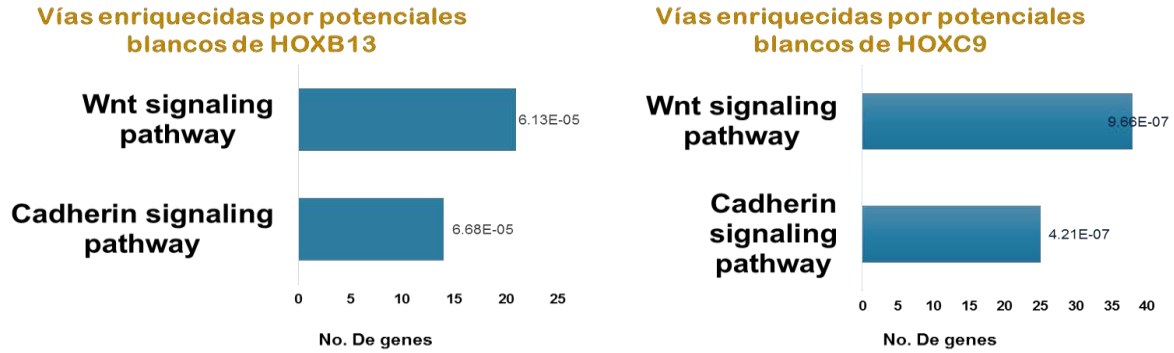


Figura 22. Vías moleculares relacionadas a los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en células CaSki. . Gráficas de los genes identificados como blancos génicos de HOXB13 y HOXC9, agrupados en vías moleculares identificados por el análisis de las herramientas bioinformáticas DAVID-PANTHER. Los valores a la derecha de las barras representan el valor estadístico de p , de acuerdo a la relación de los genes con las anotaciones de función molecular.

Análisis de anotaciones de los blancos génicos exclusivos de HOXB13, HOXC9 así como los genes identificados con posicionamiento de ambos factores de transcripción HOXB13 y HOXC9 en células CaSki

Para realizar el análisis de anotaciones de los genes diferencialmente regulados por cada factor de transcripción y ambos factores de transcripción se consideraron 239 genes blanco de HOXB13, 634 genes blanco de HOXC9 y 278 genes regulados por los dos factores de transcripción HOXB13 y HOXC9 (figura23).

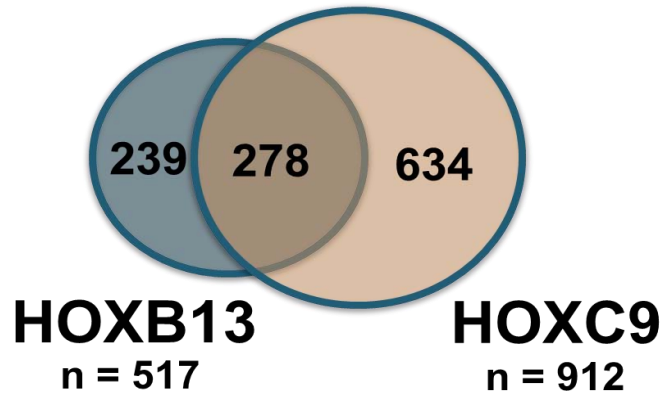


Figura 23. Genes identificados como potenciales blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en CaSki de manera diferencial. Diagrama de Venn con los genes que fueron identificados con picos de posicionamiento de manera exclusiva por HOXB13 o HOXC9 y genes con posicionamiento de los dos factores de transcripción con valores de FDR<0.05.

Funciones molecular de los blanco génicos exclusivos de HOXB13, HOXC9 y con co-posicionamiento de HOXB13 y HOXC9 en células CaSki

Las funciones moleculares enriquecidas por los potenciales blancos génicos exclusivos de HOXB13 son; factores de transcripción, moléculas de señalización, factores de transcripción Homeóticos, otras proteínas de unión a DNA, matriz extracelular y proteínas estructurales de la matriz extracelular. Las funciones moleculares de los blancos exclusivos de HOXC9 son; proteínas del citoesqueleto, moléculas de señalización, proteasas, canales iónicos, proteínas de la defensa inmune, otras proteínas de unión a DNA, proteínas estructurales, factores de transcripción Homeóticos, proteasas de serina, filamentos intermediarios, cadherinas, canales iónicos de voltaje e interleucinas. Al considerar los únicamente los genes con co-posicionamiento de HOXB13 y HOXC9 las funciones moleculares asociadas son; factores de transcripción, moléculas de adhesión celular, cadherinas, canales iónicos, factores de transcripción Homeóticos, proteínas

estructurales, canales iónicos de voltaje, filamentos intermediarios, factores de transcripción básicos hélice – vuelta – hélice, hormonas péptido y miembros de la familia del Factor Necrosis Tumoral (figura 24).

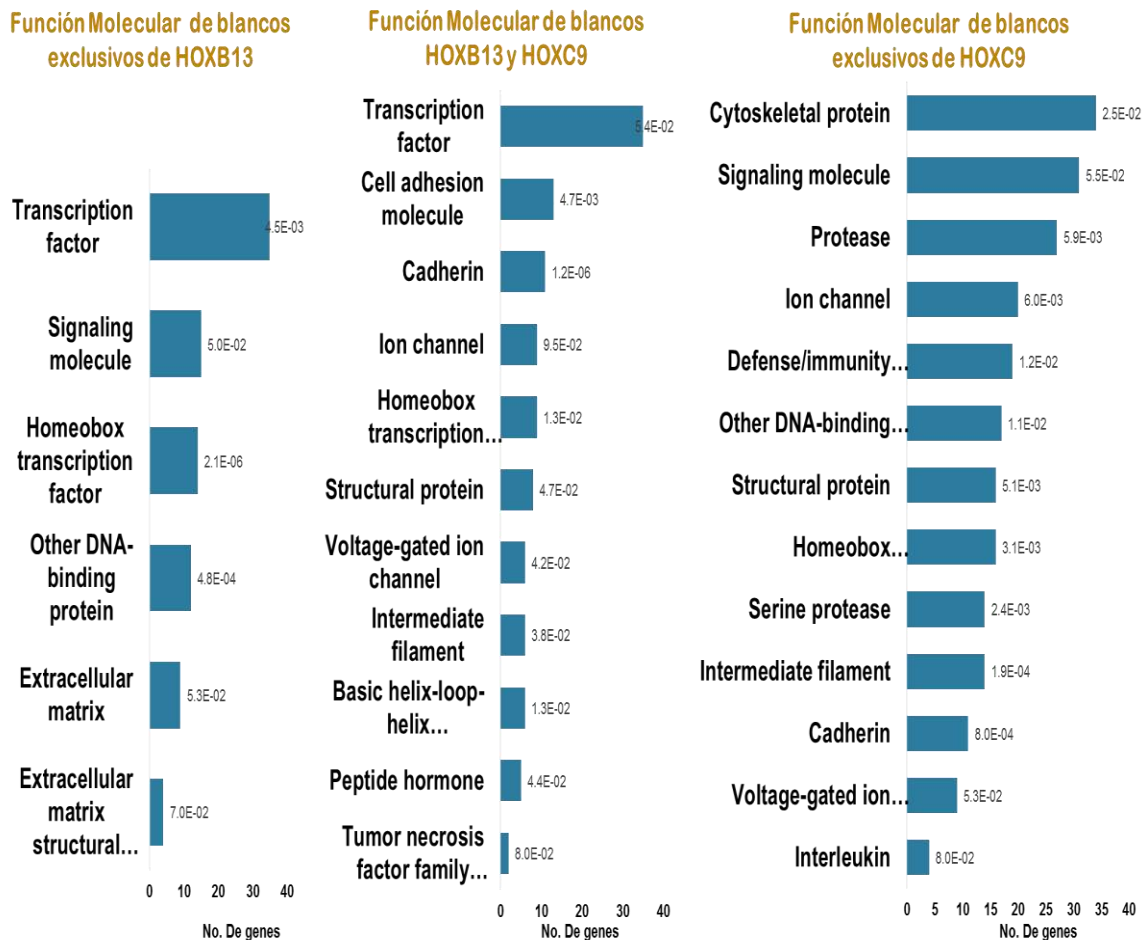


Figura 24. Funciones moleculares de los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 de manera diferencial en células CaSki. Se graficaron las anotaciones enriquecidas por el análisis de DAVID-PANTHER. Los valores junto a las barras representan el valor de p en el agrupamiento de cada anotación.

Procesos biológicos asociados los blancos génicos exclusivos de HOXB13, HOXC9 y genes con co-posicionamiento por HOXB13 y HOXC9 en células CaSki

Al realizar la separación de los genes exclusivamente con posicionamiento de HOXB13 de manera independiente de HOXC9 se identificaron los procesos

biológicos; procesos del desarrollo, transcripción de ARNm, regulación de la transcripción de ARNm, desarrollo de mesodermo, desarrollo del ectodermo, neurogénesis, desarrollo del esqueleto y desarrollo de músculo. En cuanto a los genes con posicionamiento exclusivamente por HOXC9 se identificaron los procesos de; transducción de señales, procesos del desarrollo, señalización mediada por receptores de superficie celular, regulación de la transcripción de ARNm, comunicación celular, desarrollo del ectodermo, señalización mediada por proteínas G, actividades neuronales, neurogénesis, estructura celular, transporte iónico, señalización mediada por adhesión celular, otras actividades neuronales, transporte de aniones y transmisión sináptica nervio – nervio. Al realizar el análisis de los genes con co-posicionamiento de HOXB13 y HOXC9 se identificaron; transducción de señales, transcripción de ARNm, regulación de la transcripción de ARNm, comunicación celular, adhesión celular, señalización mediada por adhesión celular, transporte de cationes y embriogénesis (figura 25).

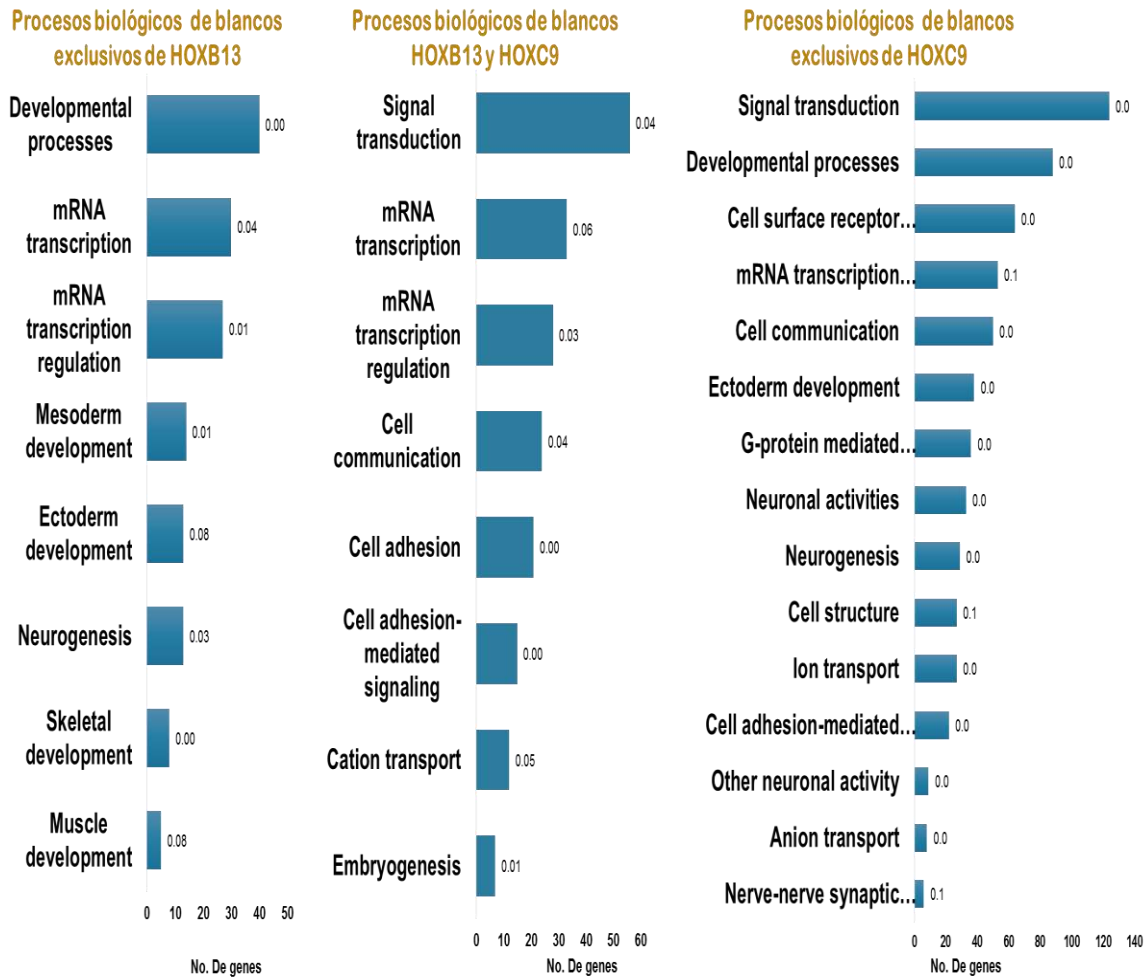


Figura 25. Procesos biológicos relacionados con genes blanco de HOXB13 y HOXC9. Se graficaron las anotaciones enriquecidas por el análisis de DAVID-PANTHER. Los valores junto a las barras representan el valor de p en el agrupamiento de cada anotación.

Vías moleculares asociadas a los blancos génicos exclusivos de HOXB13, HOX9 y con co-posicionamiento de HOXB13 y HOXC9 en CaSki

En el caso de los genes exclusivamente regulados por HOXB13 se identificó la vía de señalización de Notch, mientras que para los genes exclusivamente regulados por HOXC9 y ambos factores de transcripción HOXB13 y HOXC9 las vías enriquecidas fueron, la vía Wnt y de las cadherinas (figura 26).

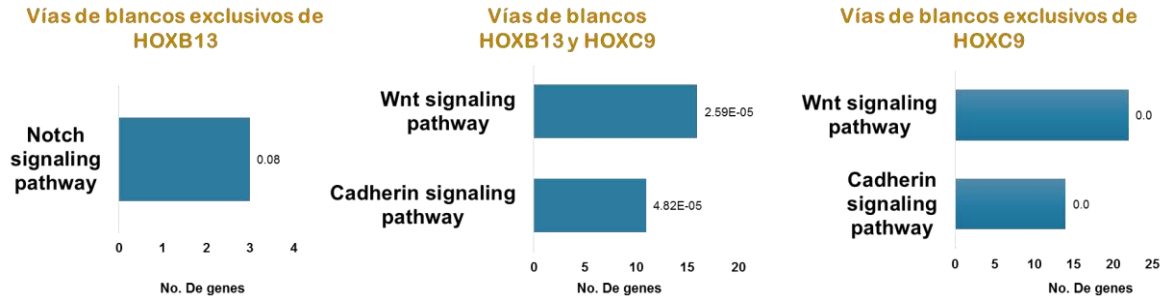


Figura 26. Vías moleculares relacionadas con genes blanco de HOXB13 y HOXC9. Se graficaron las anotaciones enriquecidas por el análisis de DAVID-PANTHER. Los valores junto a las barras representan el valor de p en el agrupamiento de cada anotación.

Identificación de las diferencias en blancos génicos de acuerdo al tipo viral, HPV18 (HeLa) y HPV16 (CaSki)

Para identificar las diferencias entre los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 de acuerdo al tipo viral presente en cada línea celular se realizó la comparación de los genes identificados como blancos de HOXB13 en HPV18 (Hela-HOXB13) 523 genes y HPV16 (Caski-HOXB13) 491 genes, los blancos génicos de HOXC9 en HPV18 (Hela-HOXC9), HPV16 (Caski-HOXC9) y finalmente los blancos HOX totales de acuerdo a cada línea celular (HOXB13-HOXC9 / HPV18 y HOXB13-HOXC9 / HPV16) como se muestra en la figura 27. Se realizó el análisis de anotaciones utilizando la herramienta DAVID con los datos de Gene Ontology PANTHER.

Análisis de anotaciones de los blancos génicos diferencialmente enriquecidos por posicionamiento de HOXB13 en líneas celulares HPV18 y HPV16.

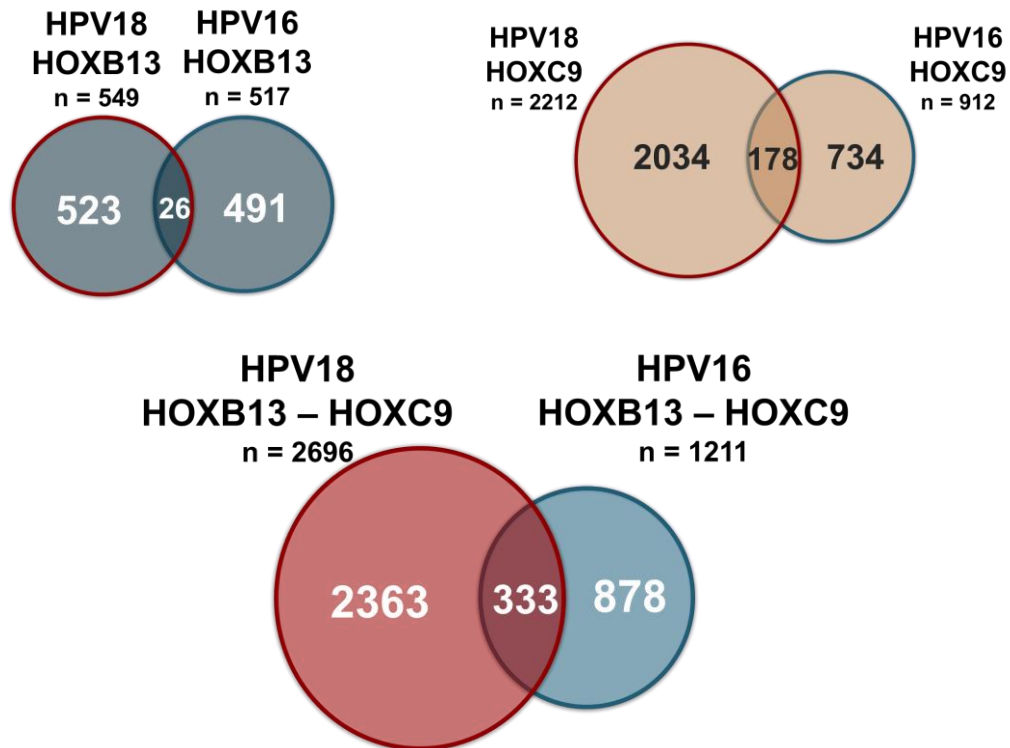


Figura 27. Genes identificados como blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 de manera diferencial en relación al tipo viral VPH16 y VPH18. Diagramas de Venn con los genes que fueron identificados con picos de posicionamiento por HOXB13 al compararse en base al tipo viral, comparación entre los blancos de HOXC9 de acuerdo a VPH16 (línea de círculo en azul), VPH 18 (línea de círculo en rojo) y comparación de la suma de los blancos de HOXB13 y HOXC9 en relación al tipo viral. Genes con posicionamiento de los dos factores de transcripción con valores de FDR<0.05.

Procesos Biológicos asociados a los blancos génicos de HOXB13 en relación a VPH16, VPH18 y VPH16-VPH18

Los procesos biológicos enriquecidos por el análisis de anotaciones de HOXB13-HPV18 son; transducción de señales, señalización mediada por receptores de superficie celular, comunicación celular, ciclo celular, señalización mediada por proteínas G, percepción sensorial, adhesión celular, desarrollo de mesodermo, señalización mediada por adhesión celular, percepción quimiosensorial, olfato, metabolismo de amino ácidos, visión, proteínas receptoras tirosina cinasa, embriogénesis, patrón antero – posterior y unión a lípidos y ácidos grasos. En el

caso de los procesos potencialmente regulados por HOXB13-HPV16 se identificaron; transducción de señales, procesos del desarrollo, transcripción de ARNm, regulación de la transcripción de ARNm, comunicación celular, adhesión celular, desarrollo del ectodermo, estructura celular, desarrollo del mesodermo, transporte de iones, neurogénesis, señalización mediada por adhesión celular, transporte de cationes y desarrollo de esqueleto. En cuanto a los procesos potencialmente regulados por HOXB13 en ambos modelos de líneas celulares HPV18 y HPV16 los procesos biológicos enriquecidos fueron; procesos del desarrollo, localización de proteínas blanco y embriogénesis (figura 28).

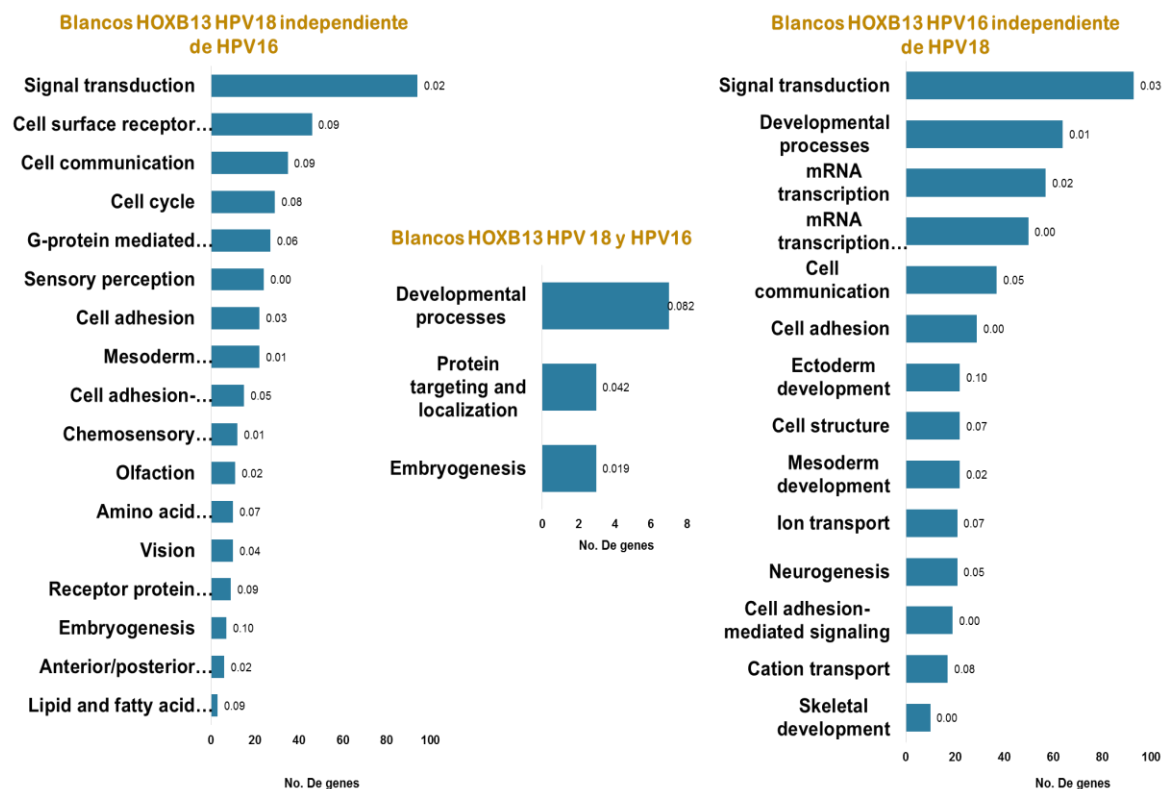


Figura 28. Procesos biológicos relacionados con genes blanco de HOXB13 en relación a VPH. Se graficaron las anotaciones enriquecidas por el análisis de DAVID-PANTHER. Los valores junto a las barras representan el valor de p en el agrupamiento de cada anotación.

Funciones moleculares asociadas a los blancos génicos de HOXB13 en relación a VPH16, VPH18 y VPH16-VPH18

Las funciones moleculares enriquecidas por los genes exclusivamente regulados por HOXB13 en el modelo de HPV18 fueron; receptor, receptor asociados proteínas G, moléculas de adhesión celular, cadherinas, proteínas de unión a calcio, filamentos intermediarios, otras proteínas transportadoras y acarreadoras y otras proteínas de unión a calcio. Para los blancos de HOXB13 en modelo de HPV16; factores de transcripción, moléculas de señalización, factores de transcripción homeóticos, moléculas de adhesión celular, otras proteínas de unión a DNA, matriz extracelular, cadherinas, canales iónicos de voltaje, canales de potasio de voltaje, factores de transcripción básicos hélice – vuelta – hélice, citosinas, hormonas péptido y receptores transmembranales de proteínas reguladoras y adaptadoras. Ninguna función molecular se vio enriquecida por los blancos génicos de HOXB13 en los modelos HPV18 y HPV16 (figura 29).

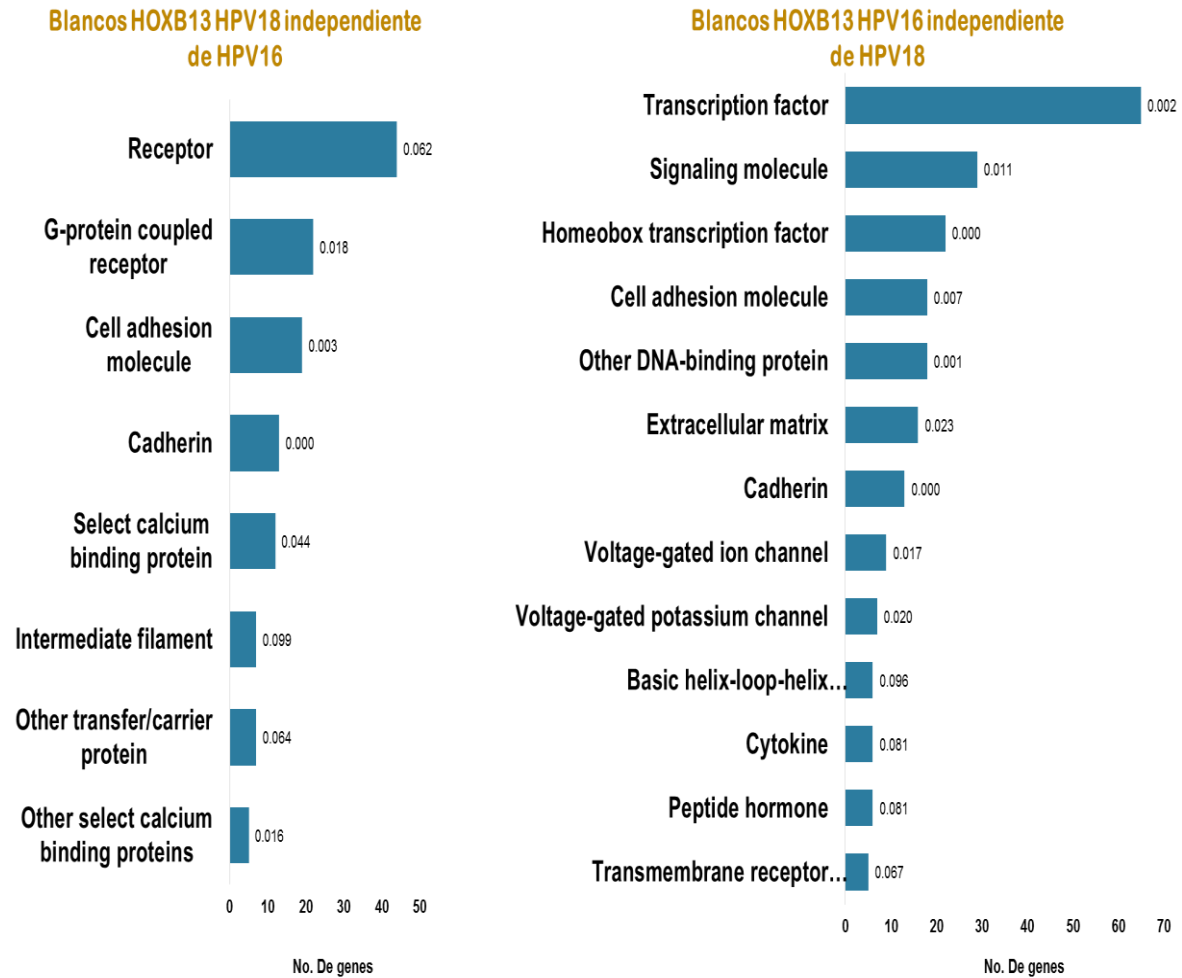


Figura 29. Funciones moleculares de genes blanco de HOXB13 en relación a VPH. Se graficaron las anotaciones enriquecidas por el análisis de DAVID-PANTHER. Los valores junto a las barras representan el valor de p en el agrupamiento de cada anotación.

Vías moleculares asociadas a los blancos génicos de HOXB13 en relación a VPH16, VPH18 y VPH16-VPH18

De acuerdo al análisis de anotaciones los genes regulados por HOXB13 – HPV18, las vías enriquecidas son; señalización por Wnt, cadherinas y la vía de PI3K. De los genes regulados por HOXB13 – HPV16 las vías moleculares son; Wnt y cadherinas, sin embargo, los genes regulados por HOXB13 en los dos modelos de VPH no muestran enriquecimiento en alguna vía (figura 30).

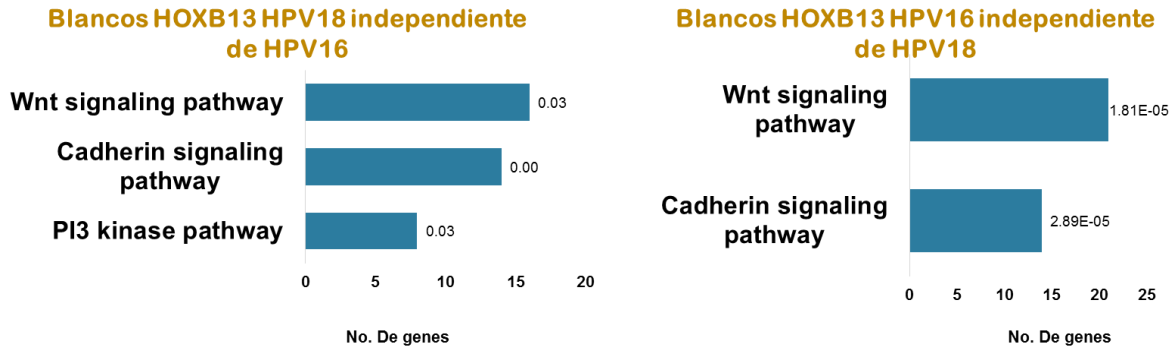


Figura 30. Vías moleculares relacionadas con genes blanco de HOXB13 en relación a VPH. Se graficaron las anotaciones enriquecidas por el análisis de DAVID-PANTHER. Los valores junto a las barras representan el valor de p en el agrupamiento de cada anotación.

Análisis de anotaciones de los blancos génicos diferencialmente enriquecidos por posicionamiento de HOXC9 en líneas celulares HPV18 y HPV16.

Procesos Biológicos asociados a los blancos génicos de HOXC9 en relación a VPH16, VPH18 y VPH16-VPH18

Al realizar el análisis de anotaciones de los blancos génicos de HOXC9 en los tipos virales HPV18 y HPV16 de los cuales los procesos biológicos enriquecidos en HOXC9 – VPH18 fueron; metabolismo de nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos, procesos del desarrollo, transcripción de ARNm, regulación de la transcripción de ARNm, actividades neuronales, remodelamiento y compactación de la cromatina, otras actividades neuronales, desarrollo de esqueleto, fosforilación oxidativa, metabolismo de ARNr y desarrollo del corazón. En el caso de HOXC9 – HPV16 los principales procesos fueron; transducción de señales, procesos del desarrollo, transcripción de ARNm, señalización mediada por receptores de

superficie celular, regulación de la transcripción de ARNm, comunicación celular, señalización mediada por proteínas G, desarrollo del ectodermo, actividades neuronales, estructura celular, transporte de iones, neurogénesis, señalización mediada por adhesión celular, gametogénesis, embriogénesis, otra actividad neuronal, endocitosis mediada por receptores, transporte de aniones, otras actividades de homeostasis y sensación de dolor. En cuanto a los genes regulados por HOXC9 en los modelos de VPH18 y VPH16 los procesos en los cuales los genes blanco de HOXC9 son; transducción de señales, comunicación celular, señalización mediada por adhesión celular, adhesión celular, actividades neuronales y transporte de iones (figura 31).

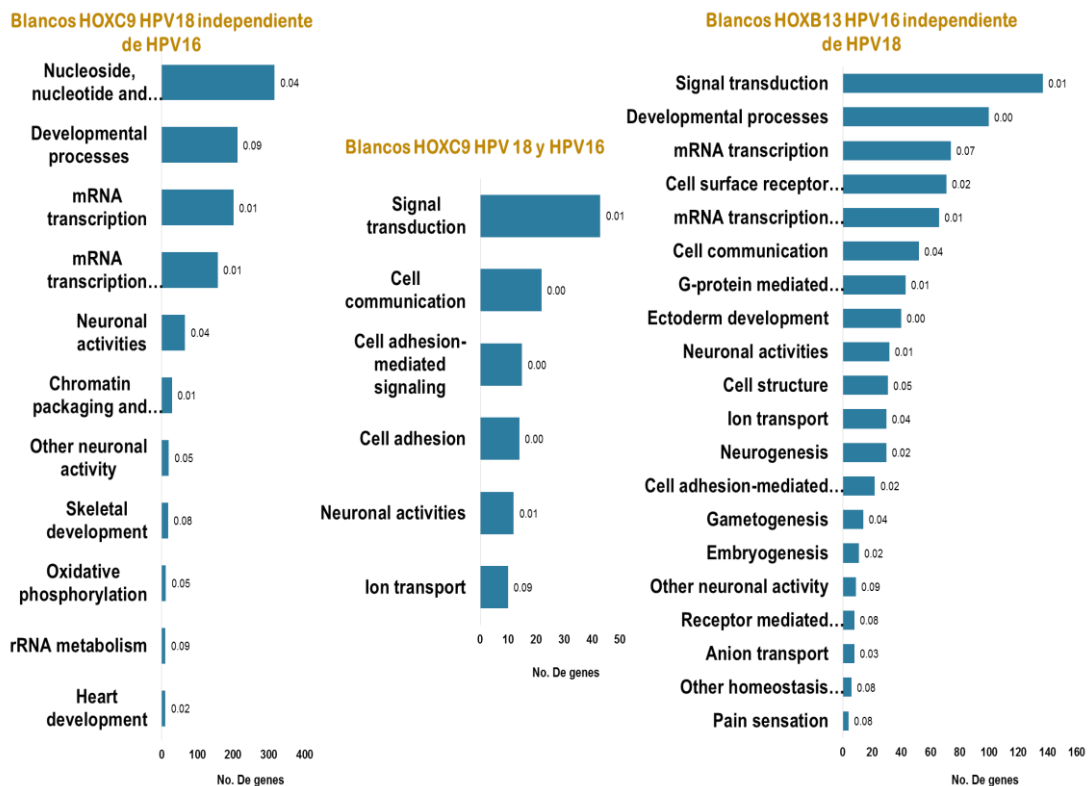


Figura 31. Procesos biológicos relacionados con genes blanco de HOXC9 en relación a VPH. Se graficaron las anotaciones enriquecidas por el análisis de DAVID-PANTHER. Los valores junto a las barras representan el valor de p en el agrupamiento de cada anotación.

Funciones moleculares de los blancos génicos de HOXC9 en relación a VPH16, VPH18 y VPH16-VPH18

Los resultados del análisis de anotaciones para los genes regulados por HOXC9 en el modelo de VPH18 las funciones moleculares enriquecidas fueron; factores de transcripción, factores de transcripción homeóticos, otras proteínas de unión a ADN, cadherinas, oxidasas, transporte de amino ácidos y receptores GABA. Para el modelo de VPH16 las funciones moleculares enriquecidas fueron; factores de transcripción, receptores, proteínas del citoesqueleto, moléculas de señalización, receptor asociado a proteínas G, proteasas, canales de iones, proteínas de defensa inmune, proteínas estructurales, otras proteínas de unión a DNA, factores de transcripción homeóticos, proteínas de unión selección de calcio, filamentos intermediarios, proteasas de serina, cadherinas, factores de transcripción básicos hélice – vuelta – hélice, hormonas péptido y canales de potasio de voltaje. Los genes regulados por HOXC9 en los modelos de VPH18 y VPH16 están asociados a las funciones moleculares; adhesión celular, cadherinas, canales iónicos, factores de transcripción homeóticos, canales iónicos de voltaje y canales de calcio de voltaje (figura 32).

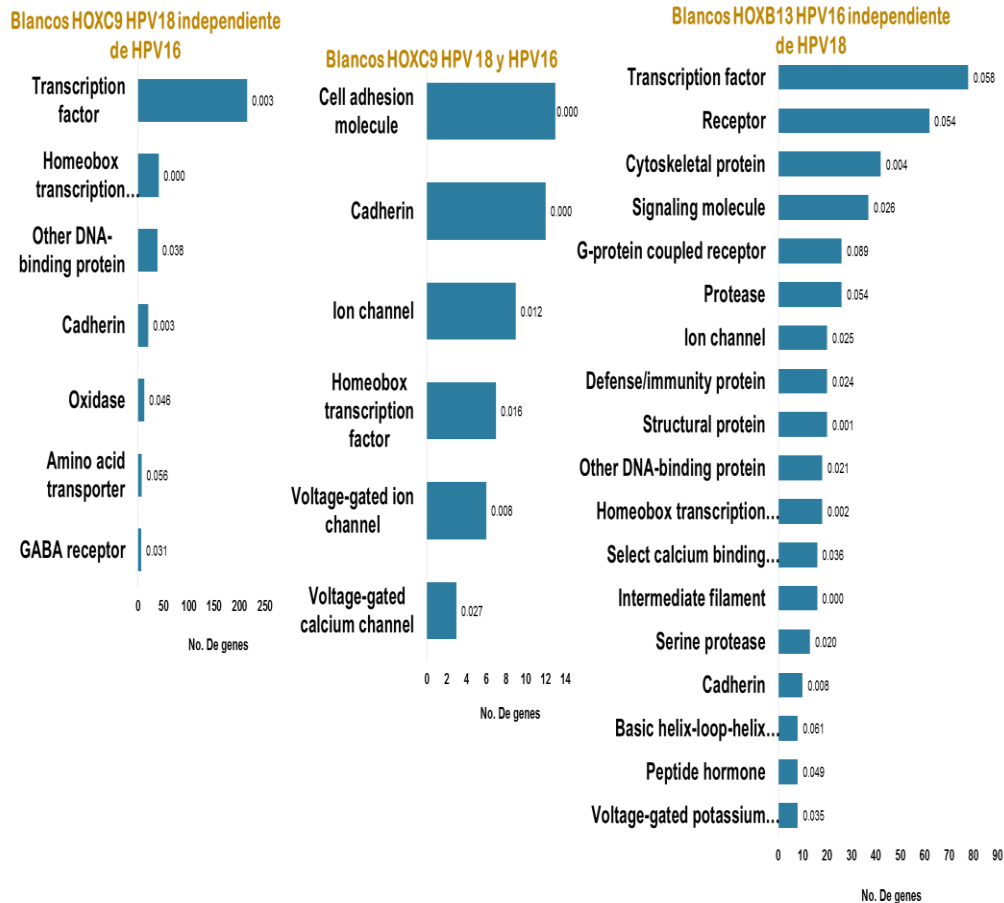


Figura 32. Funciones moleculares de genes blanco de HOXC9 en relación a VPH. Se graficaron las anotaciones enriquecidas por el análisis de DAVID-PANTHER. Los valores junto a las barras representan el valor de p en el agrupamiento de cada anotación.

Vías moleculares asociadas a los blancos génicos de HOXC9 en relación a VPH16, VPH18 y VPH16-VPH18

De acuerdo al análisis de anotaciones de vías moleculares para los blancos génicos de HOXC9 en VPH18 los genes regulados por el factor de transcripción se encuentran involucrados en la vía Wnt, señalización por integrinas, vía de las cadherinas y la vía de presenilina en la enfermedad de Alzheimer. Para el modelo de VPH16, HOXC9 regula genes involucrados con las vías de Wnt, cadherinas y en la vía de proteínas G heterotrimericas Gi y Gs alfa. Por último, los genes regulados

por HOXC9 en los dos modelos de VPH están involucrados en las vías de Wnt y de las cadherinas (figura 33).

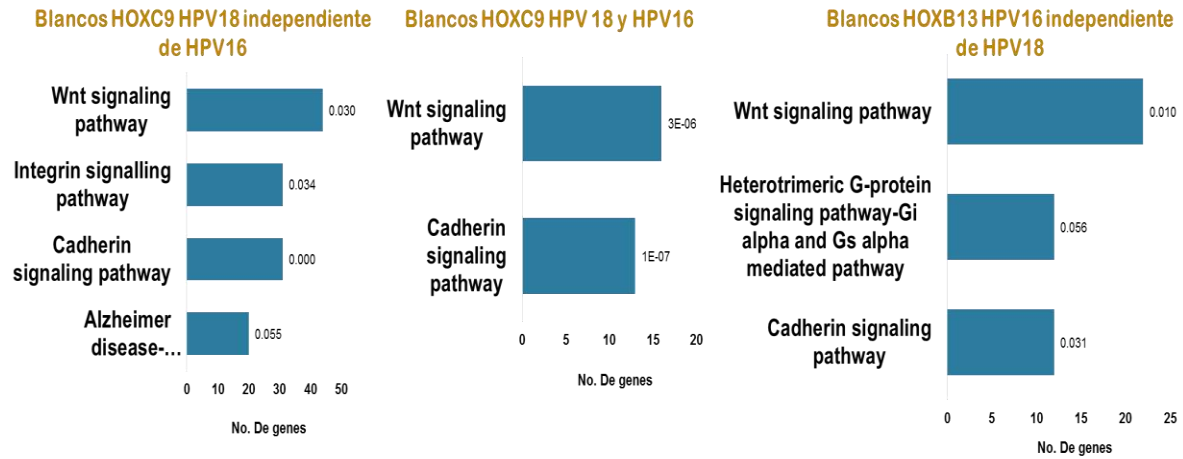


Figura 33. Vías moleculares relacionadas con genes blanco de HOXC9 en relación a VPH. Se graficaron las anotaciones enriquecidas por el análisis de DAVID-PANTHER. Los valores junto a las barras representan el valor de p en el agrupamiento de cada anotación.

Identificación de los potenciales blancos génicos activos transcripcionalmente de HOXB13 y HOXC9 en Hela

Con la finalidad de identificar los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 potencialmente activos transcripcionalmente se analizaron los promotores de genes con valores de FDR<0.05 para HOXC9 (2212) y HOXB13 (549) y compararlos con los promotores ocupados por la RNAPol IIp FDR<0.25 (7581) se encontró que 313 de los blancos génicos de HOXB13 se encuentran ocupados por la RNA pol IIp, 1033 promotores blanco de HOXC9 y RNAPol IIp y finalmente 107 promotores ocupados por HOXB13-HOXC9-RNAPol IIp (figura 34).

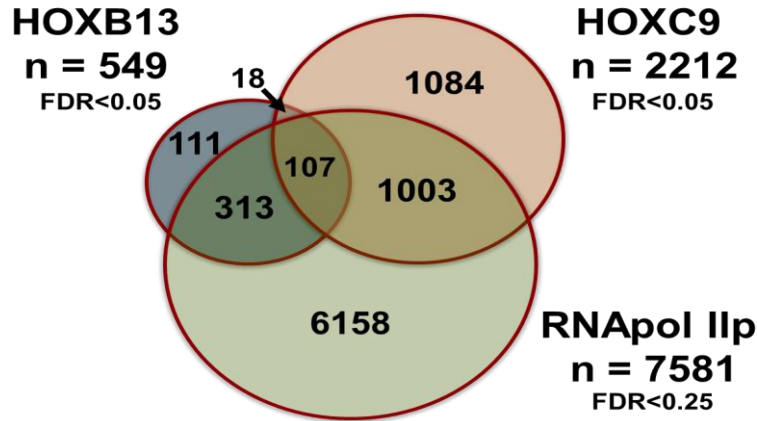


Figura 34. Genes blanco de HOXB13 y HOXC9 potencialmente activos por posicionamiento de RNAPol IIp. Diagrama de Venn con los genes que fueron identificados con picos de posicionamiento de manera exclusiva por HOXB13 o HOXC9 y genes con posicionamiento de los dos factores de transcripción y comparación con los genes identificados con posicionamiento de RNAPol IIp. Los valores de FDR para los blancos de HOX es <0.05 y de RNAPol IIp <0.25.

Vías moleculares asociadas a los blancos génicos potencialmente activos

transcripcionalmente de HOXB13, HOXC9 y HOXB13-HOXC9 en células HeLa

Posteriormente se realizó el análisis de anotaciones con PANTHER PATHWAY y se determinó que los blancos génicos de HOXB13 potencialmente activos por presencia de la RNAPol IIp se encuentran dentro de la vía de FGF. En el caso de los blancos potencialmente activos de HOXC9 las vías enriquecidas fueron WNT y Cadherinas. Por último los genes regulados por ambos factores de transcripción y la RNAPol IIp muestran enriquecimiento de la vía de WNT y Cadherinas (figura 35).

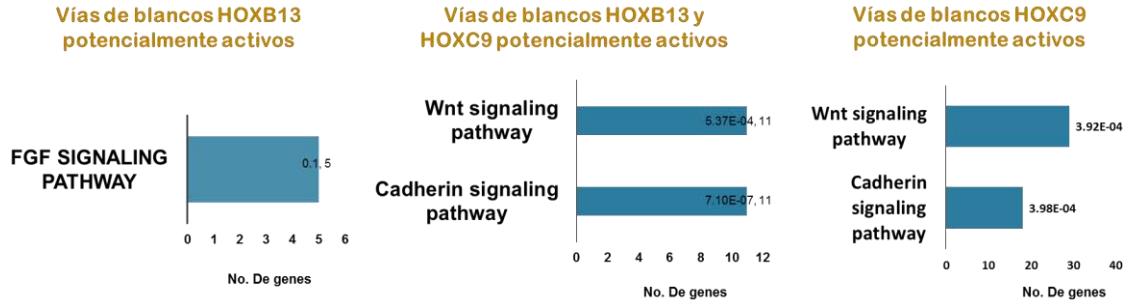


Figura 35. Vías moleculares relacionadas con genes blanco de HOXC9 potencialmente activas transcripcionalmente. Se graficaron las anotaciones enriquecidas por el análisis de DAVID-PANTHER de los genes identificados con picos de posicionamiento para HOXB13, HOXC9 y RNAPol IIp. Los valores junto a las barras representan el valor de p en el agrupamiento de cada anotación.

Validación de resultados

Se realizó la validación de los resultados por CHIP-PCR de genes relacionados con la vía WNT (WNT1, WNT2, HOXA5, HOXA4) y KRAS utilizando ADN inmunoprecipitado con HOXB13, HOXC9 y RNAPol IIp para compararlo con su respectivo input. Los datos fueron consistentes con análisis estadístico y mapa de picos para cada microarreglo de promotores. Ejemplo de los resultados se muestran en la figura 36c donde se presentan los picos de posicionamiento por HOXC9 en el promotor de WNT1 de CaSki y en 33d el mapa de picos de HOXB13 sobre el promotor de HOXA5 con enriquecimiento y abajo el mapa de picos de RNAPol IIp en el mismo promotor, lo cual concuerda con los datos obtenidos por CHIP-PCR (figura 36).

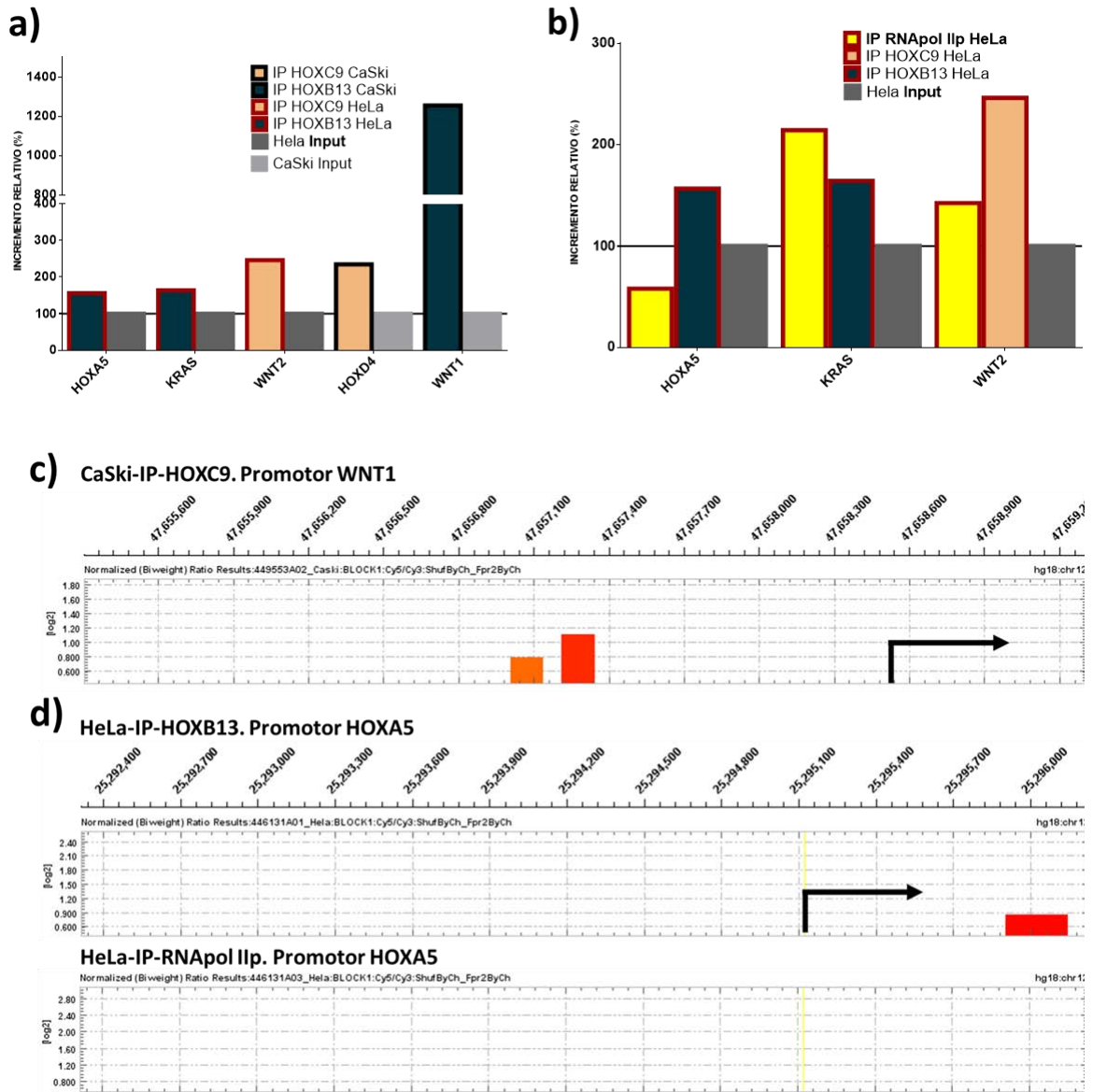


Figura 36. Ensayos de validación del enriquecimiento en secuencias promotoras como blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en líneas celulares de CaCU, HeLa y CaSki. En A, se muestran la comparación entre los valores de amplificación por PCR en tiempo real a partir del ADN inmunoprecipitado por los factores de transcripción HOXB13 y HOXC9 en HeLa y CaSki respecto al ADN Input de cada línea celular. B, comparación entre el ADN inmunoprecipitados por HOXB13, HOXC9 y RNAPol IIp en HeLa, se observa un mayor enriquecimiento de RNAPol IIp en las secuencias promotor de WNT2 y KRAS en contraste con el promotor de HOXA5. C, mapas de posicionamiento en la región promotor de WNT1 generado por análisis de microarreglos donde se observa el enriquecimiento por posicionamiento de HOXC9 en HeLa (barras en color naranja) lo cual concuerda con los resultados mostrados en el inciso a). En d) se puede observar en el panel superior, enriquecimiento por el ADN inmunoprecipitado de HOXB13 (barra en rojo) en contraste con el inmunoprecipitado de RNAPol IIp donde no se observa enriquecimiento, lo cual concuerda con los resultados de B.

En general de los datos obtenidos se pueden relacionar entre si al revisar las funciones moleculares que tienen los blancos de HOXB13 y HOXC9 así como las vías asociadas con procesos biológico vinculados con cáncer, en este caso en particular a CaCU considerando las diferencias en las líneas celulares analizadas, sea epitelio escamoso o glandular y tipo viral presente, VPH16 o VPH18 respectivamente.

En el caso de Hela, en células de origen epitelial glandular con VPH18 las funciones moleculares enriquecidas por los genes regulados de manera exclusiva por HOXB13 son proteínas con función de receptor y proteínas de unión a selectores de calcio, mientras que los principales procesos biológicos con enriquecimiento de anotaciones son receptores de superficie y ciclo celular. En cuanto a HOXC9, las principales funciones moleculares factores de transcripción, en particular homeóticos, cadherinas e histonas, mientras los principales procesos biológicos fueron el metabolismo de nucleótidos, regulación de la transcripción a nivel de ARNm, empaquetamiento de la cromatina y neurogénesis. En ambos caso HOXB13 y HOXC9 regulan blancos génicos con función de moléculas de adhesión, proteínas del citoesqueleto, matriz extracelular y proteínas de selección de calcio y los procesos biológicos relacionados con los genes regulados por los dos factores de transcripción fueron procesos del desarrollo, en particular del mesodermo y ectodermo, transducción de señales, comunicación celular y adhesión celular.

En relación a CaSki, en células de origen epitelial escamoso con VPH16 las funciones moleculares reguladas por blancos de HOXB13 fueron factores de transcripción y proteínas de matriz extracelular. En cuanto a HOXC9 funciones

moleculares como proteínas de citoesqueleto, proteasas, y cadherinas resultaron con enriquecimiento por los genes con estas anotaciones. Particularmente en el caso de CaSki los procesos biológicos enriquecidos por los blancos de HOXB13 y HOXC9 resultaron ser muy similares; transducción de señales, procesos del desarrollo, neurogénesis, comunicación celular, regulación de la transcripción a nivel de ARNm y adhesión celular.

En los dos modelos celulares y de manera independiente al origen epitelial y tipo viral las principales vías moleculares relacionadas con HOXB13 y HOXC9 fueron cadherinas y WNT.

DISCUSIÓN

En el laboratorio se ha identificado incremento gradual en la expresión de las proteínas HOXB13 y HOXC9 en lesiones precursoras y CaCU³⁴, las cuales son factores de transcripción, cuyos blancos génicos se desconocen en dicho modelo se desconocen. En el presente trabajo llevamos a cabo la identificación de los potenciales genes blanco de estas proteínas por medio de ChIP-chip.

Se logró identificar los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 además de realizar el análisis de anotaciones para determinar de manera bioinformática como pueden estar involucrados en el fenotipo neoplásico de líneas celulares derivadas de epitelios escamoso y glandular de CaCU infectadas con los dos tipos virales más frecuentes en este cáncer, VPH16 y VPH18.

Los blancos génicos identificados para HOXB13 y HOXC9 en las líneas celulares de CaCU están relacionados principalmente con las vías WNT y Cadherinas, por ejemplo WNT8B, WNT1, WNT2, WNT4, WNT5A y WNT5B fueron identificados con picos de posicionamiento con valores de $FDR < 0.05$, sin embargo otros genes de la familia WNT también mostraron posicionamiento con valores de $FDR > 0.05$ como WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT6B, WNT7A, WNT9B, WNT10B y WNT16. Es importante destacar que hasta el momento no hay reportes de WNT2, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT8B y WNT9B en CaCU, además a pesar de que tanto HOXB13 como HOXC9 tienen como genes blancos a miembros de la familia WNT, existen diferencias y similitudes en el posicionamiento como se muestra en la tabla 2 donde además de organizarse los 19 genes de la familia WNT en humanos

respecto al posicionamiento de HOXB13 y HOXC9, los genes se agrupan de acuerdo a su participación en la vía canónica y no canónica de WNT, ejemplo de esto es que HOXB13 se posiciona sobre el promotor de WNT8B (vía canónica), HOXC9 en WNT2, WNT4, WNT5A , WNT5B (vía canónica y no canónica) y en conjunto HOXB13 y HOXC9 se posicionan sobre WNT1 (vía canónica).

La vía WNT está asociada con diferentes procesos celulares como proliferación, destino celular y al mantenimiento de la homeostasis en el tejido por lo cual las alteraciones en la vía se han vinculado con el desarrollo de cáncer^{63 64}. De manera general la vía WNT regula diferentes procesos biológicos por medio de la vía canónica que involucra a β -Catenina y la no-canónica⁶⁵ que no está del todo definida pero se asocia con la adhesión y polaridad celular además de mecanismos dependientes de Ca^{+66} . La regulación de la vía canónica se lleva a cabo por la acumulación o degradación de la β -catenina en citoplasma. Este proceso es mediado por el complejo AXIN/APC/GSK3/CK1, de los cuales GSK3 y CK1 fosforilan a β -catenina permitiendo que sea reconocida por β -TRCP y ubiquitinada por U3 para finalmente ser degradado mediante proteosoma. La activación de la vía depende de la unión de WNT con el dominio extracelular de las proteínas de membrana Frizzled (Fz) y LRP5-6, esto permite la asociación LRP5-6/WNT/Fz, de este modo, CK1 y GSK3 en el citoplasma pueden fosforilar el dominio intracelular de LRP5-6 generando el reclutamiento de AXIN junto con DVL para evitar la fosforilación de β -catenina por el complejo de AXIN. La acumulación de β -catenina en el citoplasma permite su translocación a núcleo donde se asocia a TCF para activar sus genes blanco en colaboración con proteínas relacionadas con el

remodelamiento de la cromatina (SWI/SNF, MLL1/2, p300/CBP)^{iError!} Marcador no definido.

	Vía canónica	Vía no canónica	No determinado
HeLa - HOXB13	WNT8B**	WNT6*	WNT2B*
HeLa - HOXC9	WNT2** WNT3A*	WNT4** WNT5A** WNT7A*	WNT2B* WNT9B**
HeLa - RNAPol IIp		WNT6*	WNT2B*
CaSki - HOXB13	WNT1** WNT3* WNT10B*		WNT9B*
CaSki - HOXC9	WNT1**	WNT5B**	WNT9B* WNT16*
No identificados	WNT8A WNT10A	WNT7B WNT11	WNT9A

Tabla 2. Promotores de genes WNT identificados como blancos de HOXB13 y HOXC9 y su clasificación en las vías canónica y no canónica. Se enlistan los 19 genes de la familia WNT en humanos de los cuales 14 presentaron picos de posicionamiento por HOXB13, HOXC9 y RNAPol IIp. **Picos con valores de FDR<0.05, *Picos con valores en el rango de FDR>0.05 y 0.25. En rojo se indican los genes que ya han sido reportados en el modelo de cáncer de cérvix.

Alteraciones en la vía WNT en CaCU ya han sido reportadas^{18 67}, Üren en 2005 plantea que además de la infección de VPH es necesaria la activación de la vía canónica de WNT para que se genere la transformación en CaCU ya que en cultivos primarios de keratinocitos de prepucio inmortalizados con E6 de VPH16 y transformados por el antígeno T de SV40, se observó incremento en el nivel de β -catenina citoplasmática asociada al incremento en el número de unidades formadoras de colonias en los cultivos. El mismo efecto se observó al inducir la vía WNT por transfección de WNT1⁶⁸. En contraste, Ramos en 2015 reporta que la activación de la vía canónica de WNT es un evento posterior a la inactivación de la vía no canónica, ya que en líneas celulares derivadas de CaCU; SiHA (VPH16+) y

HeLa (VPH18+) identifico la regulación a la alta y a la baja de 15 y 23 genes respectivamente, involucrados en la vía WNT, dentro de los cuales, el nivel de expresión de WNT7A (gen relacionado con la vía no canónica) fue disminuido en comparación con los controles normales (línea celular inmortalizada derivada de keratinocitos y citologías cervicales sin alteraciones neoplásicas VPH-), adicionalmente se observó el incremento en la metilación del promotor de WNT7A lo cual pudiera estar relacionado con la inactivación del gen. Cuando se restauró la expresión de WNT7A por la expresión constitutiva inducida vector Tet-On, la expresión de WNT7A se asoció al decremento en la proliferación y en la migración celular^{Error! Marcador no definido.}. De acuerdo a estos antecedentes, alteraciones en la activación o inactivación de la vía WNT sea de manera canónica o no canónica es un mecanismo asociado a la presencia de VPH de alto riesgo oncogénico y con los datos obtenidos por microarreglos de promotores en este trabajo, se aporta información útil para dilucidar los posibles mecanismos que pueden estar favoreciendo la activación o represión transcripcional de los genes de la vía WNT.

A revisar a detalle el mapa de picos de HOXB13 y HOXC9 sobre los 19 genes de la familia WNT en Humano se observó el posicionamiento en 14 promotores de los cuales WNT6 y WNT2B también presentaron el posicionamiento de la RNAPol II sugiriendo que pueden estar activos transcripcionalmente, la expresión de estos genes ya ha sido reportada en HeLa a nivel de RNA^{69 70} por otra parte, en el promotor de WNT7A de HeLa no hay posicionamiento por RNAPol-IIp indicando que probablemente no se esté llevando a cabo la transcripción tal como fue reportada por Ramos (Tabla 1).

Los reportes sobre la función específica de WNT en CaCU son pocos. ^{71 72} sin embargo, trabajos realizados en embriones de ratón han permitido conocer la función que desempeñan durante el desarrollo del tracto reproductivo femenino (TRF) en conjunto con los genes HOX del cluster A^{73 74}. La expresión de WNT4 es requerida para el inicio en la formación de los ductos de Müller que dan origen al aparato reproductor femenino, la expresión se mantiene en células mesenquimales del útero al nacimiento y durante la diferenciación post - natal en células epiteliales escamosas. La expresión de WNT7A en los recién nacidos se da en epitelio estratificado del útero, cérvix y vagina, en la diferenciación post – natal WNT5A es necesario para la formación de glándulas en TRF y, al igual que WNT7A es expresado en las trompas de Falopio y células del estroma para continuar con la diferenciación y generar el patrón anteroposterior en colaboración con HOXA10, HOXA11 y HOXA13. En los datos presentados en este trabajo; WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6 y WNT7A fueron identificados con picos de posicionamiento por HOXC9 en HeLa. Estos genes están clasificados en la vía no canónica de WNT que se relaciona con la modulación del movimiento celular, activación de mecanismos dependientes de Calcio y polaridad celular. Cabe destacar que el análisis por DAVID para procesos biológicos y función molecular de los blancos de HOXC9 y HOXB13 en HeLa y CaSki, muestran enriquecimiento en anotaciones como procesos del desarrollo embrionario, proteínas tirosina cinasas, receptores acoplados a proteínas G, proteínas G selectoras de Ca⁺, proteínas de unión a Ca⁺, proteínas de citoesqueleto y moléculas de adhesión celular. Esto abre el panorama de los posibles mecanismos celulares potencialmente regulados por HOXB13 y HOXC9

en CaCU, ya que WNT participa en la organización de los epitelios promoviendo la polarización de las células a través de señales generadas por receptores tirosina cinasa y proteínas G que permiten la transducción de información para generar la reorganización del citoesqueleto^{Error! Marcador no definido. 75 76}.

Como se ha revisado en este trabajo, los genes HOX son esenciales durante el desarrollo embrionario para generar la identidad celular y epitelial regulando o colaborando con factores de transcripción (receptores de hormonas), activadores de vías moleculares (WNT) que se asocian a procesos biológicos; proliferación y migración celular por la expresión de genes como las Cadherinas⁷⁷. Con los análisis de expresión realizados en el modelo de CaCU se han logrado reconocer procesos moleculares que se activan o inactivan diferencialmente en lesiones precursoras y CaCU respecto a tejido normal^{28 32 33} ^{Error! Marcador no definido.} ^{Error! Marcador no definido.} ^{Error! Marcador no definido.}. Con los datos generados por análisis de anotaciones que hemos realizado, se observa que HOXB13 y HOXC9 pueden estar involucrados en la regulación de estas alteraciones. Con esto se resalta la importancia de continuar explorando el papel de los genes HOX en la biología del cáncer de cérvix ya que como se ha demostrado en nuestro laboratorio³⁴ ^{Error! Marcador no definido.}, el incremento en la expresión de estas proteínas es gradual durante el desarrollo de la enfermedad. En este sentido, HOXB13 y HOXC9 al incrementar su expresión pueden estar favoreciendo el desarrollo de tumores Alterando la regulación de sus genes blanco los cuales en este trabajo se han identificado y asociado a procesos biológicos como ciclo celular, adhesión celular así como vías moleculares relacionadas con la proliferación y diferenciación ya que en otros tipos de cáncer

como en neuroblastoma y mama el incremento en su expresión ha sido útil para su uso como marcadores pronóstico **¡Error! Marcador no definido. ¡Error! Marcador no definido.**

En CaCU el factor etiológico para el desarrollo de la enfermedad es la infección de VPH en particular por la expresión de la oncoproteínas E6 y E7⁴⁹. El secuestro de pRB por E7 lo favorece que E2F active la transcripción de genes relacionados con la progresión del ciclo celular¹⁰. En un análisis bioinformático validado por PCR en células troncales de humano se ha propuesto que E2F1 regula genes involucrados en la vía canónica de WNT y cadherinas⁷⁸, así como en otros reportes se relaciona con la regulación de la transcripción, proteínas nucleares y moléculas de adhesión**¡Error! Marcador no definido.** En keratinocitos se ha observado que E7 interactúa con E2F6 y proteínas de PRC, esta interacción se traduce en el incremento de cuerpos Polycomb (acumulados de proteínas de PRC en regiones de heterocromatina) en el núcleo**¡Error! Marcador no definido.** Posteriores trabajos en keratinocitos transfectados con E6 y E7 de VPH16, demuestran que la expresión de las oncoproteínas promueve la expresión de KDM6A / KDM6B y se reduce la actividad de histona metil transferasa de Ezh2 promoviendo la alteración en el patrón de expresión de genes HOX que son regulados por Polycomb⁵³ **¡Error! Marcador no definido.** De este modo, la expresión desregulada de las oncoproteínas E6 y E7 tiene impacto en la regulación de diferentes procesos moleculares dentro de la célula a distintos niveles jerárquicos de regulación.

En este estudio, identificamos por primera vez, genes potencialmente regulados por los factores de transcripción HOXB13 y HOXC9 en el modelo de CaCU, identificando genes enriquecidos en vías como WNT, por lo que es necesario

realizar estudios funcionales para la caracterización del efecto de la sobreexpresión de los genes HOX y la vía WNT en el contexto de la infección por VPH.

Por otra parte, las Cadherinas son una superfamilia de proteínas dentro de la cual se encuentra la subfamilia de las Protocadherinas (PCDH). Estas, son moléculas de adhesión organizadas en *clusters* en el cromosoma 5 cada *cluster* es regulado por diferentes promotores que a su vez regulan diferentes regiones variables, las cuales mediante diferentes sitios de *splicing* pueden generar más de mil variantes de las PCDH. El mayor nivel de expresión de las PCDH se lleva a cabo durante la neurogénesis y son utilizadas por la célula como clave de reconocimiento para interactuar con células vecinas por medio de la unión con integrinas⁷⁹. En CaCU se analizó el perfil genómico de metilación por micro arreglos con los cuales se identificaron metilados y silenciados 12 miembros de la subfamilia de PCDH de los cuales PCDHA4 y PCDHA13 resultaron incrementar su nivel de metilación conforme el grado de progresión de lesiones precursoras y CaCU (199 muestras incluyendo controles). Al analizar la detección de Neoplasias Intraepiteliales Cervicales III (NIC III) y CaCU en combinación con la detección de VPH, el nivel de metilación de PCDHA4 incrementó los niveles de especificidad para el diagnóstico⁸⁰ en comparación con la detección de VPH de manera independiente. Considerando los resultados previos y los obtenidos en nuestro laboratorio, sobre el incremento en la expresión de HOXB13 y HOXC9 conforme el grado progresión de CaCU y lesiones precursoras, es probable que tanto HOXB13 como HOXC9 estén relacionados con la represión de algunas de las protocadherinas analizadas en el reporte mencionado

ya que PCDHA4 y PCDHA13 fueron identificados como blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 en HeLa.

Se sabe que existen similitudes y diferencias en las alteraciones moleculares entre los epitelios escamoso y glandular de CaCU, un ejemplo de esto son los resultados obtenidos por Wright en 2013. En su trabajo utilizaron la plataforma Oncomap para analizar 1250 mutaciones conocidas en 139 genes de 89 muestras (adenocarcinoma y cáncer escamoso) donde se determinó que en epitelio escamoso, la mutación más frecuente es en EGFR, en epitelio glandular en KRAS, mientras que mutaciones de PIK3A se encontraron en ambos tipos epiteliales, estos datos fueron confirmados por secuenciación masiva⁸¹ dejando claro que existen diferencias en las características moleculares de los tejidos epitelial y glandular de CaCU a nivel de mutación. En el presente trabajo encontramos diferencias en las vías moleculares enriquecidas por los genes regulados HOXB13 ya sea en base a los diferentes tipos virales VP18 y VPH16 o por los diferentes orígenes epiteliales de las líneas celulares HeLa y CaSki respectivamente. En HeLa (VPH18), la principal vía molecular asociada a los blancos de HOXB13 fue KRAS y en CaSki la vía de Notch. Las mutaciones de KRAS en CaCU se han asociado a tumores en etapas avanzadas, incremento en el riesgo de metástasis a distancia y menor probabilidad de supervivencia⁸². La vía de Notch está relacionada con la diferenciación celular⁸³ y en CaCU se ha asociado a la baja probabilidad de supervivencia (60 meses) en tumores estadio IV⁸⁴, incluso se ha reportado que la activación de esta vía por VPH ocurre a través de mecanismos relacionados a E6⁸⁵. En contraste, los genes blanco de HOXC9 en HeLa y CaSki no presentan relación con alguna vía en

particular de acuerdo al tipo viral u origen epitelial de las células, ya que en ambos casos las vías moleculares con mayor número de genes involucrados son Cadherinas y WNT. Estas dos vías también muestran enriquecimiento por los blancos de HOXB13 pero con menor número de genes relacionados con las vías moleculares.

CONCLUSIONES

De acuerdo al análisis realizado en este trabajo los blancos génicos de HOXB13 y HOXC9 tienen funciones moleculares como factores de transcripción, proteínas asociadas a la regulación en los niveles de Ca⁺, proteínas de adhesión, proteínas de transducción de señales y proteínas asociadas a la regulación de la transcripción, además, estos genes participan en diferentes vías moleculares como EGF, AKT, NOTCH, Cadherinas, WNT.

En base al análisis realizado en el presente trabajo y resultados previos reportados sobre la alteración en el nivel de expresión de HOXB13 y HOXC9, es probable que estos dos factores de transcripción estén relacionados con la modulación de la vía canónica y no canónica de WNT por la regulación de genes como WNT1, WNT2, WNT4, WNT5A, WNT5B y WNT8B de los cuales aún no hay reportes sobre su función en el modelo de CaCU.

Literatura citada

- ¹ Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year
- ² Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*, 127(12), 2893-2917.
- ³ <http://www.paho.org/>
- ⁴ Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. J. L. M., & Shah, K. V. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of clinical pathology*, 55(4), 244-265.
- ⁵ Nobbenhuis, M. A., Helmerhorst, T. J., van den Brule, A. J., Rozendaal, L., Voorhorst, F. J., Bezemer, P. D., ... & Meijer, C. J. (2001). Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *The Lancet*, 358(9295), 1782-1783.
- ⁶ Kjaer, S., Høgdall, E., Frederiksen, K., Munk, C., van den Brule, A., Svare, E., ... & Iftner, T. (2006). The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period. *Cancer research*, 66(21), 10630-10636.
- ⁷ Castellsagué, X. (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic oncology*, 110(3), S4-S7.
- ⁸ De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27.
- ⁹ Lu, X., Lin, Q., Lin, M., Duan, P., Ye, L., Chen, J., ... & Xue, X. (2014). Multiple-Integrations of HPV16 Genome and Altered Transcription of Viral Oncogenes and Cellular Genes Are Associated with the Development of Cervical Cancer. *PloS one*, 9(7), e97588.
- ¹⁰ Munger, K., & Jones, D. L. (2015). Human Papillomavirus Carcinogenesis: an Identity Crisis in the Retinoblastoma Tumor Suppressor Pathway. *Journal of virology*, 89(9), 4708-4711.
- ¹¹ White, E. A., Walther, J., Javanbakht, H., & Howley, P. M. (2014). Genus beta human papillomavirus E6 proteins vary in their effects on the transactivation of p53 target genes. *Journal of virology*, 88(15), 8201-8212.
- ¹² Hu, Z., Zhu, D., Wang, W., Li, W., Jia, W., Zeng, X., ... & Ma, D. (2015). Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nature genetics*.

-
- ¹³ Ojesina, A. I., Lichtenstein, L., Freeman, S. S., Peadarallu, C. S., Imaz-Rosshandler, I., Pugh, T. J., ... & Vintermyr, O. K. (2014). Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*, *506*(7488), 371-375.
- ¹⁴ Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science*, *110*, 525-541.
- ¹⁵ Badal, V., Chuang, L. S., Tan, E. H. H., Badal, S., Villa, L. L., Wheeler, C. M., ... & Bernard, H. U. (2003). CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *Journal of virology*, *77*(11), 6227-6234.
- ¹⁶ Zhai, Y., Kuick, R., Nan, B., Ota, I., Weiss, S. J., Trimble, C. L., ... & Cho, K. R. (2007). Gene expression analysis of preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinomas identifies HOXC10 as a key mediator of invasion. *Cancer research*, *67*(21), 10163-10172.
- ¹⁷ Negrini, M., Nicoloso, M. S., & Calin, G. A. (2009). MicroRNAs and cancer—new paradigms in molecular oncology. *Current opinion in cell biology*, *21*(3), 470-479.
- ¹⁸ Pérez-Plasencia, Carlos, et al. "Genome wide expression analysis in HPV16 cervical cancer: identification of altered metabolic pathways." *Infect Agent Cancer* 2 (2007): 16.
- ¹⁹ Prusty, B. K., & Das, B. C. (2005). Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *International journal of cancer*, *113*(6), 951-960.
- ²⁰ Prusty, B. K., & Das, B. C. (2005). Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *International journal of cancer*, *113*(6), 951-960.
- ²¹ Rita de Cássia, S. A., Meurer, R. T., & Roehle, A. V. (2014). MYC amplification is associated with poor survival in small cell lung cancer: a chromogenic in situ hybridization study. *Journal of cancer research and clinical oncology*, *140*(12), 2021-2025.
- ²² Bracken, A. P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., & Helin, K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *The EMBO journal*, *22*(20), 5323-5335.
- ²³ Polager, S., & Ginsberg, D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. *Nature Reviews Cancer*, *9*(10), 738-748.
- ²⁴ O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., & Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *nature*, *435*(7043), 839-843.
- ²⁵ O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., & Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *nature*, *435*(7043), 839-843.
- ²⁶ Darnell, J. E. (2002). Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, *2*(10), 740-749.
- ²⁷ Bhatlekar, S., Fields, J. Z., & Boman, B. M. (2014). HOX genes and their role in the development of human cancers. *Journal of Molecular Medicine*, *92*(8), 811-823.
- ²⁸ Shim, C., Zhang, W., Rhee, C. H., & Lee, J. H. (1998). Profiling of differentially expressed genes in human primary cervical cancer by complementary DNA expression array. *Clinical cancer research*, *4*(12), 3045-3050.
- ²⁹ Alami, Y., Castronovo, V., Belotti, D., Flagiello, D., & Clausse, N. (1999). HOXC5 and HOXC8 expression are selectively turned on in human cervical cancer cells compared to normal keratinocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, *257*(3), 738-745.
- ³⁰ Hung, Y. C., Ueda, M., Terai, Y., Kumagai, K., Ueki, K., Kanda, K., ... & Ueki, M. (2003). Homeobox gene expression and mutation in cervical carcinoma cells. *Cancer science*, *94*(5), 437-441.
- ³¹ Lopez, R., Garrido, E., Vazquez, G., Pina, P., Perez, C., Alvarado, I., & Salcedo, M. (2006). A subgroup of HOX Abd-B gene is differentially expressed in cervical cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, *16*(3), 1289-1296.

-
- ³² Lopez, R., Garrido, E., Pina, P., Hidalgo, A., Lazos, M., Ochoa, R., & Salcedo, M. (2006). HOXB homeobox gene expression in cervical carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer*, 16(1), 329-335.
- ³³ Barba-de la Rosa, A. P., Briones-Cerecero, E., Lugo-Melchor, O., De León-Rodríguez, A., Santos, L., Castelo-Ruelas, J., ... & Salcedo, M. (2012). Hox B4 as potential marker of non-differentiated cells in human cervical cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 138(2), 293-300.
- ³⁴ Gonzalez-Herrera, A. L., Salgado-Bernabe, M., Velazquez-Velazquez, C. K., Salcedo-Vargas, M., Andrade-Manzano, A., Avila-Moreno, F., & Pina-Sanchez, P. (2015). Increased Expression of HOXB2 and HOXB13 Proteins is Associated with HPV Infection and Cervical Cancer Progression. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(4), 1349-1353.
- ³⁵ Ferrier, D. E., & Holland, P. W. (2001). Ancient origin of the Hox gene cluster. *Nature Reviews Genetics*, 2(1), 33-38.
- ³⁶ Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 276(5688), 565-570.
- ³⁷ Apiou, F., Flagiello, D., Cillo, C., Malfoy, B., Poupon, M. F., & Dutrillaux, B. (1996). Fine mapping of human HOX gene clusters. *Cytogenetic and Genome Research*, 73(1-2), 114-115.
- ³⁸ Lappin, T. R., Grier, D. G., Thompson, A., & Halliday, H. L. (2006). HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *The Ulster medical journal*, 75(1), 23.
- ³⁹ Mann, R. S., Lelli, K. M., & Joshi, R. (2009). Hox specificity: unique roles for cofactors and collaborators. *Current topics in developmental biology*, 88, 63-101.
- ⁴⁰ Taylor, H. S., Heuvel, G. V., & Igarashi, P. (1997). A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biology of reproduction*, 57(6), 1338-1345.
- ⁴¹ Kennison, J. A. (1993). Transcriptional activation of *Drosophila* homeotic genes form distant regulatory elements. *Trends in Genetics*, 9(3), 75-79.
- ⁴² Pirrotta, V. (1995). Chromatin complexes regulating gene expression in *Drosophila*. *Current opinion in genetics & development*, 5(4), 466-472.
- ⁴³ Mahmoudi, T., & Verrijzer, C. P. (2001). Chromatin silencing and activation by Polycomb and trithorax group proteins. *Oncogene*, 20(24), 3055-3066.
- ⁴⁴ Sauvageau, M., & Sauvageau, G. (2010). Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell stem cell*, 7(3), 299-313.
- ⁴⁵ Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., & Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*, 128(4), 735-745.
- ⁴⁶ Bosley, T. M., et al. "Clinical characterization of the HOXA1 syndrome BSAS variant." *Neurology* 69.12 (2007): 1245-1253.
- ⁴⁷ Muragaki, Yasuteru, et al. "Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13." *Science* 272.5261 (1996): 548-551.
- ⁴⁸ Ghannam, G., Takeda, A., Camarata, T., Moore, M. A., Viale, A., & Yaseen, N. R. (2004). The oncogene Nup98-HOXA9 induces gene transcription in myeloid cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 866-875.
- ⁴⁹ Decker, B., & Ostrander, E. A. (2014). Dysregulation of the homeobox transcription factor gene HOXB13: role in prostate cancer. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 7, 193.
- ⁵⁰ Norris, John D., et al. "The homeodomain protein HOXB13 regulates the cellular response to androgens." *Molecular cell* 36.3 (2009): 405-416.
- ⁵¹ Shah, Nilay, et al. "HOXB13 mediates tamoxifen resistance and invasiveness in human breast cancer by suppressing ERα and inducing IL-6 expression." *Cancer research* 73.17 (2013): 5449-5458.

-
- ⁵² Vargas, A. T., Suarez, S. A. O. (2010). Expresión de las proteínas HOXC9, HOXC12 y HOXD9 en lesiones del cérvix uterino y su relación con el virus de Papiloma Humano. Universidad Nacional Autónoma Metropolitana.
- ⁵³ Liu, Yueyang, et al. "Increased EZH2 expression is associated with proliferation and progression of cervical cancer and indicates a poor prognosis." *International Journal of Gynecological Pathology* 33.3 (2014): 218-224..
- ⁵⁴ McLaughlin-Drubin, M. E., Crum, C. P., & Münger, K. (2011). Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(5), 2130-2135.
- ⁵⁵ Hyland, P. L., McDade, S. S., McCloskey, R., Dickson, G. J., Arthur, K., McCance, D. J., & Patel, D. (2011). Evidence for alteration of EZH2, BMI1, and KDM6A and epigenetic reprogramming in human papillomavirus type 16 E6/E7-expressing keratinocytes. *Journal of virology*, 85(21), 10999-11006.
- ⁵⁶ Svingen, T., & Tonissen, K. F. (2006). Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity*, 97(2), 88-96.
- ⁵⁷ Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell*, 78(2), 191-201.
- ⁵⁸ Zakany, J., & Duboule, D. (2007). The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Current opinion in genetics & development*, 17(4), 359-366.
- ⁵⁹ Agrawal, P., Habib, F., Yelagandula, R., & Shashidhara, L. S. (2011). Genome-level identification of targets of Hox protein Ultrabithorax in *Drosophila*: novel mechanisms for target selection. *Scientific reports*, 1.
- ⁶⁰ Jung, Heekyung, et al. "Global control of motor neuron topography mediated by the repressive actions of a single hox gene." *Neuron* 67.5 (2010): 781-796.
- ⁶¹ Wang, Xiangwei, et al. "HOXC9 directly regulates distinct sets of genes to coordinate diverse cellular processes during neuronal differentiation." *BMC genomics* 14.1 (2013): 830.
- ⁶² Rinn, John L., et al. "A dermal HOX transcriptional program regulates site-specific epidermal fate." *Genes & development* 22.3 (2008): 303-307.
- ⁶³ MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell*, 17(1), 9-26.
- ⁶⁴ Klaus, A., & Birchmeier, W. (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(5), 387-398.
- ⁶⁵ Staal, F. J., Luis, T. C., & Tiemessen, M. M. (2008). WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nature Reviews Immunology*, 8(8), 581-593.
- ⁶⁶ Veeman, M. T., Axelrod, J. D., & Moon, R. T. (2003). A second canon: functions and mechanisms of β -catenin-independent Wnt signaling. *Developmental cell*, 5(3), 367-377.
- ⁶⁷ Ramos-Solano, Moisés, et al. "Expression of WNT genes in cervical cancer-derived cells: Implication of WNT7A in cell proliferation and migration." *Experimental cell research* (2015).
- ⁶⁸ Üren, A., Fallen, S., Yuan, H., Usubütün, A., Küçükali, T., Schlegel, R., & Toretsky, J. A. (2005). Activation of the canonical Wnt pathway during genital keratinocyte transformation: a model for cervical cancer progression. *Cancer research*, 65(14), 6199-6206.
- ⁶⁹ Kirikoshi, Hiroyuki, Hisahiko Sekihara, and Masaru Katoh. "WNT10A and WNT6, clustered in human chromosome 2q35 region with head-to-tail manner, are strongly coexpressed in SW480 cells." *Biochemical and biophysical research communications* 283.4 (2001): 798-805.
- ⁷⁰ Katoh, M., Kirikoshi, H., Saitoh, T., Sagara, N., & Koike, J. (2000). Alternative splicing of the WNT-2B/WNT-13 gene. *Biochemical and biophysical research communications*, 275(1), 209-216.
- ⁷¹ Lichtig, H., Gilboa, D. A., Jackman, A., Gonen, P., Levav-Cohen, Y., Haupt, Y., & Sherman, L. (2010). HPV16 E6 augments Wnt signaling in an E6AP-dependent manner. *Virology*, 396(1), 47-58.
- ⁷² Rampias, T., Boutati, E., Pectasides, E., Sasaki, C., Kountourakis, P., Weinberger, P., & Psyri, A. (2010). Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in

HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells. *Molecular Cancer Research*, 8(3), 433-443.

⁷³ Mericskay, M., Kitajewski, J., & Sassoon, D. (2004). Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development*, 131(9), 2061-2072.

⁷⁴ Miller, C., Pavlova, A., & Sassoon, D. A. (1998). Differential expression patterns of Wnt genes in the murine female reproductive tract during development and the estrous cycle. *Mechanisms of development*, 76(1), 91-99.

⁷⁵ Widelitz, R. (2005). Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. *Growth Factors*, 23(2), 111-116.

⁷⁶ Axelrod, J. D., & McNeill, H. (2002). Coupling planar cell polarity signaling to morphogenesis. *The Scientific World Journal*, 2, 434-454.

⁷⁷ Nelson, W. J., & Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways. *Science*, 303(5663), 1483-1487.

⁷⁸ Yeo, H. C., Beh, T. T., Quek, J. J., Koh, G., Chan, K. K., & Lee, D. Y. (2011). Integrated transcriptome and binding sites analysis implicates E2F in the regulation of self-renewal in human pluripotent stem cells. *PLoS one*, 6(11), e27231-e27231.

⁷⁹ Yagi, T. (2008). Clustered protocadherin family. *Development, growth & differentiation*, 50(s1), S131-S140.

⁸⁰ Wang, K. H., Lin, C. J., Liu, C. J., Liu, D. W., Huang, R. L., Ding, D. C., ... & Chu, T. Y. (2015). Global methylation silencing of clustered proto-cadherin genes in cervical cancer: serving as diagnostic markers comparable to HPV. *Cancer medicine*, 4(1), 43-55.

⁸¹ Wright A., Howitt BE., Myers A., Dahlberg S., Palescandolo E., Van Hummelen P., MacConaill L., Shoni M., Wagle N., Jones R., Quick C., Laury A., Katz I., Hahn W., Matulonis U., Hirsch M. (2013). Oncogenic mutations in cervical cancer: genomic differences between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix. *Cancer*. 119(21):3776-83.

⁸² Wegman, P., Ahlin, C., & Sorbe, B. (2011). Genetic alterations in the K-Ras gene influence the prognosis in patients with cervical cancer treated by radiotherapy. *International Journal of Gynecological Cancer*, 21(1), 86-91.

⁸³ Erard C., Santos C., Tracey S. (2013) Notch signaling in pathogenesis of diseases. *Am J Biomed* 1(2):19–22

⁸⁴ Yousif, N. G., Sadiq, A. M., Yousif, M. G., Al-Mudhafar, R. H., Al-Baghdadi, J. J., & Hadi, N. (2015). Notch1 ligand signaling pathway activated in cervical cancer: poor prognosis with high-level JAG1/Notch1. *Archives of gynecology and obstetrics*, 1-6.

⁸⁵ Chen, J. (2015). Signaling pathways in HPV-associated cancers and therapeutic implications. *Reviews in medical virology*, 25(S1), 24-53.