



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

***EXPRESIÓN ALTERADA DE miR-21 Y miR-143 POR
EFECTO DE LA ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH-16 Y EL
17 β -ESTRADIOL EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER
CERVICAL***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. B. YAZMÍN GÓMEZ GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. PATRICIO GARIGLIO PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR
DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. MARCELA LIZANO SOBERON INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Presidente:

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

Secretario:

Dr. Patricio Gariglio

Vocal:

Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas

Vocal:

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Vocal:

Dr. Juan Miranda Ríos

El trabajo experimental de esta tesis fue desarrollado principalmente en el laboratorio del Dr. Patricio Gariglio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV).

Durante los estudios de posgrado se contó con el apoyo de una beca por parte del Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), número de apoyo 46244. También se recibió apoyo por parte del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP), para la asistencia a congresos. Sin estos apoyos hubiera sido materialmente imposible cumplir con el desarrollo del proyecto de investigación y el resto de las actividades académicas.

DEDICATORIA

A:

Mis padres, Alberto Gómez Pontifice (QEPD) y Quintina Gómez Wences, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

Mi esposo, Jorge Organista Nava mi pareja de vida y aventura, el mejor padre, por estar siempre conmigo en momentos difíciles y de alegría, y ser el mejor equipo de trabajo, sin ti no estaría llegando a cumplir este objetivo y finalizar con esta meta. Te amo.

Mi hijo Elliot Caleb Organista Gómez, que, aunque muy pequeño ha sabido darme el espacio y sus mejores momentos que me han motivado para finalizar esta meta.

Mis hermanas, Gabriela Gómez, Estefanía Gómez, Angélica Gómez, Jacinta Gómez y Yadira Gómez, por estar conmigo y apoyarme siempre, las quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS:

A mi director de tesis, el Dr. Patricio Gariglio Vidal, mi comité tutor; Dr. Alejandro García Carranca y Marcela Lizano Soberón, por sus valiosos consejos y apoyo para que este proyecto de tesis se desarrollara de la mejor manera. Gracias.

A los miembros del jurado de examen de grado, Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, Dr. Patricio Gariglio, Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas, Dra. Leticia Rocha Zavaleta y al Dr. Juan Miranda Ríos por sus valiosas observaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para mis estudios de posgrado y al Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP), por su apoyo para la asistencia a congresos.

Al Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez y la Dra. Berenice Illades Aguiar, por su apoyo incondicional en todo momento y guiarme de la mejor manera en el camino académico y personal. Muchas Gracias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, que a través de su programa de Doctorado En Ciencias Biomédicas sigue dando la oportunidad para superarnos y brindar nuestro mejor compromiso como Doctores comprometidos a la investigación y docencia para la formación de futuras generaciones. Gracias.

A todos mis amigos y demás familiares de quienes he recibido el mejor apoyo moral para motivarme y no dejarme vencer por todas las adversidades que enfrentamos durante este camino. Mil gracias.

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Expresión de miRNAs en cáncer cervical | 15 |
| Cuadro 2. Secuencias de los oligonucleótidos usados en este trabajo | 28 |
| Cuadro 3. Correlación de Pearson's entre la expresión de los miRNAs y los niveles de ARNm y proteína | 32 |
| | |
| Figure 1. Organización del genoma de los VPHs | 2 |
| Figura 2. Infección del epitelio escamoso por el VPH | 4 |
| Figura 3. Estructura de la oncoproteína E7 | 5 |
| Figura 4. La oncoproteína E7 afecta numerosos procesos celulares a través de interacciones con múltiples proteínas celulares | 6 |
| Figura 5. Vía de señalización del estrógeno | 10 |
| Figura 6. Biogénesis de los miRNAs | 13 |
| Figura 7. Efecto de la oncoproteína E7 del VPH-16, E ₂ , E7+E ₂ sobre los niveles de expresión de miR-21 y miR-143 en tejido cervical de ratones de 7 meses de edad | 31 |
| Figura 8. Niveles de expresión de PTEN y Bcl-2 en el modelo de cáncer cervical | 33 |
| Figura 9. Efecto de la oncoproteína E7 del VPH-16 sobre los niveles de expresión de miR-21 y miR-143 | 35 |
| Figura 10. La oncoproteína E7 del VPH-16 altera los niveles de PTEN y Bcl-2 ... | 36 |
| Figura 11. Expresión de miR-21 y miR-143 en pacientes con cáncer cervical y en mujeres sanas | 37 |
| Figura 12. Modelo que explica cómo la oncoproteína E7 del VPH-16 y el E ₂ alteran los niveles de miRNAs y los procesos celulares | 38 |

CONTENIDO

| | | |
|-------------|--|-----|
| I. | ABREVIACIONES | I |
| II. | RESUMEN | III |
| III. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 3.1. | CÁNCER CERVICAL Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO | 1 |
| 3.2. | CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS VPHs | 2 |
| 3.3. | CARACTERÍSTICAS DE LA ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH | 4 |
| 3.3.1. | FUNCIONES DE LA ONCOPROTEÍNA E7 DE LOS VPHS DE ALTO RIESGO | 5 |
| 3.4. | ESTRÓGENO Y CÁNCER CERVICAL | 9 |
| 3.5. | SINERGISMO ENTRE ESTRÓGENO Y ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH DE ALTO RIEGO EN EL DESARROLLO DE CÁNCER CERVICAL | 11 |
| 3.6. | miRNAs..... | 11 |
| 3.6.1. | BIOGÉNESIS Y FUNCIÓN DE LOS miRNAs | 11 |
| 3.6.2. | miRNAs Y CÁNCER CERVICAL | 13 |
| 3.6.3. | DISMINUCIÓN DE miRNAs SUPRESORES DE TUMOR EN CÁNCER CERVICAL | 14 |
| 3.6.4. | AUMENTO DE miRNAs ONCOGÉNICOS EN CÁNCER CERVICAL | 16 |
| 3.6.5. | VIRUS DE PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO ALTERA LA EXPRESIÓN DE miRNAs EN CÁNCER CERVICAL | 17 |
| 3.6.6. | REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs POR LA ONCOPROTEÍNA E7 | 18 |
| 3.6.7. | REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE miR-21 Y miR-143 POR LA ONCOPROTEÍNA E7 Y LOS ESTRÓGENOS | 19 |
| IV. | JUSTIFICACIÓN | 21 |
| V. | OBJETIVOS | 22 |
| VI. | DIAGRAMA DE TRABAJO | 23 |
| VII. | MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| 7.1. | MUESTRAS CLÍNICAS | 24 |
| 7.2. | LÍNEAS CELULARES | 24 |
| 7.3. | RATONES TRANSGÉNICOS | 25 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 7.4. | TRATAMIENTO HORMONAL | 25 |
| 7.5. | SACRIFICIO DE RATONES Y DISECCIÓN DEL TEJIDO CERVICAL | 26 |
| 7.6. | EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL | 26 |
| 7.7. | CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE miRNAS Y ARNm UTILIZANDO PCR EN TIEMPO REAL | 26 |
| 7.8. | WESTERN-BLOT | 28 |
| 7.9. | ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 29 |
| VIII. | RESULTADOS | 30 |
| 8.1. | LA ONCOPROTEÍNA E7 Y EL 17 β -ESTRADIOL AFECTAN LA EXPRESIÓN DE miR-21 Y miR-143 IN TEJIDO CERVICAL DEL RATÓN TRANSGÉNICO K14E7 | 30 |
| 8.2. | EXPRESIÓN DE GENES DIANA DE LOS miRNAS EN TEJIDO CERVICAL DEL RATÓN K14E7 | 31 |
| 8.3. | EL AUMENTO DE LOS NIVELES DE miR-21 EN PRESENCIA DE LA ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH-16 SE ASOCIA CON LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PTEN EN LA LÍNEA CELULAR SAOS-2. | 34 |
| 8.4. | LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE miR-143 EN PRESENCIA DE LA ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH-16 SE ASOCIA CON EL AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE Bcl-2 EN LA LÍNEA CELULAR SAOS-2. | 36 |
| 8.5. | LA EXPRESIÓN DE miR-21 Y miR-143 ES ALTERADA POR EL VPH-16 EN PACIENTES CON CÁNCER CERVICAL | 37 |
| IX. | DISCUSIÓN | 39 |
| X. | REFERENCIAS | 44 |

I. ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|--|
| ADN: | Ácido desoxirribonucleico |
| ARNm: | Ácido ribonucleico mensajero |
| ATM: | Ataxia telangectasia-mutada |
| CBP: | Proteína de unión a CREB |
| CC: | Cáncer cervical |
| CDK2: | Cinasa dependiente de ciclina 2 |
| CR: | Región conservada del VPH |
| CXXC: | Motivo de dedos de Zinc |
| DICER1: | Endonucleasa RNasa tipo III |
| DNMT1: | ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1 |
| E ₂ : | 17β-estradiol |
| E7: | Oncogén E7 |
| ERE: | Elementos de respuesta a estrógenos |
| ER _α : | Receptor de estrógenos alfa |
| ER _β : | Receptor de estrógenos beta |
| EZH2: | Potenciador del zeste homólogo 2 |
| HDAC: | Deacetilasa de histona |
| IFN: | Interferón |
| IFN _β : | Interferón beta |
| IRF1: | Factor regulador de interferón 1 |
| K14E7: | Modelo murino que expresa E7, bajo el promotor de citoqueratina 14 |
| LXCXE: | Motivo de unión a pRB |
| MAPK: | Proteínas cinasas activadas por mitógenos |
| MCP1: | Proteína 1 quimiotáctica de monocitos |
| miRNA: | microRNA |
| ORF: | Marco abierto de lectura |

| | |
|-----------------|--|
| p21: | Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1A |
| p27: | Inhibidor 1B de cinasa dependiente de ciclina |
| PDCD4: | Proteína de muerte celular programada 4 |
| PI3K: | Fosfatidilinositol 3 quinasa |
| pRb: | Proteína del retinoblastoma |
| PRC: | Complejo represor Polycomb |
| PTEN: | Homólogo de la fosfatasa y tensina |
| RT-qPCR: | Retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa |
| SDS-PAGE: | Electroforesis en gel de acrilamida con dodecil sulfato sódico |
| TAP1: | Transportador de procesamiento de antígenos 1 |
| TBP: | Proteína de unión a TATA |
| TNF- α : | Factor de necrosis tumoral alfa |
| TRBP: | Proteína de unión a RNA en respuesta a trans-activación |
| UTRs: | Región no traducible |
| VEGF: | Factor de crecimiento endotelial vascular |
| VPH: | Virus del papiloma humano |
| VPH-16: | Virus del papiloma humano tipo 16 |
| VPH-AR: | Virus del papiloma humano de alto riesgo |
| XPO5: | Exportina 5 |

II. RESUMEN

Los microRNAs (miRNAs) son una clase de ARNs no codificantes que regulan ARNm blanco a niveles post- y transcripcional, afectando así procesos importantes en el desarrollo del cáncer. Sin embargo, no se conoce acerca de los eventos moleculares que controlan la expresión de miRNAs en cáncer cervical (CC). La oncoproteína E7 del VPH-16 en conjunto con los estrógenos son suficientes para inducir displasia cervical de alto grado y cáncer invasor en un modelo murino. En este trabajo, se determinó el papel potencial que la oncoproteína E7 y el 17 β -estradiol (E₂) juegan en la desregulación de la expresión de miR-21 y miR-143. Encontramos que, mientras la expresión de miR-21 fue aumentada, la de miR-143 fue disminuida por la oncoproteína E7 del VPH-16 *in vivo* e *in vitro* y el E₂ también altera los niveles de miR-21 y miR-143 *in vivo*. El aumento en la expresión de miR-21 conllevó a la disminución de la expresión de PTEN y la disminución de miR-143 condujo al incremento de los niveles de ARNm y proteína de Bcl-2. Estos resultados sugieren que la oncoproteína E7 del VPH-16 y E₂ juegan un papel importante en la regulación de la expresión de miR-21 y miR-143. Asimismo, se observaron resultados similares en pacientes con CC positivos al VPH-16, por lo que en este estudio se resalta la importancia del papel de los miRNAs en tejido cervical y la implicación que tienen estas moléculas en la carcinogénesis cervical.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are a class of non-coding RNAs that negatively regulate their target mRNAs at post- and transcriptional level, thereby affecting crucial processes in cancer development. However, little is known about the molecular events that control miRNAs expression in cervical cancer (CC). HPV-16 E7 oncoprotein in conjunction with estrogen are sufficient to produce high grade cervical dysplasia and invasive cervical malignancies in a mouse model. In this study, we determined the potential role that the E7 oncoprotein and 17 β -estradiol (E₂) play in the deregulation of miR-21 and miR-143 expression levels by these two risk factors. We found that the expression of miR-21 was upregulated and the expression of miR-143 was downregulated by the HPV-16 E7 oncoprotein *in vivo* and *in vitro* and that E₂ treatment is also implicated in the deregulation of these important miRNAs *in vivo*. Sustained upregulation of miR-21 resulted in suppression of PTEN expression, and repression of miR-143 increased the mRNA and protein levels from Bcl-2. These results suggested that HPV type 16 E7 oncoprotein and E₂ play an important role in regulating miR-21 and miR-143 expression. We have observed similar results in CC patients containing HPV-16 sequences. This study highlights the roles of miRNAs in cervical tissue and implicates these important molecules in cervical carcinogenesis.

III. INTRODUCCIÓN

3.1 CÁNCER CERVICAL Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El cáncer cervical (CC) es un problema de salud mundial asociado a la infección del virus del papiloma humano (VPH). Los VPH tienen tropismo por las células epiteliales, por lo que pueden producir infecciones tanto de piel como de mucosas. La mayoría de las infecciones por VPH son clínicamente inaparentes y no producen anomalías citológicas. Sin embargo, las infecciones persistentes con ciertos tipos de VPH pueden causar CC, el cual es el tercer tipo de cáncer más común en mujeres a nivel mundial y el segundo tipo de cáncer más frecuente en México (GLOBOCAN, 2012).

Los virus que son capaces de infectar las mucosas se dividen, de acuerdo a si su infección puede conducir o no al desarrollo de cáncer, en genotipos de alto y bajo riesgo (Zaldívar Lelo de Larrea et al., 2012). Dentro los VPH de alto riesgo (VPH-AR), los cuales son considerados como carcinógenos y están asociados con más del 99% de los cánceres del cérvix, destacan los tipos 16 y 18 que se encuentran en aproximadamente 85% de todos los cánceres del cuello uterino (Evans et al., 2010). De manera notable, VPH-16 se encuentra presente entre el 50-60% de todos los tumores malignos del cuello uterino (Doorbar, 2006), el VPH-18 está involucrado en un 10-20%, mientras los VPHs tipo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y 73 juntos constituyen el 20-30% restante de los CC (Muñoz et al., 2003).

El CC ocurre en dos formas predominantes: carcinoma escamoso y adenocarcinoma. El tipo histológico más comúnmente encontrado en las mujeres es el carcinoma escamoso (80% de los casos) y está más frecuentemente asociado al VPH-16 (Lizano-Soberón et al., 2009). El adenocarcinoma es el segundo tipo histológico más común y aunque el VPH tipo 16 también es el más frecuente, la proporción de los genotipos 18 y 45 aumenta significativamente en este tipo de tumores (Reimers et al., 2009).

3.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL LOS VPHs

El virus del papiloma humano pertenece a la familia Papillomaviridae y su genoma está compuesto por una doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) de aproximadamente 8,000 pb y ocho o nueve marcos abiertos de lectura (ORF, Open Reading Frame), los cuales son transcritos como mRNA policistrónicos (Doorbar, 2006; Hebner and Laimins, 2006) (Figura 1). Los ORF dan lugar a diferentes proteínas: de transcripción temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y de transcripción tardía (L1 y L2) (Kirnbauer et al., 1992). De las proteínas de transcripción temprana, E1 y E2 se encargan de regular la replicación y transcripción viral, respectivamente; mientras que las proteínas E5, E6 y E7, intervienen en el control del ciclo celular así como de la transformación celular (Hausen, 2006; Maufort et al., 2010; Münger et al., 2004). La proteína E4 se expresa a lo largo de la fase tardía del ciclo viral, la cual interviene en la fase de la maduración de la partícula viral (Doorbar et al., 1986).

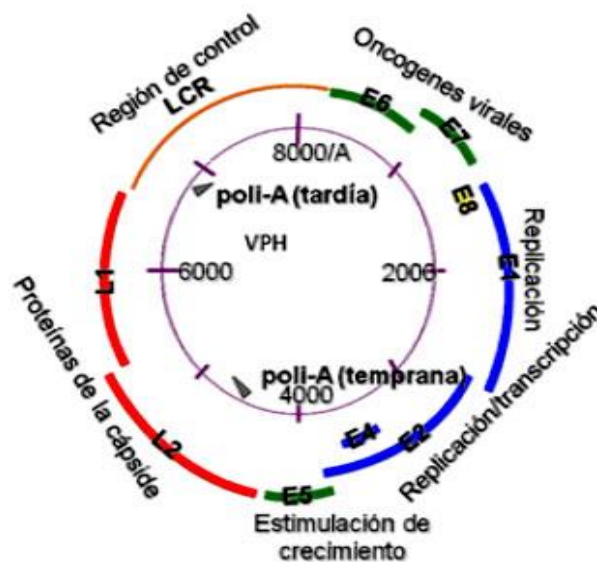


Figura 1. Organización del genoma de los VPHs. El genoma del VPH es una molécula de ADN circular de doble cadena. Se divide en tres regiones: la región larga de control (LCR) que no contiene marco de lectura alguno, pero está involucrada en la regulación de la expresión génica y replicación viral; la región temprana, que contiene los genes E1 a E8 de los cuáles E6 y E7 son considerados oncogenes, E1 y E2 necesarios para la replicación y transcripción del genoma viral y E4 es necesario para el ensamblaje y liberación viral; y la región tardía que contiene a los genes L1 y L2, los cuales conforman la cápside (Zaldívar Lelo de Larrea et al., 2012).

Las proteínas de transcripción tardía conocidas como L1 y L2 se asocian para formar la cápside, la cual envuelve al ADN circular de doble cadena (Hagensee et al., 1993).

Los VPHs tienen un tropismo muy definido por las células del tejido epitelial estratificado queratinizado. La infección por VPH ocurre a través de abrasiones en el epitelio, que exponen las células de la capa basal a la entrada de las partículas virales. Una vez en el interior, el ciclo del virus está íntimamente unido al programa de diferenciación de las células y aprovechando la maquinaria celular se replica y se propaga (Figura 2) (Frazer, 2004). Poco después de la infección, comienza la replicación de los episomas virales, la cual es independiente del ciclo celular y se producen aproximadamente de 50 a 100 copias por célula (Moody and Laimins, 2010). En esta etapa la expresión viral es mínima, la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 está bajo un control muy estricto, por lo que sus transcritos son escasamente detectables. Cuando el queratinocito entra al estatus de diferenciación, sale del ciclo celular e inicia un aumento masivo en la expresión de los genes virales, formándose al menos 1000 copias de virus por célula, con abundante expresión de los genes tempranos E6 y E7 y la expresión de genes tardíos (Middleton et al., 2003). El VPH replica su genoma utilizando dos proteínas; E2, una proteína de unión a ADN que se une al origen de replicación y recluta a E1, una helicasa viral que abre la cadena de ADN e inicia la replicación en asociación con factores celulares. E1 y E2 requieren de interacciones con proteínas de reparación y replicación de ADN propias de la célula huésped (Morin et al., 2011).

Durante la fase inicial de infección, el VPH existe como un episoma nuclear, pero la integración del genoma del VPH al genoma huésped es un paso importante en la progresión neoplásica del cérvix (Pett et al., 2004b). La integración del genoma viral causa delección o alteración del gen regulador viral E2, reteniendo un segmento variable que incluye a los genes E6 y E7, lo cual origina el incremento en la replicación de estos oncogenes virales (Jeon and Lambert, 1995). Las células que contienen al virus integrado adquieren ventajas de crecimiento sobre las que

contienen episomas virales, lo cual provoca la expansión clonal de estas células (Duensing and Münger, 2002).

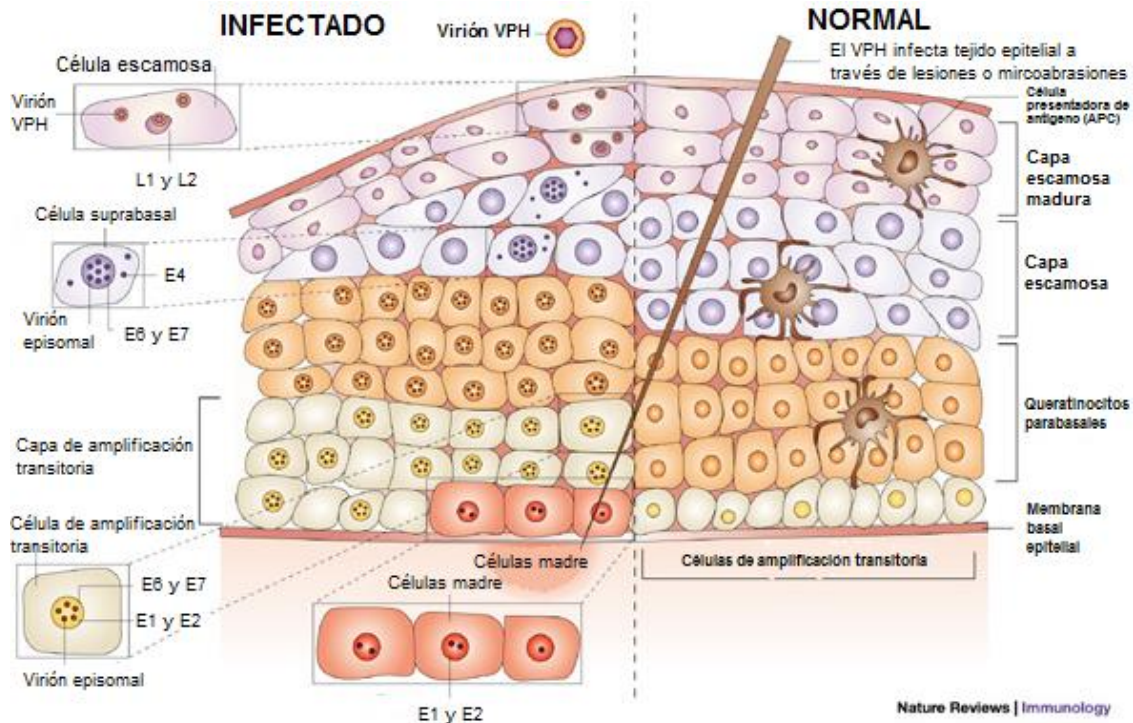


Figura 2. Infección del epitelio escamoso por el VPH. Después de la infección, los genes tempranos del VPH: E1, E2, E4, E5, E6 y E7 se expresan y el ADN viral se replica a partir del ADN episomal. En las capas superiores del epitelio el genoma viral se replica y los genes tardíos L1 y L2, y E4 son expresados. Las proteínas L1 y L2 encapsulan el genoma viral para formar viriones en el núcleo. La progresión de las lesiones a cáncer microinvasor e invasor es asociada con la integración del genoma viral al de la célula huésped por lo que se ve un incremento en la expresión de E6 y E7 con pérdida de la expresión de E2 (Frazer, 2004).

3.3 CARACTERÍSTICAS DE LA ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH

La oncoproteína E7 es de aproximadamente 98 aminoácidos, posee tres regiones conservadas (RC1, RC2 y RC3), nombradas así por su similitud en secuencia de aminoácidos con la proteína E1A de adenovirus. La RC1 está constituida por los residuos 1-15 del extremo amino terminal. La RC2 está formada por los residuos 16-38 y contiene el motivo Leu-X-Cys-X-Glu (LXCXE), que establece interacciones de alta afinidad con la proteína de retinoblastoma (pRb) (Dyson et al., 1992a). Finalmente la RC3 está constituida por los residuos 39-98 del extremo carboxilo terminal; esta región contiene dos motivos CXXC, los cuales

forman una estructura de dedo de zinc, lo que le permite actuar como factor de transcripción (Figura 3) (Massimi et al., 1997; McIntyre et al., 1993; McLaughlin-Drubin and Münger, 2009).

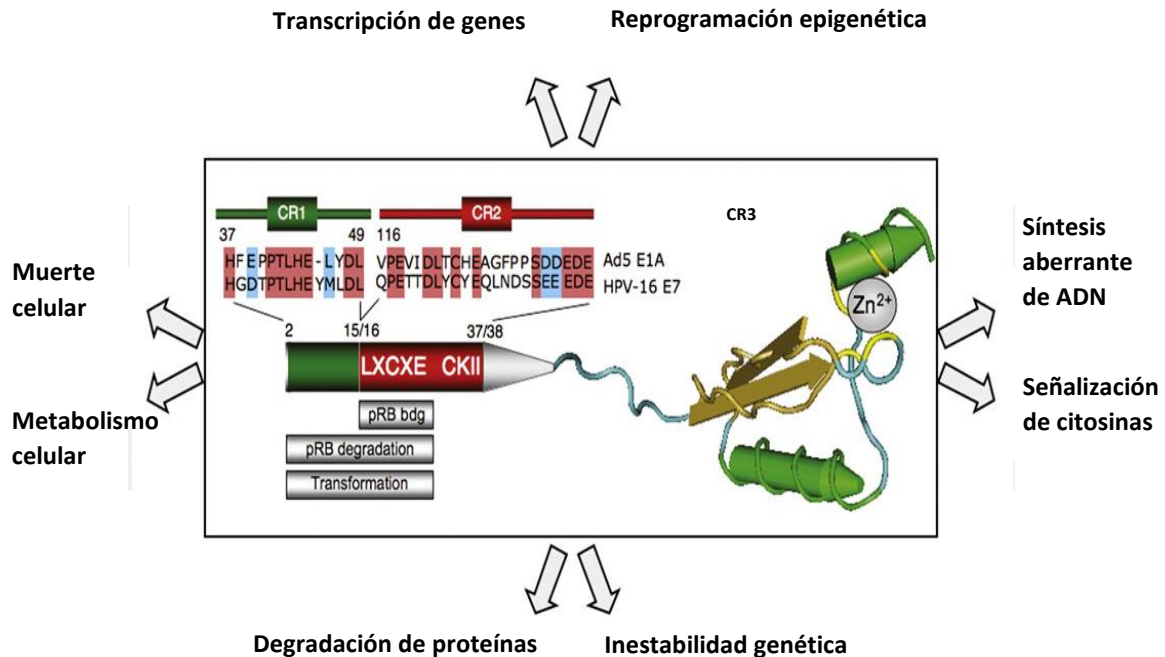


Figura 3. Estructura de la oncoproteína E7. Se muestran los tres dominios conservados (CR1, CR2 y CR3), así como el motivo en dedo de zinc en el dominio CR3 y las principales procesos celulares en los cuales se encuentra involucrada la oncoproteína E7 del VPH-16 (McLaughlin-Drubin and Münger, 2009).

3.3.1 FUNCIONES DE LA ONCOPROTEÍNA E7 DE LOS VPHs DE ALTO RIESGO.

La oncoproteína E7 se asocia con pRB y proteínas “pocket” relacionadas (p107 y p130), a través del motivo LXCXE del dominio CR2 (Dyson et al., 1992b; Münger et al., 1989). La proteína pRB mantiene un control del ciclo celular, ejerciendo una acción supresora sobre el factor de transcripción E2F, que cuando se encuentra libre promueve la expresión de numerosos genes involucrados en la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. pRB se une a E2F y forma un complejo (pRB/E2F) que mantiene secuestrado este factor de transcripción durante la fase G1 del ciclo celular. La interacción de E7 con pRB conduce a la disociación del complejo pRB/E2F y a la degradación subsecuente de pRB (Figura 4), por lo que la activación prematura de E2F conduce a que se encienda la transcripción de

numerosos genes requeridos por la célula para entrar a la fase S (Attwooll et al., 2004; Dyson, 1998).

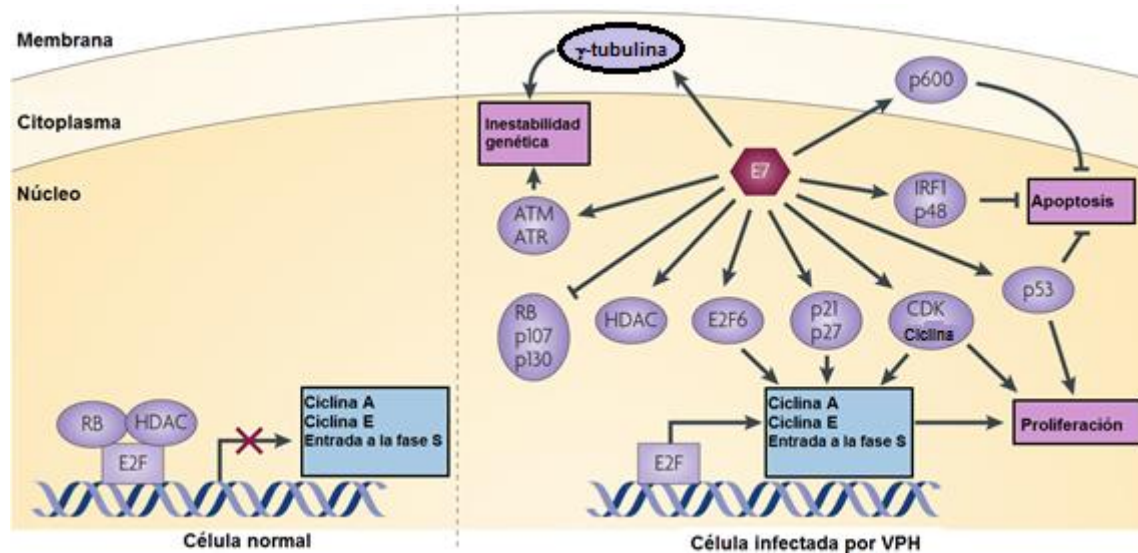


Figura 4. La oncoproteína E7 afecta numerosos procesos celulares a través de interacciones con múltiples proteínas celulares. La oncoproteína E7 desestabiliza el arresto de paso G1-S e induce hiperproliferación a través de la inhibición del supresor de tumor retinoblastoma (RB) y la activación de genes responsivos a E2F. E7 también afecta la expresión de genes celulares por la interacción con deacetilasas de histonas (HDACs) y E2F6. E7 desregula el control del ciclo celular por inhibición de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (tales como: p21 y p27), la estimulación de las ciclinas y la activación de la quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2). La oncoproteína E7 induce la síntesis anormal del centrómero por incrementar la actividad de CDK2 y por interaccionar con γ -tubulina, conduciendo a inestabilidad genética. E7 induce daño al ADN e activación de la vía ATM-ATR (ataxia telangectacia-mutada-ATM y daño al ADN en respuesta a RAD3), lo cual contribuye a la acumulación de alteraciones en los cromosomas. La expresión de E7 bloquea apoptosis dependiente a p53, permitiendo replicación en presencia de daño a ADN, lo cual conduce a un incremento de la inestabilidad cromosómica. La interacción de E7 con p600 evita que la célula muera por “anoikis”, permitiendo crecimiento libre de anclaje y la progresión maligna. La interacción de E7 con componentes de respuesta a interferón (IFN), tales como IRF1 y p48 contribuye al escape de la respuesta inmune y al establecimiento de una infección persistente (Moody and Laimins, 2010).

La función oncogénica de E7 para desregular múltiples procesos celulares tales como diferenciación, proliferación, arresto del crecimiento y apoptosis no solamente depende de la unión con pRB sino también por la interacción con 20 o más proteínas diferentes nucleares y citoplasmáticas. Un gran patrón de interacciones de E7 ha sido identificado, incluyendo a ciclina A, CDK2, inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (p21^{CIP1} y p27^{KIP1}) (Dyson et al., 1992b; Funk et al., 1997; Tommasino et al., 1993), coactivadores transcripcionales (CBP/p300,

pCAF, TBP)(Avvakumov et al., 2003; Bernat et al., 2003; Huang and McCance, 2002), remodeladores de la cromatina (deacetilasas de histonas y acetil transferasas de histonas) (Brehm et al., 1999), factores de transcripción (E2F1, E2F6 y MMP2, NuMA, γ -tubulina, IRF1, p600, etc.)(Barnard and McMillan, 1999; Hwang et al., 2002; Lüscher-Firzlaff et al., 1999; McLaughlin-Drubin et al., 2008; Nguyen et al., 2008; Nguyen and Münger, 2009) (Figura 4).

La oncoproteína E7 es conocida como un potente inductor de la proliferación por su habilidad de atenuar los controles del ciclo celular y por aumentar la expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo celular. Por ejemplo, E7 puede alterar la capacidad proliferativa de queratinocitos infectados a través del bloqueo de los inhibidores dependientes de ciclinas (p21^{CIP1} y p27^{KIP1}), quienes actúan como reguladores negativos del ciclo celular, y son reguladores clave en el bloqueo del ciclo celular en respuesta a señales de diferenciación (Dyson et al., 1992b; Funk et al., 1997; Tommasino et al., 1993).

En queratinocitos se ha observado que la expresión de E-cadherina es reprimida por E7 a través de la activación de DNMT1 (DNA metiltransferasa de histona I) (Burgers et al., 2007), lo que conduce a la pérdida de uniones célula-célula, por lo que la oncoproteína E7 incrementa la migración, invasión y metástasis tumoral. Sin embargo, el desprendimiento de las células epiteliales de la matriz extracelular activa la apoptosis mediada por caspasas (también conocido como “anoikis”) para prevenir el crecimiento independiente de anclaje, mientras que p600 está involucrada en la resistencia a muerte celular por “anoikis” (Tasaki et al., 2005). Por otro lado, se ha demostrado que E7 se une a p600 y esta interacción permite que haya un crecimiento celular libre de anclaje, promoviendo así la transformación celular por E7 (Huh et al., 2005).

E7 se une directamente al factor de transcripción E2F6 y esta interacción tiene un impacto negativo sobre la actividad de este factor que es un componente importante del complejo represor Polycomb (PRC), por lo que la sobreexpresión de E7 afecta gravemente la formación de los complejos E2F6-PcG (McLaughlin-Drubin et al., 2008). Adicionalmente a la interacción de E7 con factores de transcripción, esta es capaz de regular la expresión de genes celulares a través del

remodelamiento de la cromatina. Diversos estudios han revelado que la oncoproteína E7 puede interactuar directamente con Mi2, un componente clave del complejo HDAC NuRD conduciendo a la de-represión de la transcripción de genes y favoreciendo el crecimiento celular (Brehm et al., 1999). Así mismo se ha observado que E7 se une y secuestra a HDAC, permitiendo la activación transcripcional de genes pro-angiogénicos, tales como: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), anhidrasa carbónica (CA9), trombospondina-1 (TSP-1) y fosfoglicerato quinasa (PGK) (Bodily et al., 2011). También E7 está involucrada en la inducción de dos desmetilasas de histonas, KDM6A y KDM6B (McLaughlin-Drubin et al., 2011). El incremento en la expresión de KDM6A y KDM6B conduce a una disminución de la tri-metilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3), la cual es una marca epigenética requerida para el reclutamiento del grupo represivo Polycomb (PRC) para inactivar la transcripción de sus genes diana (Schwartz and Pirrotta, 2007), por lo que E7 induce una disminución de H3K27me3 provocando una proliferación aberrante y transformación celular.

La respuesta inmune puede ser evadida por la oncoproteína E7 a través de la atenuación de la señal de IFN o TNF, actividad que es mediada por la asociación de E7 con IRF-1 conduciendo a la supresión de la expresión de genes antivirales implicados en la respuesta anti-viral, incluidos IFN β , proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP1), transportador de procesamiento de antígenos 1 (TAP1) (Park et al., 2000). Además, E7 es capaz de hacer resistente a la célula al factor de necrosis tumoral α (TNF- α). TNF es producido por las células citotóxicas T y es un potente simulador de apoptosis para eliminar la células infectadas por virus y se ha demostrado que E7 altera tanto la señal pro-apoptótica mediada por TNF como la actividad de la caspasa 8, esto para proteger a la célula de la muerte inducida por TNF(Thompson et al., 2001).

Por otro lado, se ha observado que la oncoproteína E7 juega un papel importante en la inducción de aberraciones cromosómicas y aneuploidias (Duensing et al., 2000; Pett et al., 2004a). Ha sido observado que estos efectos oncogénicos son necesarios, pero no suficientes para desencadenar la progresión a cáncer cervical invasivo y la acumulación de cambios genéticos secundarios durante la

infección persistente es el punto clave para desencadenar la oncogénesis mediada por VPH. Se ha observado que la oncoproteína E7 causa la deslocalización de la dineína del huso mitótico y su actividad está mediada por la proteína del aparato mitótico nuclear (NuMA) (Nguyen and Münger, 2009). NuMA y dineína son proteínas clave en el mantenimiento de la polaridad del epitelio y fue encontrado que la interacción de E7 con NuMA/dineína perturba el proceso de estratificación normal del epitelio, favoreciendo la expansión de células basales infectadas para la amplificación del genoma viral y la persistencia de la infección. También se ha documentado que E7 a través de su motivo LXCXE puede asociarse con γ -tubulina, lo que conduce a una dramática reducción de la cantidad de γ -tubulina repercutiendo en el huso mitótico, lo cual ocasiona anomalías cromosómicas (Nguyen et al., 2007).

3.4 ESTRÓGENO Y CÁNCER CERVICAL

El estrógeno, a través de sus receptores nucleares ER α , ER β y su receptor de membrana GPR30, influye en procesos fisiológicos de varios tejidos/sistemas incluidos pero no limitados al tracto reproductivo femenino, mama, colon, cerebro, cardiovascular y sistema inmune (Deroo and Korach, 2006). El estrógeno se une a sus receptores en el citoplasma e induce mono- o dimerización y es introducido al núcleo, donde activa o reprime genes a través de dos mecanismos diferentes: vía clásica, donde estrógeno-ER se une a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y modula sus genes diana, y la vía no-clásica, donde el estrógeno-ER se une a factores de transcripción como AP1 y SP1 y modifican la función de estos factores. El estrógeno también puede unirse al receptor de membrana GPR30, un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G, lo que conduce a una rápida activación de varias vías de señalización, incluida pero no limitada a las vías fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la señalización por Ca²⁺ (vía no-genómica) (Figura 5) (Chung et al., 2010).

A pesar de que se ha demostrado que el efecto oncogénico del VPH es necesario pero no suficiente para el desarrollo de CC, se requiere de la participación de otros factores importantes tales como: sistema inmune, factores químicos y

biológicos, dentro de los cuales las hormonas sexuales pueden facilitar la carcinogénesis cervical por diferentes mecanismos, incluyendo la inducción de metaplasia escamosa en la zona de transformación del cérvix (Delvenne et al., 2007).

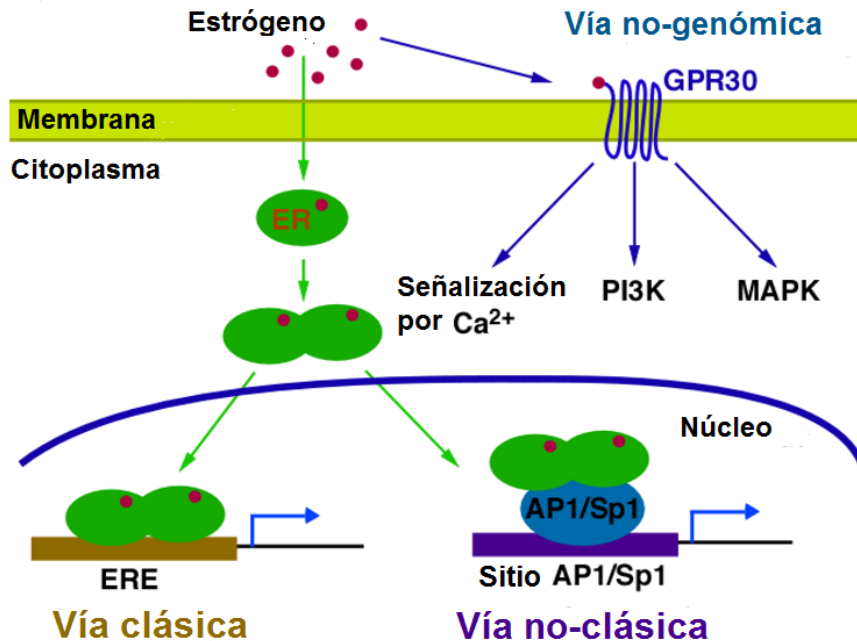


Figura 5. Vía de señalización del estrógeno (Chung et al., 2010)

Algunos estudios relacionados con el uso prolongado de anticonceptivos orales muestran que estos son un factor de riesgo para el desarrollo de displasia y CC (Deligeoroglou et al., 2003). Asimismo, se ha reportado que aquellas mujeres que usan anticonceptivos orales tienen 1.92 veces más el riesgo (IC 95%: 1.1-3.3) para el desarrollo de displasia cervical que las mujeres que no los usan (McFarlane-Anderson et al., 2008). Por otro lado, fue reportado que mujeres que consumen anticonceptivos orales por más de 96 meses tienen 6.01 veces más el riesgo (IC 95% 2.5-17.9) de desarrollar CC que las mujeres que los usaron por menos tiempo (Vessey and Painter, 2006). Se reportan resultados muy similares en otros estudios entre el uso de anticonceptivos orales por periodos entre 5 a 10 años y desarrollo de CC (riesgo relativo: 2.2 veces, IC 95%: 1.9-2.4) (International Collaboration of

Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2007). Este riesgo aumenta en las mujeres infectadas con el VPH (riesgo relativo 2.5 IC 95%: 1.6-3.9) (Moreno et al., 2002).

3.5 SINERGISMO ENTRE ESTRÓGENO Y ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH DE ALTO RIEGO EN EL DESARROLLO DE CÁNCER CERVICAL

La fuerte evidencia de que el estrógeno contribuye en la carcinogénesis cervical proviene de estudios en ratones transgénicos VPH. En estos ratones se ha usado la expresión de múltiples oncogenes individuales (por ejemplo, E6 y E7) del VPH-16 bajo el control del promotor de la queratina 14, quien dirige su expresión a epitelio escamoso estratificado (piel, cavidad oral, ano, vagina y cérvix). Aunque en estos ratones transgénicos se observan tumores espontáneos en piel, raramente desarrollan cáncer cervical espontáneamente (Lambert and Griep, 2007). Sin embargo, si estos ratones son tratados con 17β -estradiol, eficientemente desarrollan cáncer cervical (Brake and Lambert, 2005; Chung et al., 2008; Riley et al., 2003).

Riley et al., reportaron que en ratones transgénicos K14E7 VPH-16 la oncoproteína E7 en conjunto con los estrógenos fueron suficientes para inducir hiperproliferación e inhibición de la diferenciación epitelial, los cuales son requisitos necesarios que conducen a una displasia de alto grado. Además, observaron que los estrógenos y la oncoproteína E7 sinergizan para producir lesiones de alto grado y cáncer invasor a los seis meses de tratamiento (Riley et al., 2003), lo que sugiere que el estrógeno puede ser un carcinógeno directo y que puede contribuir en la iniciación de lesiones, también que el estrógeno no solo contribuye en la génesis sino también en el mantenimiento de neoplasias cervicales (Brake and Lambert, 2005).

3.6 miRNAS

3.6.1 BIOGÉNESIS Y FUNCIÓN DE LOS miRNAs

Los miRNAs son pequeños RNAs de ~22 nucleótidos de longitud, con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. Después del descubrimiento del primer miRNA lin-4 en *Caenorhabditis elegans* en 1993 (Lee et

al., 1993), estos pequeños RNAs han sido identificados en plantas, animales y en ADN viral. Los miRNAs actúan como reguladores negativos a nivel post-transcripcional por unión a la región 3' UTRs de sus RNA mensajeros (mRNAs) diana y dependiendo de su nivel de complementariedad entre miRNAs y el mRNA diana, pueden reprimir la traducción o inducir la degradación del mRNA (Bartel, 2009).

Los miRNAs son originados por un procesamiento que inicia en el núcleo de la célula y termina en el citoplasma, lugar donde llevan a cabo su función. Estos pequeños RNAs son transcritos por la RNA polimerasa II que produce una molécula larga de RNA, la cual puede exceder 1 kb, conocida como miRNA primario (pri-miRNAs) (Lee et al., 2004). Este transcrito primario es cortado por la RNasa III conocida como DROSHA, la cual se asocia con DGCR8 (en mamíferos) o Pasha (en *Drosophila* y *C. elegans*) (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004). La RNasa III (*DROSHA*) corta de forma asimétrica ambas cadenas en sitios cercanos a la base de la estructura primaria en forma de "stem-loop", de forma que el producto resultante es una molécula de unos 60-70 nucleótidos denominada pre-miRNA (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Lee et al., 2003). Este pre-miRNA es exportado al citoplasma de forma activa a través del complejo dependiente de RAN-GTP, Exportina 5 (XPO5) (Bohnsack et al., 2004; Yi et al., 2003). En el citoplasma el pre-miRNA es cortado por DICER1, una endonucleasa RNasa III, asociada a las proteínas TRBP (conocida también como TARBP2). DICER1 corta de forma asimétrica ambas cadenas del stem dsRNA para generar el miRNA dúplex maduro de aproximadamente 22 nucleótidos (Bernstein et al., 2001). El miRNA dúplex es unido al complejo ribonucleoproteico conocido como "RNA-induced silencing complex" o (miRISC), conformado por DICER1, TRBP y proteínas Argonautas (AGO1, AGO2, AGO3 o AGO4) (Gregory et al., 2005). Una de las cadenas (cadena guía) del miRNA maduro es unida y retenida al complejo miRISC por alguna de las proteínas Argonauta para guiar al complejo, junto con miembros de la familia de proteínas GW182, a sus mRNA diana para el silenciamiento post-transcripcional de genes. Esto ocurre en los cuerpos de procesamiento (P-bodies),

los cuales son focos citoplasmáticos que son inducidos para el silenciamiento de mRNA (Eulalio et al., 2007; Gregory et al., 2005) (Figura 6).

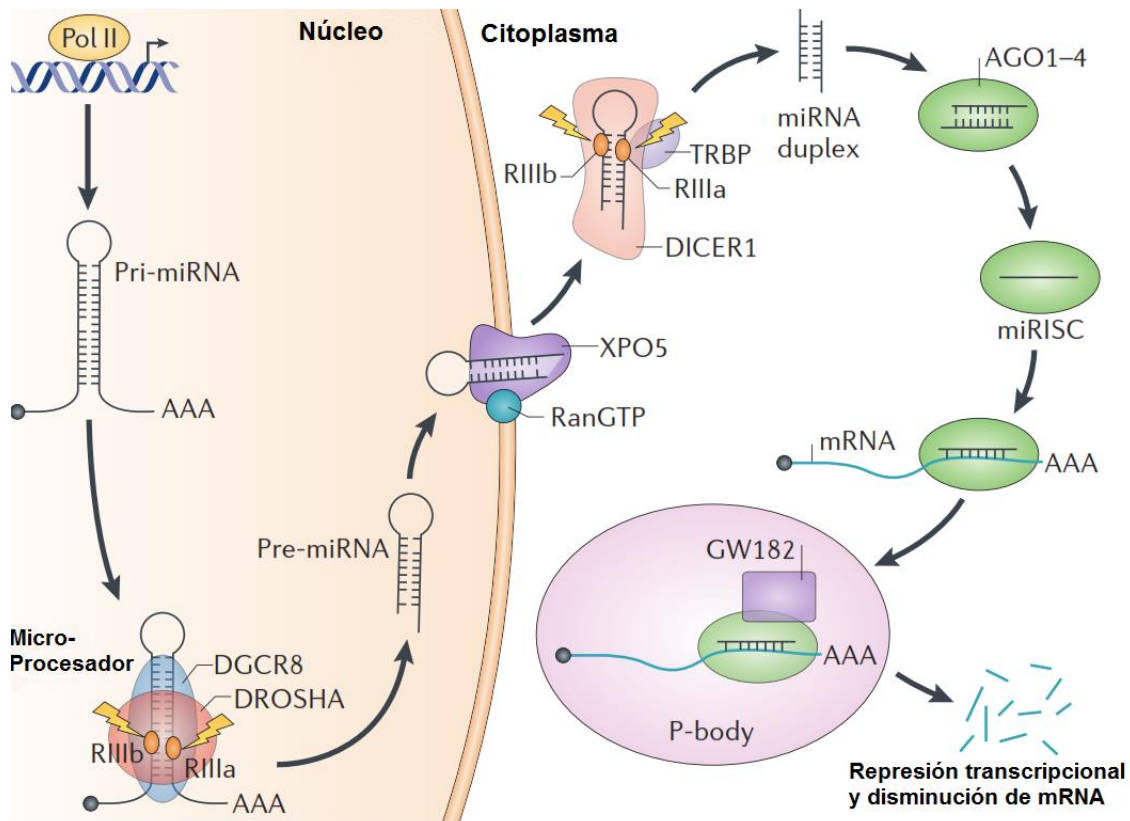


Figura 6. Biogénesis de los miRNAs. Los genes microRNAs (miRNA) son transcritos como miRNAs primarios (pri-miRNAs) por la RNA polimerasa II (Pol II) en el núcleo. Los pri-miRNAs largos son cortados por el complejo microprocesador, el cual incluye a DROSHA y a DGCR8 para generar miRNAs precursores (pre-miRNAs). Los pre-miRNAs son exportados del núcleo al citoplasma por la exportina 5 (XPO5) y posteriormente procesados por DICER1, una ribonucleasa III (RIII), la cual produce miRNA maduro. Una de las cadenas de los miRNAs maduros (cadena guía) es tomada por el complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC), del cual forma parte DICER1 y proteínas Argonautas (AGO), quien dirige al miRISC a su miRNA diana y la unión por complementariedad de secuencia lleva a cabo la supresión de genes ya sea por degradación de mRNA o represión traduccional en los cuerpos de procesamiento (P-bodies). TRBP: proteína de unión a RNA responsiva a transactivación (Lin and Gregory, 2015).

3.6.2 miRNAs Y CÁNCER CERVICAL

Los miRNA con base en su patrón de expresión en tumores son clasificados como oncogénicos o supresores de tumor (Calin and Croce, 2006; Kent and Mendell, 2006). Asimismo, algunos miRNAs en la célula poseen características de supresor de tumor/pro-apoptótico, mientras que otros tienen un papel de anti-

apoptótico/promoción-proliferación (Kent and Mendell, 2006; Miska, 2005). En cáncer cervical (CC), la infección del VPH de alto riesgo puede afectar el patrón de expresión de miRNAs, esto a través de las oncoproteínas E5, E6 y E7, lo cual contribuye en la patogénesis viral (Gómez-Gómez et al., 2013). Se ha observado que el perfil de expresión de miRNAs en CC es distintivo al del tejido normal, por lo que la expresión de miRNAs puede servir como bio-marcador diagnóstico y pronóstico en cáncer (Wang et al., 2008).

3.6.3 DISMINUCIÓN DE miRNAs SUPRESORES DE TUMOR EN CÁNCER CERVICAL

Varios miRNAs que actúan como supresores de tumor han mostrado disminución en su expresión en CC (Cuadro 1). Por ejemplo, la familia de Let-7a fue el primer grupo identificado como oncomirs (miRNAs relacionados con cáncer). Esta familia de miRNAs regula negativamente la expresión de oncogenes, dentro de los cuales se encuentra la familia de RAS y se ha observado que el oncogen *RAS* se encuentra altamente expresado (Córdova-Alarcón et al., 2005), mientras que la expresión de Let-7a es disminuida en CC (Cuadro 1) (Li et al., 2011; Lui et al., 2007).

Otro miRNA que se encuentra disminuido en CC es miR-23b (Lui et al., 2007), el cual está estrechamente relacionado con la angiogénesis tumoral. La disminución de este miRNA permite la alta expresión MAP3K1, el cual está relacionado con la metástasis tumoral (Dufourcq et al., 2008; Minet et al., 2001). Estos reportes sugieren que la baja expresión de miR-23b pudiera tener un importante papel no sólo en la angiogénesis sino también en la metástasis del cáncer cervical.

Wang *et al.*, 2008 reportó baja expresión de miR-101 en CC. Este miRNA juega un papel importante en la regulación de la proliferación celular, migración y angiogénesis a través de la inhibición de la expresión de EZH2 (Kottakis et al., 2011). Asimismo, se han observado altos niveles de expresión de mRNA y proteína de EZH2 en tejido tumoral de CC (Fang J et al., 2011), lo cual sugiere que miR-101 pudiera ser un nuevo blanco para inhibir la proliferación en CC.

Otro miRNA que ha sido encontrado disminuido en CC es miR-126 (Cuadro 1) (Li et al., 2011; Martinez et al., 2008), este miRNA está involucrado en la

regulación de la expresión de VEGF en células tumorales (Liu et al., 2009), se ha observado que la disminución de miR-126 conduce al incremento de la expresión de VEGF, lo cual está estrechamente relacionada con el proceso de angiogénesis en cáncer cervical (Gaffney et al., 2003; Manavi et al., 2007), por lo que se propone a miR-126 como un supresor de tumor que juega un papel importante en el proceso de angiogénesis del CC.

Cuadro 1. Expresión de miRNAs en cáncer cervical

| <i>Referencia</i> | <i>Baja expresión</i> | <i>Alta expresión</i> |
|--------------------------------|---|--|
| (Wang et al., 2008) | miR-23b, miR-34a, miR-101, miR-143, miR-145, miR-218, miR-424, | miR-15a, miR-146a, miR-223 |
| (Li et al., 2011) | Let-7b, miR-10b, miR-29a, miR-99a, miR-125b, miR-126, miR-218, miR-375, miR-424 | miR-15b, miR-16, miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93, miR-106a, miR-155, miR-224 |
| (Li et al., 2007) | let-7a-c, miR-23b, miR-143, miR-196b | miR-21 |
| (Martinez et al., 2008) | miR-126, miR-143, miR-145, miR-195, miR-218, miR-368, miR-497 | miR-182, miR-183, miR-210 |
| (McBee et al., 2011) | miR-218, miR-433 | miR-21, miR-124, miR-135b, miR-141, miR-223, miR-301b, miR-449a, miR-449b, miR-517a, miR-517c, miR-545 |
| (Pereira et al., 2010) | miR-26a, miR-29a, miR-143, miR-145, miR-99a, miR-199a, miR-203, miR-513 | miR-10a, miR-132, miR-148a, miR-196a, miR-302b |
| (Lee et al., 2008) | miR-149, miR-203 | miR-9, miR-127, miR-199b, miR-199s, miR-214 |

Varios estudios han demostrado que la expresión de miR-143 y miR-145 son significativamente disminuidos en tejido tumoral cervical comparado a tejido normal (Cuadro 1) (Lui et al., 2007; Martinez et al., 2008; Wang et al., 2008). Asimismo, se ha observado que la alta expresión de estos miRNAs suprime el crecimiento de células tumorales (HeLa) (Wang et al., 2008), lo cual sugiere que la baja expresión de miR-143 y miR-145 conduce a la alta proliferación observada en CC.

En líneas celulares derivadas de CC se ha encontrado baja expresión de miR-196 (Cuadro 1) (Lui et al., 2007) y la baja expresión de este miRNA conduce a promover la proliferación y supervivencia de las células tumorales a través del

incremento de la actividad del factor de transcripción HOXB7, el cual activa vías de supervivencia celular (How et al.; How et al.). Por otro lado, miR-218 está frecuentemente disminuido en CC (Li et al., 2011; Martinez et al., 2008; McBee et al., 2011; Wang et al., 2008) y recientemente fue observado que la baja expresión de miR-218 está estrechamente relacionada con etapas tardías de cáncer cervical, adenocarcinoma y metástasis a nódulos linfáticos (Yu et al., 2012a), lo cual confirma que miR-218 puede actuar como un supresor de tumor en CC.

3.6.4 AUMENTO DE miRNAS ONCOGÉNICOS EN CÁNCER CERVICAL

Varios miRNAs se encuentran altamente expresados en cáncer cervical, lo cual sugiere que estos miRNAs pudieran tener un papel oncogénico en CC (cuadro 1). El primer ejemplo es miR-21 que tiene como diana a PDCD4, un gen supresor de tumor (Zhu et al., 2008) y ha sido reportado que en líneas de CC (HeLa) la alta expresión de miR-21 provoca la disminución de PDCD4 conduciendo a un incremento en la proliferación celular (Yao et al., 2009), esto sugiere que miR-21 tiene un papel oncogénico en cáncer cervical.

miR-210 se encuentra localizado en una región no codificante del cromosoma 11, este miRNA es altamente expresado en CC (Cuadro 1) (Martinez et al., 2008). Recientemente fue encontrado que miR-210 regula directamente la expresión de MNT (Bernard and Eilers, 2006) y la inhibición de la expresión de MNT conduce a la activación de cMYC para promover proliferación en CC y en lesiones escamosas intraepiteliales del tejido cervical (Arvanitis and Spandidos, 2008), por lo que se ha propuesto a miR-210 como oncogénico al promover proliferación celular a través de inducir la alta expresión de MYC en cáncer cervical.

Asimismo, se ha observado en CC alta expresión de miR-223 (McBee et al., 2011; Wang et al., 2008), el cual está relacionado en promover pérdida de la adherencia celular y proliferación celular al tener como gen diana a *DCG3* que participa en las uniones intracelulares para mantener la integridad del tejido (Wan et al., 2007). miR-301b es otro miRNA que está relacionado en la activación de la proliferación a través de disminuir la expresión de *RASAL1*, un inhibidor de RAS

(Bernards and Settleman, 2009); miR-301b se ha observado altamente expresado en CC (McBee et al., 2011).

3.6.5 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO ALTERA LA EXPRESIÓN DE miRNAs EN CÁNCER CERVICAL

Diferentes estudios han mostrado que múltiples miRNAs son alterados en CC positivos a la infección de VPH de alto riesgo comparado con tejido negativo a la infección o a tejido normal (Martinez et al., 2008; Wang et al., 2009).

Calvin GA *et al.*, reportaron que en un “cluster” de sitios frágiles (FRAs por sus siglas en inglés) en el cromosoma 17q23, se encuentran tres sitios de integración del VPH-16 y cuatro genes de miRNAs (miR-21, miR-301, miR-142s y miR-142as); en este estudio se concluye que estos miRNAs son blanco de la integración viral, lo que conduce a una desregulación de su expresión en CC positivo a la infección del VPH-16 (Calin et al., 2004). Por otro lado, se ha observado que líneas celulares (CaSki y SiHa) y carcinoma de células escamosas positivas al VPH-16 presentan alta expresión de miR-21 comparado a tejido normal sin infección de VPH (Yao and Lin, 2012). Sin embargo, la comparación entre el perfil de expresión de miRNAs en líneas celulares que tienen genoma viral y aquellas que presentan la infección en forma episomal no se observaron cambios significativos (Martinez et al., 2008). Estas observaciones sugieren que sólo la infección de los VPH de alto riesgo es suficiente para modificar la expresión de miRNAs.

Se ha identificado que algunos miRNAs son desregulados similarmente entre VPH-16 y VPH-18, mientras que otros son específicos del tipo viral (Martinez et al., 2008), por ejemplo en células positivas a VPH-16 (SiHa y CaSki) se ha reportado una alta expresión de miR-182, miR-183 y miR-210, mientras que la expresión de miR-1, miR-126, miR-133b, miR-143, miR-145, miR-195, miR-214, miR-368, miR-451 y miR-7029 se encuentra disminuida en estas células (Martinez et al., 2008). En células positivas a VPH-18 (HeLa) se encontró que miR-182 y miR-183 son altamente expresados, mientras que miR-1, miR-133b, miR-143, miR-145, miR-214, miR-368, miR-451 y miR-7029 se encuentran en bajos niveles de expresión en estas células (Martinez et al., 2008).

3.6.6 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs POR LA ONCOPROTEÍNA E7

Como se mencionó anteriormente, los niveles elevados de miRNAs oncogénicos y la baja expresión de miRNAs supresores de tumor en CC está frecuentemente asociada a la infección por VPH de alto riesgo, por lo que la alteración de la expresión de miRNAs también está ligada a la expresión de las oncoproteínas virales (Gómez-Gómez et al., 2013).

La oncoproteína E7 del VPH-16 induce la expresión de miR-15b en CC (Myklebust et al., 2011). Es conocido que E7 induce la degradación de pRB, lo que ocasiona que se libere E2F del complejo pRB-E2F; E2F libre puede llevar a cabo su función de factor de transcripción de genes relacionados con proliferación (Dyson et al., 1989; Li et al., 2011; Myklebust et al., 2011), asimismo se ha reportado que la expresión de miR-15a, miR-15b y miR-16 es regulada por E2F1 y E3F3 (Bueno et al., 2010; Myklebust et al., 2011; Ofir et al., 2011), lo que sugiere que la oncoproteína induce la alta expresión de los mencionados miRNAs a través de la vía E2F (Gómez-Gómez et al., 2013).

La oncoproteína E7 del VPH-16 también es capaz de inducir la alta expresión de miR-27b para promover proliferación e invasión en CC (Zhang et al., 2015); esto lo logra a través de disminuir la expresión de su gen diana PPAR γ , el cual juega un papel muy importante en la supresión de la progresión del CC (Zhang et al., 2015). Estos datos sugieren que la inducción de la alta expresión de miR-27b por la oncoproteína E7 en CC es para promover proliferación celular e invasión de las células de carcinoma cervical.

miR-203 es un miRNA muy importante en el control de la diferenciación de los queratinocitos indiferenciados de tejido epitelial (Yi et al., 2008) y se ha observado que este miRNA es regulado negativamente por la oncoproteína E7 de los VPHs de alto riesgo causando un bloqueo de la diferenciación celular, a través de la vía de las MAP cinasas/proteína cinasa C (Melar-New and Laimins, 2010).

3.6.7 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE miR-21 Y miR-143 POR LA ONCOPROTEÍNA E7 Y LOS ESTRÓGENOS

miR-21 y miR-143 son aberrantemente expresados en cáncer cervical y están estrechamente relacionados con el desarrollo de esta neoplasia (Deftereos et al., 2011; Liu et al., 2011). miR-21 es un miRNA, que tiene la función de oncogén por tener como genes diana a genes supresores de tumor, entre lo que se encuentra la Troponina I (TPM1), muerte celular programada 4 (PDCD4) y homólogo de la fosfatasa y tensina (PTEN); los altos niveles de miR-21 ocasionan proliferación celular e inhibición de la apoptosis conduciendo a invasión y metástasis del cáncer (Yao et al., 2009).

Por otro lado, miR-143 puede tener un importante papel en la patogénesis de CC como supresor de tumor al regular la expresión de Bcl-2, una proteína anti-apoptótica. Se ha observado en líneas celulares derivadas de CC que el aumento de la expresión de miR-143 condujo a un incremento de la apoptosis, disminución de la expresión de Bcl-2 y aumento en la proliferación celular. (Liu et al., 2012). También, se ha reportado que el aumento de la proteína de Bcl-2 está estrechamente relacionada con el desarrollo del CC (Pillai et al., 1996), además de estar correlacionada con el grado de lesión intraepitelial cervical (Dimitrakakis et al., 2000).

Los estrógenos (E₂) son otro factor que está involucrado en la regulación de la expresión de miRNAs con funciones oncogénicas y supresoras de tumor. Se ha observado que los E₂ inducen la expresión de 21 miRNAs y reprime la expresión de 7 miRNAs en la línea celular MCF-7 (Bhat-Nakshatri et al., 2009; Mattie et al., 2006). En líneas celulares derivadas de cáncer de mama se ha observado que la expresión de miR-21 es incrementada en respuesta al tratamiento de E₂ y la disminución de este miRNA se correlaciona con el aumento de la expresión de las proteínas de sus genes diana, dentro de los cuales se encuentra PDCD4 y PTEN (Bhat-Nakshatri et al., 2009; Mattie et al., 2006). También, se ha encontrado en cáncer de mama que el tratamiento con E₂ induce la baja expresión de miR-143, conllevando a un aumento de la expresión de Bcl-2, uno de sus genes diana. Bcl-2 es una proteína asociada con la membrana interna de la mitocondria, la cual funciona inhibiendo

apoptosis y promoviendo la supervivencia celular (Yu et al., 2012b). Sin embargo, no se ha estudiado si la oncoproteína E7 y el ambiente hormonal están involucrados en la regulación de la expresión de estos importantes miRNAs *in vivo*.

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervical (CC), en México sigue siendo la segunda causa de muerte en mujeres que sufren esta enfermedad. En la última década se ha determinado que los microRNAs (miRNAs) juegan un papel muy importante en el desarrollo del cáncer. Se ha observado que los miRNAs regulan positiva y negativamente la expresión de genes y han sido descritos como oncogenes o como genes supresores de tumor de acuerdo a sus niveles de expresión en el tumor y a los blancos que ellos regulan; importantemente, a través de estas pequeñas moléculas se ha podido discriminar entre tejido normal y canceroso.

Los ratones transgénicos K14E7 que expresan la oncoproteína E7 y que reciben tratamiento con E₂, son un buen modelo de carcinogénesis cervical y son una herramienta muy importante para evaluar los cambios de expresión de miRNAs, por efecto de la oncoproteína E7 y E₂, importantes factores involucrados en el desarrollo de esta enfermedad. Este modelo nos permitirá evaluar el efecto de la oncoproteína E7 del VPH-16 y los E₂ sobre la expresión de miR-21 y miR-143 de manera separada y en conjunto en tejido de cáncer cervical de manera controlada.

Por otra parte, está bien validado que la progresión de la carcinogénesis cervical en el modelo K14E7 es muy similar a lo que ocurre en los humanos. Por lo que, si la expresión de miR-21 y miR-143 está desregulada en tejido cervical, éstos podrían ser utilizarlos como biomarcadores de infección de VPHs de alto riesgo.

V. OBJETIVOS

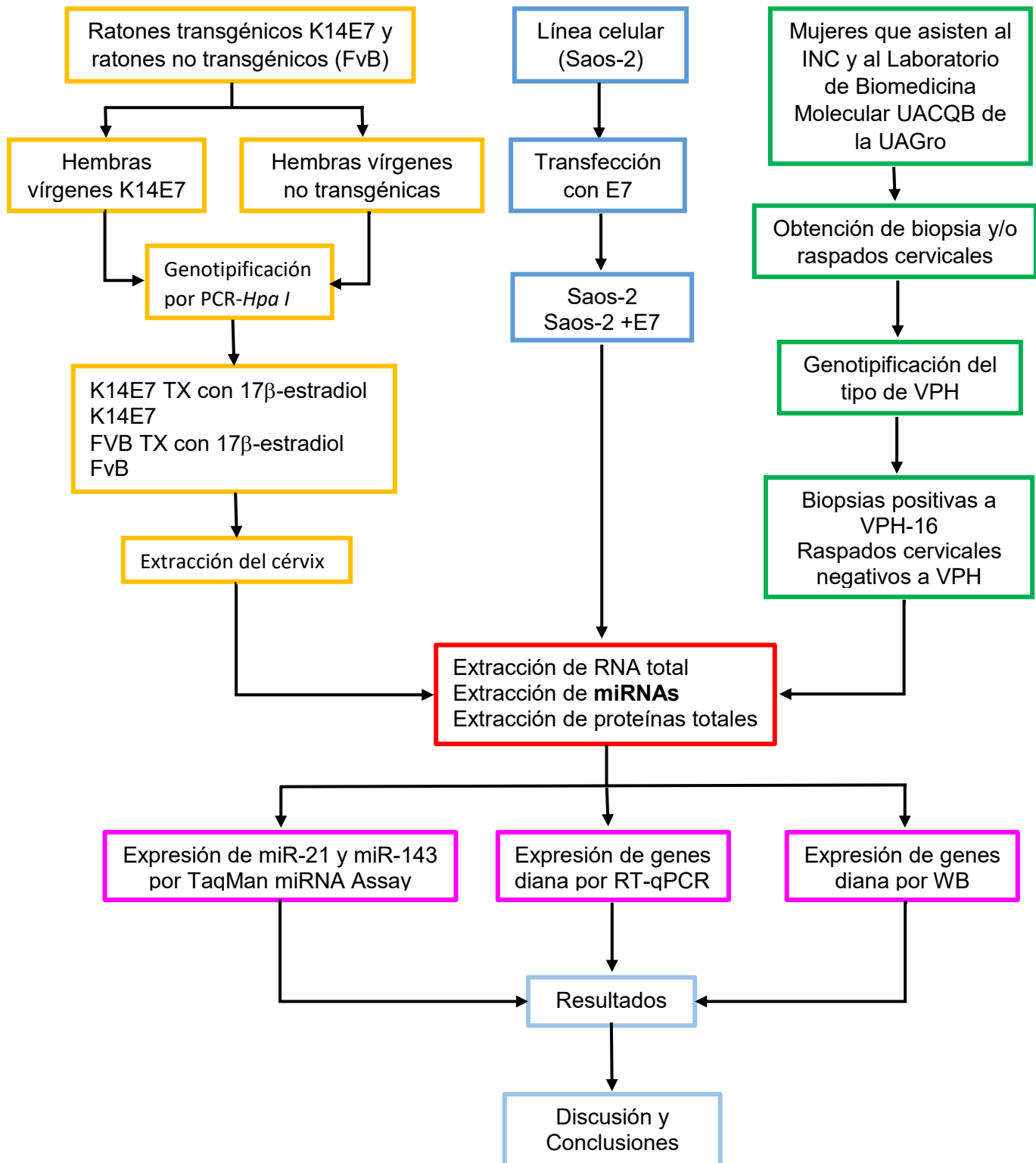
GENERAL

Investigar si la oncoproteína E7 del VPH-16 y el 17 β -estradiol (E₂) desregulan la expresión de miR-21, miR-143 y sus genes diana, PTEN y Bcl-2, respectivamente, en tejido cervical de ratones K14E7 con/sin tratamiento durante 6 meses con E₂, así como también en líneas celulares transfectadas con la oncoproteína E7 del VPH-16 y en muestras de pacientes con cáncer cervical positivas a la infección por VPH-16.

ESPECÍFICOS

1. Evaluar los cambios de expresión de miR-21 y miR-143 provocados únicamente por la oncoproteína E7 del VPH-16 usando tejido cervical de ratones transgénicos K14E7.
2. Evaluar los cambios de expresión de miR-21 y miR-143 provocados por la oncoproteína E7 del VPH-16 y el 17 β -estradiol (E₂), usando tejido cervical de ratones transgénicos K14E7+E₂.
3. Evaluar los cambios de expresión de miR-21 y miR-143 provocados únicamente por el E₂ usando tejido cervical de ratones no transgénicos (FvB+E₂).
4. Evaluar los cambios de expresión de miR-21 y miR-143 en líneas celulares transfectadas con la oncoproteína E7 (Saos-2 + E7).
5. Evaluar la expresión de PTEN y Bcl-2, genes diana de miR-21 y miR-143, respectivamente, a nivel de mensajero y proteína, tanto en el modelo *in vivo* (ratones transgénicos K14E7) como en el modelo *in vitro* (Saos-2 + E7).
6. Evaluar la expresión de miR-21 y miR-143 en tejido cervical de pacientes con CC positivas a la infección por VPH-16.
7. Evaluar la expresión de miR-21 y miR-143 en tejido cervical sano y negativo a la infección por VPH-16

VI. DIAGRAMA DE TRABAJO



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MUESTRAS CLÍNICAS.

Se trabajó con 10 cepillados cervicales de mujeres sanas y negativas a la infección por VPH y 14 muestras de tejido cervical de pacientes con CC positivas a la infección de VPH-16 captadas, y genotipificadas por pruebas moleculares para identificación de VPH, entre los años 2012 y 2013 en los laboratorios de Biomedicina Molecular y Citología de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas (UACQB) de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo, Guerrero y en el Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México, México. Este Trabajo fue aprobado por el comité de ética de ambas instituciones. El consentimiento Informado fue obtenido de cada una de las participantes.

Los raspados celulares de las mujeres sanas y negativas a la infección por VPH fueron resuspendidos en buffer fosfato salino [(6.4 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 140 mM NaCl y 2.7 mM KCl (pH 7.2)] y mantenidos sobre hielo hasta su procesamiento. Las muestras fueron centrifugadas y lavadas con buffer de lavado [10 mM HEPES/KOH (pH 7.5), 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl y 1 mM ditiotretitol], posteriormente el botón celular fue congelado con nitrógeno líquido y fue almacenado a -80°C para usarse en la obtención y cuantificación de miRNAs y ARNm.

7.2. LÍNEAS CELULARES

La línea celular de Osteosarcoma (Saos-2) fue obtenida de la "American Type Culture Collection (ATCC)". Estas células fueron cultivadas en Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mM L-glutamina y 100 U/mL penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e incubadas a 37°C en un ambiente húmedo con un 5% de CO_2 . La transfección del oncogén E7 (plásmido pcDNA3E7) fue realizada usando lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Con el fin de obtener una línea celular estable, se seleccionaron las células transfectadas durante 2 semanas en un medio de crecimiento que contuvo

1,200 µg/ml de geneticina (G418) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para mantener las clonas seleccionadas, las células se mantuvieron en cultivo con 800 µg/ml de G418.

7.3. RATONES TRANSGÉNICOS

Ratones hembra FvB fueron obtenidas de la cruce de ratones con fondo genético FvB (no transgénico, NT), mientras que los ratones hembra transgénicas K14E7 fueron obtenidas de la cruce de un macho K14E7 heterocigoto y una hembra FvB, de acuerdo a lo reportado por Herber et al., 1996 y Riley et al., 2003. Todos los ratones fueron criados en instalaciones libre de patógenos, de acuerdo a lo indicado por la Asociación América del Cuidado de Animales de Laboratorio-Internacional (AAALAC-Internacional). Todos los experimentos y procedimientos en los ratones fueron aprobados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL-CINVESTAV-IPN, México; NOM-062-ZOO-1999).

El ratón transgénico K14E7 tiene insertado en su genoma el gen de la oncoproteína E6 y E7 bajo el control de la queratina 14 (K14), sin embargo, en la región correspondiente a E6 contiene un terminador de la traducción, el cual permite que sólo se traduzca la oncoproteína E7 dándoles características fenotípicas muy particulares como piel arrugada, catarata en ambos ojos y menor peso. Para la genotipificación de estos ratones, se amplificó un fragmento de 800pb correspondientes al transgén que posteriormente fue sometido a una digestión con la enzima *HpaI*, la cual realiza el corte a nivel del terminador de la traducción, generando dos fragmentos de DNA de 750 y 50 pb que caracterizan a los ratones transgénicos, fragmentos que fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% con una tinción con bromuro de etidio.

7.4. TRATAMIENTO HORMONAL

Los ratones hembra FvB y K14E7 fueron tratados con 17β-estradiol (E₂) de acuerdo a lo reportado previamente (Riley et al., 2003). Brevemente, los animales tratados con estradiol, iniciaron su tratamiento al mes de edad con un “pellet” insertado en la zona dorsal, el cual liberan 0.05 mg de E₂/60días (Innovative

Research of America, Sarasota, FL). Los ratones fueron tratados con la hormona durante 6 meses; a lo largo de todo el tratamiento fueron requeridas la inserción de 3 “pellets”. Por tanto, al término de los tratamientos los animales tuvieron 7 meses de edad. Fueron incluidos 4 grupos, de 5 ratones hembra en cada uno, que consistieron en: 1) hembras K14E7 tratadas con 17β -estradiol (K14E7+E₂), 2) hembras K14E7 sin tratamiento (K14E7), 3) hembras no transgénicas tratadas con 17β -estradiol (NT+E₂) y 4) hembras no transgénicas sin tratamiento (NT).

7.5. SACRIFICIO DE RATONES Y DISECCIÓN DEL TEJIDO CERVICAL

Una vez concluidos los tiempos de tratamiento, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente se extrajo el cérvix, el cual fue colocado en solución “RNA later” (Ambion) para conservar la integridad del RNA y almacenado a -20 °C toda la noche. El tejido se recuperó de la solución con unas pinzas estériles, se eliminó el exceso “RNA later” e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y fueron almacenados a -80 °C hasta su uso.

7.6. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

El método de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) fue utilizado para extraer ARN total (ARNs grandes y pequeños) de la línea celular (Saos-2) y de los tejidos cervicales, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La integridad y concentración del RNA fue evaluada por medio de espectrofotometría midiendo la relación de la absorbancia 260/280 y por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

7.7. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE miRNAs Y ARNm UTILIZANDO PCR EN TIEMPO REAL

Para evaluar los niveles de expresión de miRNAs maduros en la línea celular y en tejido cervical, primero fue realizada la retrotranscripción de miRNAs a cDNA, empleando 5-10 ng de ARN y con oligonucleótidos de transcripción reversa (RT) específicos contenidos en el Kit “*TaqMan MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA). La mezcla de reacción para la RT de los *miRNAs*

consistió de 1.5 μL 10X buffer de RT, 0.2 μL dNTPs (100 mM cada uno), 1 μL de MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/mL), 0.19 μL de AB RNase Inhibitor (20 U/ μL), 3 μL 5X RT primers, 5-10 ng/ μL de ARN total en un volumen final de 15 μL . La reacción fue incubada en un termociclador (Applied Biosystems) para placas de 96 pocillos por 30 minutos a 16 °C, 30 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C y una etapa final a 4 °C.

La PCR tiempo real para detectar los niveles de los miRNAs se realizó usando TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems), junto con TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Brevemente, la mezcla de reacción estuvo compuesta de 10 μL de 4X TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1.33 μL de producto de RT (diluido 1:15), 1.0 μL de TaqMan® MicroRNA Assays [miR-21 (ID 000397) y miR-143 (002249), Applied Biosystems], en un volumen final de 20 μL . Las condiciones de amplificado: etapa inicial a 95 °C por 10 min, 40 ciclos: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 min, todos los experimentos fueron realizados en el termociclador Applied Biosystems 7300 Detection system (Applied Biosystems). La expresión relativa de los miRNAs en células y en los ratones fue normalizada con RNU6B (001093; Applied Biosystems) y SnoRNA202 (001232, Applied Biosystems), respectivamente.

Para la cuantificación de mRNA específico, el RNA total (1 μg) fue convertido a cDNA usando Kit “SuperScript™ II First Strand Synthesis (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La PCR en tiempo real fue realizada con Applied Biosystems 7300 Detection system (Foster City, CA) y usando SYBR Green PCR Reagents kit (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y usando los oligonucleótidos del cuadro 2. Las condiciones de amplificado: etapa inicial a 95 °C por 10 min, 40 ciclos: 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72°C por 1 min.

La reacción (25 μL de volumen final) consistió de 12.5 μL de SYBR Green PCR Master Mix [Taq ADN polimerasa, Buffer de reacción, mezcla de dNTP, 1 mM MgCl_2 (concentración final) y SYBR Green I dye (Applied Biosystems)], 1 μL de cada oligonucleótido (0.5 μM), 500 ng de cDNA por reacción y agua milli-Q. La secuencia de los oligonucleótidos y los tamaños de los productos de PCR son mostrados en

el cuadro 2. Todas las reacciones fueron realizadas en 5 ratones diferentes y la expresión relativa de los ARNms en células y en los ratones fue normalizada a la expresión de β 2M y HPRT, respectivamente. La expresión de los miRNAs y ARNms fue determinada con el ciclo umbral (C_t) y los niveles relativos de expresión fueron calculados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Nolan et al., 2006).

Cuadro 2. Secuencias de los oligonucleótidos usados en este trabajo

| | Oligonucleótido sentido | Oligonucleótido antisentido | Temperatura (°C) | Tamaño del amplificado (pb) |
|---------------|-------------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------------|
| Ratón | | | | |
| PTEN | GGATGTCGTCCTGAAGGGAG | GCTTCGCTGGAGGAACCTG | 60 | 108 |
| BCL2 | ACTTCGCAGAGATGTCCAGTCA | TGGCAAAGCGTCCCCTC | 60 | 63 |
| HPRT | CCAGCAAGCTTGCAACCTTAAC | GTAATGATCAGTCAACGGGGG | 60 | 177 |
| Humano | | | | |
| PTEN | GGTCATGTGTGTGGAGAGC | GATCCAGGTGTGCAGGTG | 60 | 78 |
| BCL2 | CCGAAAGGTTTTGCTACCATTCT | AAAATTATTTCTTTCTGAGCATTCC | 60 | 105 |
| β 2M | ACCCCCACTGAAAAAGATGAG | ATGATGCTGCTTACATGTCTCG | 60 | 100 |

7.8. WESTERN-BLOT

Las muestras cervicales congeladas (-80°C) fueron pulverizadas utilizando un mortero con pistilo en nitrógeno líquido. La línea celular y las muestras cervicales fueron lisadas utilizando el buffer de lisis (25 mM Tris, pH7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS) suplementado con inhibidores de proteasas y fueron incubadas 4°C por 30 minutos. El homogenizado resultante se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C , se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta su uso. La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método Bradford. Las proteínas (20 μg) fueron desnaturalizadas por calentamiento y corridas en geles SDS-PAGE al 10%. Las proteínas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa, la membrana fue bloqueada por una hora con leche libre de grasa al 10% en TBS 1X (Tris-HCl 20 mmol/L pH 7.5, NaCl 150 mmol/L). Posteriormente fue incubada toda la noche con los anticuerpos PTEN (1:500; Sc-7974, Santa Cruz, Biotechnology Inc., CA) y Bcl-2 (1:500; Sc-7382, Santa Cruz, Biotechnology Inc., CA). Al siguiente día la membrana fue lavada 3 veces por

5 minutos con TBST 1X (Tris-HCl 20 mmol/L pH 7.5, NaCl 150 mmol/L y Tween-20 0.5%) e incubada por 1 hora con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo (SIGMA-ALDRICH) acoplados a peroxidasa de rábano. La membrana se reveló con Super Signal^R West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo scientific), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La quimioluminiscencia fue detectada usando FujiFilm LAS-3000 imaging system. Para determinar la expresión relativa de las proteínas fue usado el software Imagen J.

7.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados en el software GraphPad (v5.0; GraphPad Software, Inc., USA). La prueba de Mann-Whitney fue utilizada para comparar las diferencias de los niveles de miRNAs, mRNAs y proteínas entre los grupos y los resultados son presentados como medias y desviación estándar (SD). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

VIII. RESULTADOS

8.1. LA ONCOPROTEÍNA E7 Y EL 17 β -ESTRADIOL AFECTAN LA EXPRESIÓN DE miR-21 Y miR-143 EN TEJIDO CERVICAL DEL RATÓN TRANSGÉNICO K14E7

La infección por VPH-16 y la presencia de los estrógenos son considerados dos de los factores de riesgo importantes en el desarrollo de CC. La oncoproteína E7 del VPH-16 es el principal factor responsable del bloqueo de la salida del ciclo celular durante la diferenciación (Arbeit et al., 1996; Crosbie et al., 2013). Teniendo en cuenta que en el modelo transgénico de cáncer cervical (ratón K14E7), la exposición crónica a 17 β -estradiol (E₂) es importante para que este modelo desarrolle neoplasias, investigamos en tejido cervical de ratón el efecto individual y combinado de la oncoproteína E7 del VPH-16 y del E₂ sobre la expresión de miR-21 y miR-143, los cuales se han observado que juegan un papel muy importante en la regulación de genes relacionados con proliferación y supervivencia celular, como son PTEN y BCL2, respectivamente. El análisis de la expresión de los miRNAs en tejido cervical por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) mostró que los niveles de expresión de miR-21 fueron significativamente más altos en ratones K14E7 y/o tratados con E₂, comparado con los niveles de expresión en ratones no transgénicos (NT); los niveles de expresión de miR-21 en los ratones NT+E₂ fueron incrementados 4.88 veces (p= 0.004; Figura 7A). En ratones transgénicos K14E7 sin tratamiento con E₂ comparados con NT, miR-21 también fue incrementado (7.77 veces, p=0.009; Figura 7A). En ratones K14E7+E₂ el promedio de expresión de este miRNA oncogénico fue de 7.58 veces (p=0.004; figura 7A). Por lo que en ratones de 7 meses de edad tanto la oncoproteína E7 del VPH-16 como los E₂ claramente inducen los altos niveles de expresión de miR-21. Al contrario de lo observado con miR-21, los niveles de expresión de miR-143 (considerado un miRNA supresor de tumor) fueron bajos en presencia de la oncoproteína E7 y por el tratamiento con E₂ en tejido cervical. Comparando con el ratón NT, la expresión de miR-143 en ratones NT+E₂ fue menor (promedio de cambio: 0.42 veces), (Figura 7B). En tejido cervical de los ratones

K14E7 sin tratamiento con E₂, los niveles de expresión de miR-143 fueron también significativamente bajos (0.43 veces; $p=0.007$; Figura 7B). Asimismo, fue observado que los niveles de miR-143 fueron significativamente bajos (0.41 veces) en los ratones transgénicos con tratamiento con E₂ comparados con los ratones NT ($p=0.009$; figura 7B). Estos datos muestran que en tejido cervical del modelo murino K14E7 y el tratamiento con E₂ incrementan los niveles de miR-21 y disminuyen los de miR-143.

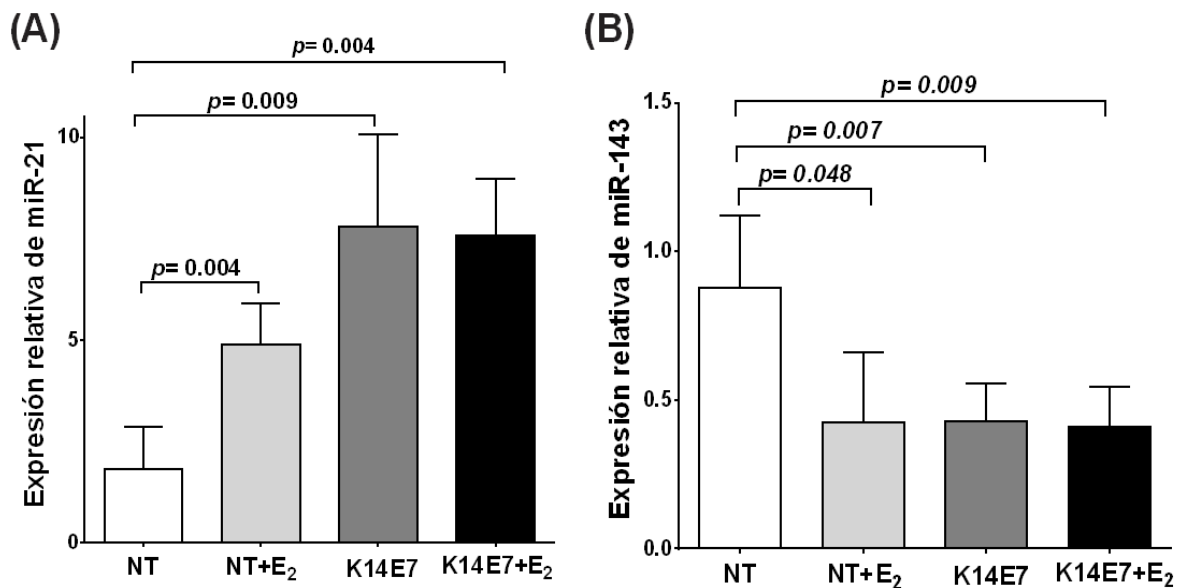


Figura 7. Efecto de la oncoproteína E7 del VPH-16, E₂, E7+E₂ sobre los niveles de expresión de miR-21 y miR-143 en tejido cervical de ratones de 7 meses de edad. Niveles de expresión de miR-21 (A) y miR-143 (B) en tejido cervical de ratones K14E7 y NT con y sin tratamiento con E₂ durante 6 meses (7 meses de edad). Para detectar la forma madura de los miRNAs fueron realizados los ensayos TaqMan de miRNAs (TaqMan microRNA assay). Los experimentos se realizaron en cada uno de los tres ratones por grupo; la expresión relativa de los miRNAs fue normalizada a la expresión de Sno202 y son expresados como medias \pm desviación estándar (SD). La prueba de Mann-Whitney se realizó para determinar la significancia estadística con un valor de $p < 0.05$. E₂: 17 β -estradiol. NT: no transgénico.

8.2. EXPRESIÓN DE GENES DIANA DE LOS miRNAs EN TEJIDO CERVICAL DEL RATÓN K14E7.

Se ha reportado que miR-21 está involucrado en la regulación negativa de la expresión de PTEN en cáncer. Sin embargo, la función de miR-143 para regular negativamente a Bcl-2 se modifica en el contexto de tejido canceroso. Usando el

modelo murino K14E7, se investigó si el aumento en la expresión de miR-21 inducida por los E₂ y la oncoproteína E7 puede reprimir los niveles de expresión de ARNm y proteína de uno de sus genes blanco, homólogo de la fosfatasa y tensina (PTEN). En este estudio se observó que tanto los niveles del ARNm, así como de proteína de PTEN en ratones NT+E₂ comparados con los ratones NT aumentaron (ARNm: 1.69 veces; proteína: 1.93 veces, Figura 8A y 8C). En el tejido cervical de ratones transgénicos K14E7 se observó una disminución en los niveles del ARNm de PTEN (0.007 veces), mientras que en ratones K14E7+E₂ comparado con los ratones NT los niveles del ARNm de PTEN fue de 0.23 veces (figura 8A). Además, en los ratones transgénicos K14E7 y K14E7+E₂, los niveles de la proteína de PTEN también fueron disminuidos, aunque esta disminución en los ratones K14E7+E₂ no fue estadísticamente significativa (p=0.258). Se realizó una Correlación de Pearson's para evaluar que mientras la expresión de miR-21 aumenta la expresión de PTEN disminuye. En los ratones transgénicos K14E7 fue observada una correlación inversa entre los niveles de miR-21 y los niveles de ARNm y proteína (Correlación de Pearson's $r = -0.881$, $p = 0.049$; $r = -0.898$, $p = 0.039$, respectivamente), mientras que en ratones NT+E₂ and K14E7+E₂ no fueron correlacionados los niveles de miR-21 y los niveles de ARNm y proteína (Cuadro 3).

Cuadro 3. Correlación de Pearson's entre la expresión de los miRNAs y los niveles de ARNm y proteína

| | NT + E ₂ | | K14E7 | | K14E7 + E ₂ | |
|--|---------------------|----------------|----------|----------------|------------------------|----------------|
| | <i>r</i> | <i>Valor-p</i> | <i>r</i> | <i>Valor-p</i> | <i>r</i> | <i>Valor-p</i> |
| miR-21 | | | | | | |
| Expresión de miR-21 y del ARNm de PTEN | 0.952 | 0.048 | -0.881 | 0.049 | -0.928 | 0.071 |
| Expresión de miR-21 y de la proteína de PTEN | 0.689 | 0.199 | -0.898 | 0.039 | 0.371 | 0.539 |
| miR143 | | | | | | |
| Expresión de miR-143 y del ARNm de Bcl-2 | -0.916 | 0.029 | -0.939 | 0.018 | -0.960 | 0.040 |
| Expresión de miR-143 y de la proteína de Bcl-2 | -0.952 | 0.048 | -0.956 | 0.044 | -0.946 | 0.015 |

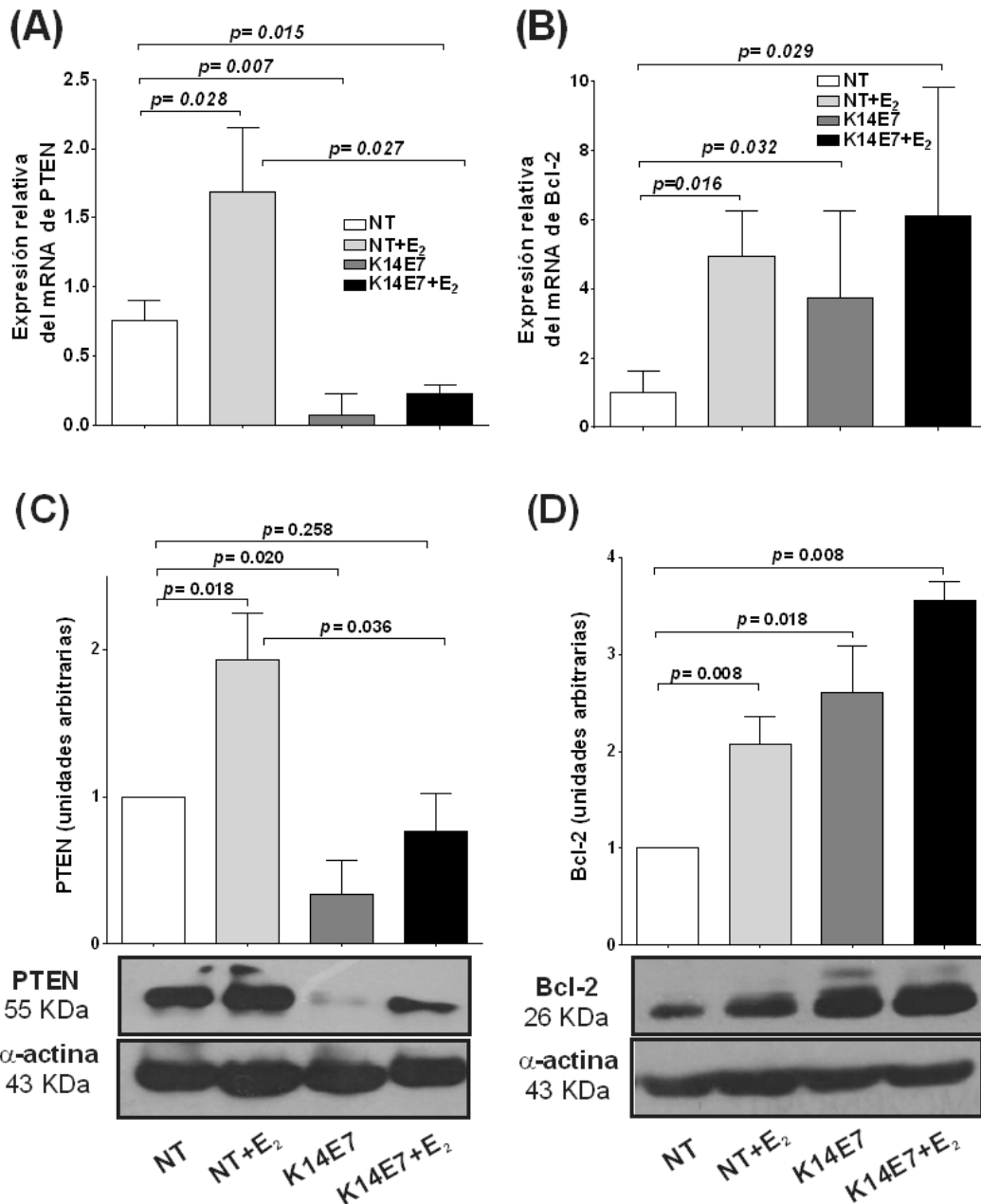


Figura 8. Niveles de expresión de PTEN y Bcl-2 en el modelo de cáncer cervical. Se realizó un análisis de RT-qPCR para determinar los niveles de expresión de PTEN y Bcl-2 (A y B). Análisis de WB y densitometría cuantitativa de los niveles de proteína de PTEN y Bcl-2 (C y D). Los experimentos de RT-qPCR fueron realizados por triplicado y los valores son expresados como medias + SD (normalizado a la expresión de HPRT); la prueba de Mann-Whitney fue realizada para determinar la significancia estadística, la cual fue determinada al comparar la expresión en el epitelio escamoso de ratones NT vs ratones NT+E₂, K14E7 and K14E7+E₂. El análisis de WB fue realizado en tejido cervical de ratones NT y transgénicos K14E7 con y sin tratamiento con E₂. Los experimentos fueron realizados por triplicado y fueron normalizados a la expresión de α -actina. La significancia estadística fue determinada con un valor de $p < 0.05$. E₂: 17 β -estradiol, NT: no transgénico, SD: desviación estándar, WB: western blot.

Observamos que la expresión de miR-143 fue significativamente disminuída por los E₂ y la oncoproteína E7 del VPH-16 en tejido cervical (figura 7B). Realizamos análisis de RT-qPCR y Western-blot para determinar si los niveles bajos de miR-143 correlacionan con el incremento de los niveles de ARNm y proteína de Bcl-2 en cáncer cervical. Como es mostrado en la figura 8B, la baja expresión de miR-143 correlacionó con el incremento significativo del ARNm de Bcl-2 en los ratones con y sin tratamiento con E₂ (NT+E₂: 2.07; K14E7: 2.60; K14E7+E₂: 3.56 veces), figura 8D. Utilizando un análisis de correlación de Pearson's fue observada en el tejido cervical del ratón K14E7 una correlación inversamente proporcional entre los niveles de miR-143 y los niveles de expresión del ARNm y proteína de Bcl-2 ($r=-0.939$, $p=0.018$; $r=-0.956$, $p=0.044$, respectivamente) (Cuadro 3). Estos resultados indican que la expresión de PTEN fue disminuída y la expresión de Bcl-2 fue aumentada en el modelo de cáncer cervical K14E7, lo cual es correlacionado con los altos niveles de miR-21 y los bajos niveles de miR-143, respectivamente.

8.3. EL AUMENTO DE LOS NIVELES DE miR-21 EN PRESENCIA DE LA ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH-16 SE ASOCIA CON LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PTEN EN LA LÍNEA CELULAR SAOS-2.

Para confirmar que la oncoproteína E7 altera los niveles de miR-21 y miR-143, la línea celular Saos-2 fue transfectada establemente con el oncogén E7 del VPH-16. La expresión de la oncoproteína E7 condujo a altos niveles de miR-21 (2.14 veces, $p=0.029$), figura 9A. Para determinar si los altos niveles de expresión de miR-21 ocasionados por la oncoproteína E7 del VPH-16 pueden conducir a la disminución de los niveles de su gen blanco, por análisis de RT-qPCR y Western-blot fue evaluada la expresión de PTEN. Como se muestra en la figura 10A y 10B, los niveles de expresión de PTEN fueron significativamente disminuidos en células Saos-2 comparadas con las células control (células Saos-2 transfectadas con el plásmido pcDNA3). [PTEN ARNm: 0.19 ($p=0.006$); PTEN proteína: 0.60 ($p=0.002$)]. Estos resultados indican que los altos niveles de miR-21 ocasionados en la

presencia de la oncoproteína E7 del VPH-16 conducen a la disminución de los niveles de expresión tanto ARNm como proteína de PTEN.

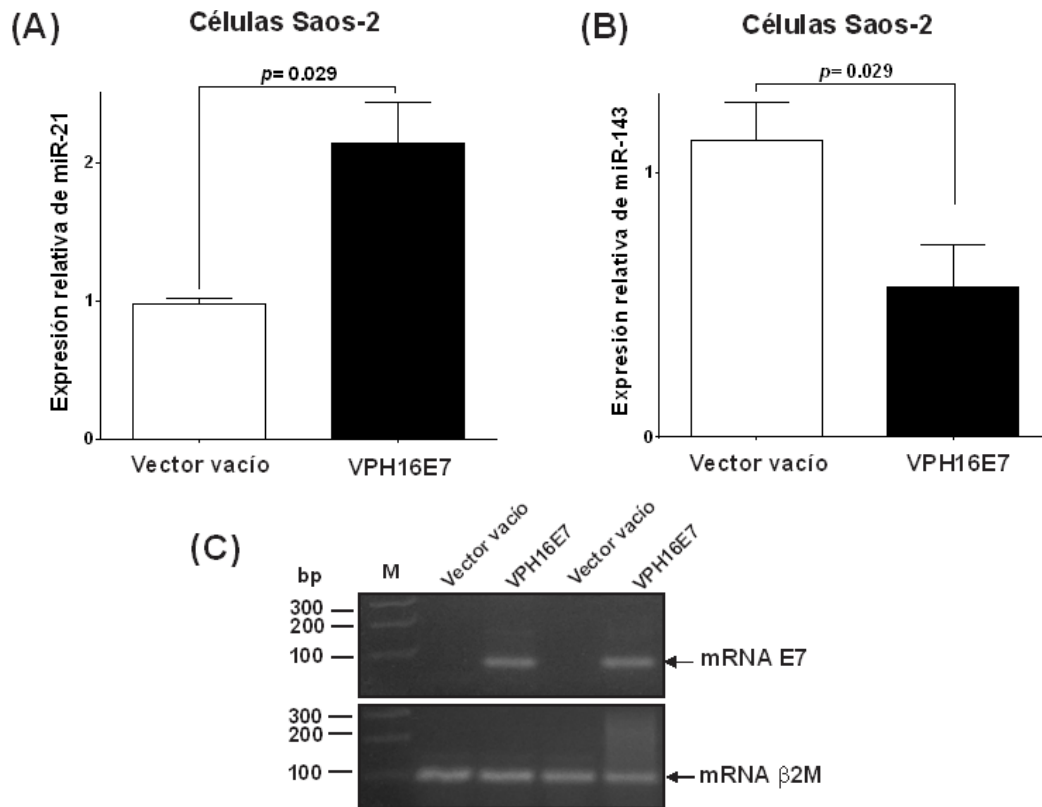


Figura 9. Efecto de la oncoproteína E7 del VPH-16 sobre los niveles de expresión de miR-21 y miR-143. La línea celular Saos-2 fue establemente transfectada con pcDNA3 (vector vacío) o con el plásmido que expresa la oncoproteína E7 del VPH-16 (pcDNA3E7). En células que expresan establemente la oncoproteína E7, los niveles de expresión de miR-21 fueron elevados (media \pm SD; 2.14 ± 0.58 , $p=0.029$, panel A). Los niveles de expresión de miR-143 fueron menores en aquellas células que expresaron la oncoproteína E7 (media \pm SD; 0.56 ± 0.32 , $p=0.029$, panel B). Expresión del transcrito de E7 en células Saos-2 establemente transfectadas (panel C). La flecha indica la expresión del oncogén E7 y β 2M, respectivamente. La expresión de miR-21 y miR-143 fue normalizada a la expresión de U6 snRNA. Cada barra representa la media de tres experimentos independientes. La significancia estadística fue determinada con un valor de $p < 0.05$. SD: desviación estándar, β 2M: Beta-2-microglobulina.

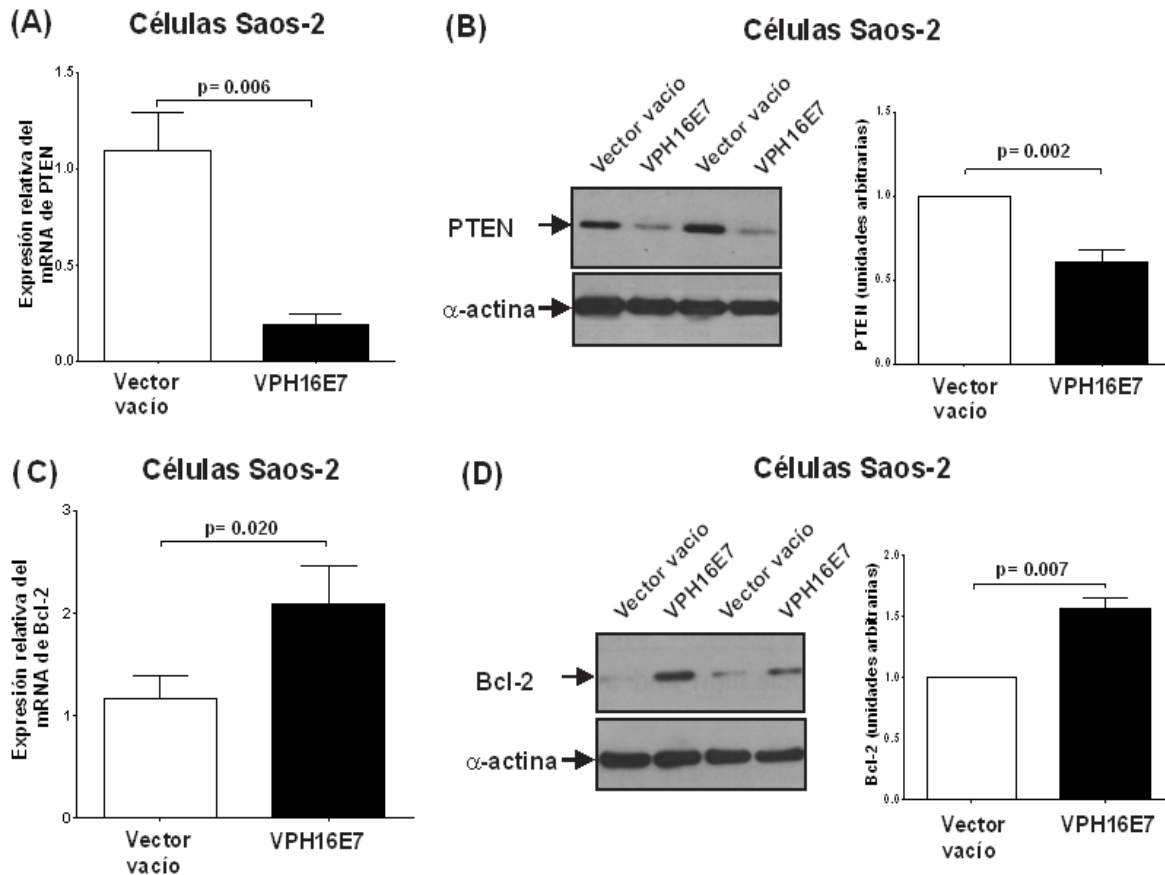


Figura 10. La oncoproteína E7 del VPH-16 altera los niveles de PTEN y Bcl-2. La línea celular Saos-2 fue transfetada establemente. En el panel A y C se muestra el análisis de RT-qPCR del ARNm de PTEN y Bcl-2, respectivamente. En el panel B y D se muestra en análisis de Western-blot (WB) y el análisis densitométrico de la proteína de PTEN y Bcl-2 en células Saos-2 establemente transfetadas. Los análisis de RT-qPCR y WB fueron realizados en tres cultivos celulares independientes y los valores son expresados como medias \pm SD. Los niveles relativos de expresión del ARNm de PTEN y Bcl-2 fueron normalizados a los niveles de expresión de HPRT, mientras que los niveles de proteínas fueron normalizados a la expresión de α -actina. La prueba de Mann-Whitney fue utilizada para determinar la significancia estadística de la expresión del ARNm y proteína de PTEN y Bcl-2 en células Saos-2 que expresan E7 (pcDNA3E7) contra las células que fueron transfetadas con el plásmido pcDNA3 (vector vacío).

8.4. LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE miR-143 EN PRESENCIA DE LA ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH-16 SE ASOCIA CON EL AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE Bcl-2 EN LA LÍNEA CELULAR SAOS-2.

Fue observado en la línea celular Saos-2 que la oncoproteína E7 del VPH-16 ocasiona la disminución de los niveles de miR-143 (Figura 9B). Para evaluar si los bajos niveles de expresión de miR-143 en células Saos-2 que expresan la

oncoproteína E7 pueden conducir al aumento de los niveles de su gen blanco, los niveles de ARNm y proteína de Bcl-2 fueron determinados. En la figura 10C y 10D se muestra que los niveles de Bcl-2 fueron significativamente aumentados en la línea celular Saos-2 que expresa la oncoproteína E7 del VPH-16 [Bcl-2 ARNm: 2.09 ($p=0.020$); Bcl-2 proteína: 1.56 ($p=0.007$)]. Estos resultados sugieren que los bajos niveles de miR-143 ocasionados por la oncoproteína E7 conducen al aumento de la expresión del ARNm y proteína de Bcl-2.

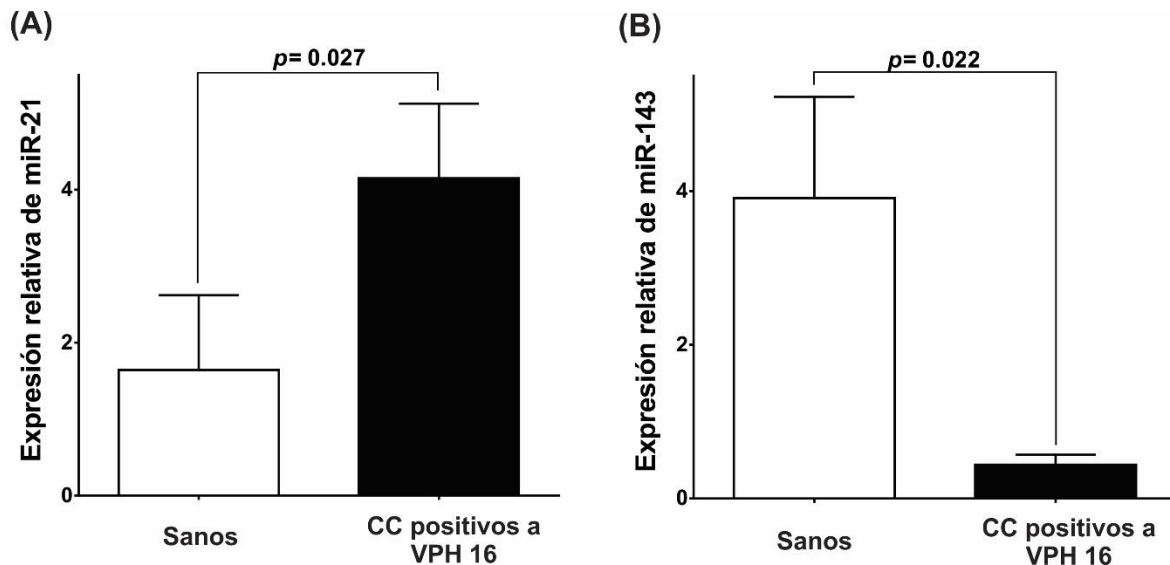


Figura 11. Expresión de miR-21 y miR-143 en pacientes con cáncer cervical y en mujeres sanas. La evaluación de los niveles de expresión de miR-21 y miR-143 fue realizada en 10 cepillados cervicovaginales de mujeres sanas negativas a la infección por VPH y 14 muestras de pacientes con cáncer cervical positivas a la infección por VPH-16. Los datos obtenidos de la expresión de miR-21 y miR-143 fueron por análisis de RT-qPCR. (A) Los niveles de expresión de miR-21 fueron altos en pacientes con CC positivas a VPH-16 (media \pm SD; 4.15 \pm 0.97, $p=0.027$) comparados con la expresión en mujeres sanas. (B) Los niveles de expresión de miR-143 fueron menores en pacientes con CC positivas a VPH-16 (media \pm SD; 0.44 \pm 0.12, $p=0.022$) comparados con los de expresión en mujeres sanas. La expresión relativa de miR-21 y miR-143 fue normalizada a la expresión de U6 snRNA. CC: cáncer cervical, SD: desviación estándar.

8.5. LA EXPRESIÓN DE miR-21 Y miR-143 ES ALTERADA POR EL VPH-16 EN PACIENTES CON CÁNCER CERVICAL.

En este estudio también fue confirmado el patrón de expresión de miR-21 y miR-143 en muestras de pacientes con cáncer cervical positivos a la infección por VPH-16 comparado con raspados cervicovaginales de mujeres sanas negativas a la infección por VPH, como fue reportado anteriormente en líneas derivadas de CC,

se confirma en muestras de pacientes positivas a la infección por VPHs (Deftereos et al., 2011; Liu et al., 2011). El análisis de TaqMan RT-qPCR mostró que en pacientes con CC positivas a la infección por VPH-16 los niveles de expresión de miR-21 fueron significativamente altos (4.15 veces, $p=0.027$, Figura 11A), mientras que los niveles de miR-143 fueron significativamente bajos (0.44 veces, $p=0.021$, Figura 11B) comparado a las mujeres aparentemente sanas negativas a la infección por VPH. Estos resultados obtenidos en pacientes apoyan la hipótesis de que el VPH-16 a través de sus oncoproteínas juega un papel muy importante en la desregulación de la expresión de miR-21 y miR-143 en cáncer cervical.

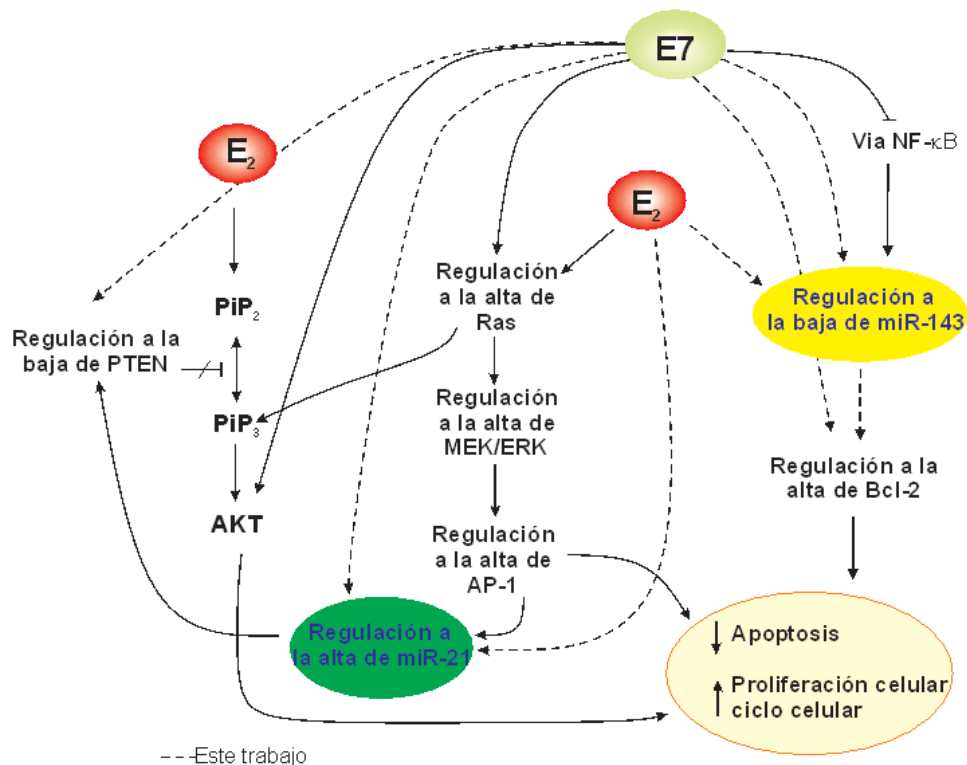


Figura 12. Modelo de cómo la oncoproteína E7 del VPH-16 y el E₂ alteran los niveles de miRNAs y los procesos celulares. La oncoproteína E7 del VPH-16 y el E₂ inducen los altos niveles de miR-21 a través de la activación de la vía de Ras y MEK/ERK, lo cual conduce a la activación de AP-1, que actúa como factor de transcripción de miR-21. Los altos niveles de miR-21 promueven crecimiento y proliferación celular por inhibir los niveles de sus genes blancos (tales como PTEN), evadiendo la regulación de la vía de PI3K/AKT; esta vía también es favorecida por la oncoproteína E7 del VPH-16 y por el E₂ vía Ras. Por otro lado, la oncoproteína E7 del VPH-16 y los estrógenos regulan a la baja la expresión del supresor de tumor miR-143, conduciendo a altos niveles de la proteína de Bcl-2, lo cual conlleva a la protección de muerte celular por apoptosis. Así, la oncoproteína E7 del VPH-16 y los estrógenos juegan un papel muy importante en CC al favorecer crecimiento, proliferación y supervivencia celular a través de la regulación de la expresión de miRNAs.

IX. DISCUSIÓN

La infección por VPH y el E₂ son considerados factor de riesgo en el desarrollo de cáncer cervical (Arbeit et al., 1996; Riley et al., 2003; The International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2007); aproximadamente el 95% de estos cánceres son asociados con la infección persistente de VPHs de alto riesgo (The International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2007). Se ha observado que los VPHs de alto riesgo pueden modificar el patrón de expresión de los miRNAs (Li et al., 2011; Lui et al., 2007; McBee et al., 2011; Pereira et al., 2010; Wang et al., 2008), pero específicamente la participación de la oncoproteína E7 del VPH-16 y la del E₂ no ha sido estudiada. En este trabajo se usó un modelo murino de carcinogénesis cervical asociado a VPH (ratón transgénico K14E7), el objetivo principal fue investigar si la alta expresión de miR-21 y los bajos niveles de miR-143 observados en CC son asociados con la presencia de la oncoproteína E7 del VPH-16 y el E₂. Adicionalmente, se evaluó si la oncoproteína E7 está involucrada en la desregulación de la expresión de miR-21 y miR-143 *in vitro*, esto usando una línea celular (Saos-2) que expresa la oncoproteína E7 del VPH-16.

La neoplasia epitelial escamosa observada en los ratones transgénicos K14E7 progresa de lesión intraepitelial de bajo grado a displasia cervical de alto grado y finalmente a cáncer invasivo, después de seis meses de tratamiento crónico con dosis bajas de E₂, imitando la progresión maligna en mujeres (Riley et al., 2003). Se conoce que en diferentes tipos de cáncer incluido CC, miR-21 es altamente expresado (Li et al., 2011; Lui et al., 2007; McBee et al., 2011; Pereira et al., 2010; Wang et al., 2008) y también se ha observado que la expresión de miR-21 en muestras de pacientes con CC positivas a la infección por VPHs se correlaciona con la progresión de lesiones cervicales de alto grado a CC, por lo que se ha propuesto que pudiera ser un biomarcador de carcinogénesis asociada a VPHs (Gocze et al., 2015). Observamos una alta expresión de miR-21 en el modelo murino K14E7 y en la línea celular Saos-2 que expresa la oncoproteína E7 del VPH-16 comparando con los controles. Además, encontramos que el tratamiento con E₂ también incrementa los niveles de expresión de miR-21 en ratones transgénicos y no transgénicos (NT).

Estos resultados son similares a lo observado en líneas derivadas de cáncer de mama donde fue reportado que el E₂ induce la expresión de este importante miRNA (Bhat-Nakshatri et al., 2009; Mattie et al., 2006). Nuestros resultados sugieren que en presencia de la oncoproteína E7 del VPH-16 la expresión de miR-21 aumenta tanto *in vivo* como *in vitro* y que el E₂ puede también alterar la expresión de este miRNA *in vivo*.

Muchos genes blancos de miR-21 han sido reportados, dentro de los cuales se encuentran TPM1, PDCD4, CCL20 y el supresor de tumor PTEN (Yao et al., 2009; Yao and Lin, 2012). En cáncer endometrial (Qin et al., 2012) y CC positivo a VPH (Xu et al., 2015) fue reportado que la alta expresión de miR-21 está asociada con la baja expresión del supresor de tumor PTEN. Con base en estos reportes, se investigó si la oncoproteína E7 del VPH-16 sola o en conjunto con el E₂ tiene efecto sobre la expresión de un gen diana de miR-21; para ello se realizó el análisis de la expresión del ARNm y proteína de PTEN en tejido cervical del modelo de ratón transgénico K14E7, así como de la línea celular Saos-2 transfectada establemente para expresar la oncoproteína E7 del VPH-16. Observamos que los niveles de ARNm y proteína fueron significativamente disminuidos tanto en el modelo K14E7 como la línea celular Saos-2 que expresa la oncoproteína E7. Asimismo, nosotros observamos una correlación negativa entre los niveles de miR-21 y los niveles de ARNm y proteína de PTEN, sugiriendo que tanto *in vivo* como *in vitro* la oncoproteína E7 del VPH-16 disminuye la expresión del supresor de tumor PTEN a través del aumento de los niveles miR-21. Nosotros observamos también que miR-21 fue altamente expresado en ratones NT tratados con E₂, mientras que los niveles de ARNm y proteína de PTEN también fueron incrementados en estos ratones, lo cual indica que una dosis crónica de 17 β -estradiol induce un aumento en los niveles de PTEN en tejido cervical, similar a lo reportado en la línea celular HepG2 y en leiomiomas donde fue observado un incremento de la expresión de PTEN, el cual fue atribuido a los E₂ (Jeong et al., 2010; Marino et al., 2003). A pesar de lo observado en el ratón NT+E₂, nosotros encontramos una fuerte disminución de los niveles de PTEN en ratones K14E7 y K14E7+ E₂ (Figura 8A y 8C), este efecto fue atribuido a la expresión de la oncoproteína E7 del VPH-16.

La alta expresión de miR-21 observada en el modelo murino K14E7 pudiera ser explicada porque tanto la oncoproteína E7 y el tratamiento con E₂ tienen un efecto similar al activar una misma vía de señalización. La vía de señalización Ras/ERK juega un papel muy importante en la tumorigénesis y es bien conocido que la oncoproteína E7 y el E₂ causan la activación de esta vía (Miñano et al., 2008; Yuan et al., 2009). La señalización de ERK activa a AP-1 así como a c-Jun y c-Fos, quienes regulan la expresión de genes involucrados en proliferación celular, diferenciación, transformación maligna y metástasis (Eferl and Wagner, 2003). En este sentido, se ha reportado que la oncoproteína E7 induce la expresión de AP-1 (Yuan et al., 2009) y el E₂ incrementa la actividad de este factor de transcripción (Takehashi et al., 2012). La activación de AP-1 pudiera incrementar los niveles de miR-21 porque se ha encontrado que AP-1 activa transcripcionalmente la expresión de miR-21 a través del reconocimiento y unión a sitios conservados para AP-1 en el promotor del gene de miR-21 (Fujita et al., 2008), lo cual pudiera explicar el incremento en los niveles de expresión de miR-21 tanto por la oncoproteína E7 del VPH-16 como por el tratamiento con E₂.

Los niveles incrementados de miR-21 **en presencia de** la oncoproteína E7 o por los E₂ pudiera representar un paso importante hacia el desarrollo de CC, ya que la mayoría de sus genes diana reportados son supresores de tumor como PTEN, el cual se encuentra frecuentemente disminuido en CC (Vázquez-Ulloa et al., 2011; Xu et al., 2015). PTEN regula negativamente proliferación celular a través de la vía de PI3K/AKT (Leslie and Downes, 2002), la cual tiene un papel importante en numerosos procesos celulares, tales como: proliferación **celular**, adhesión, angiogénesis y migración (Bader et al., 2005). Por otro lado, se ha reportado que la oncoproteína E7 y el 17 β -estradiol inducen la vía de señalización AKT (Guo et al., 2006; Menges et al., 2006). La habilidad de la oncoproteína E7 del VPH-16 para elevar la actividad de AKT depende de la inactivación de la familia de proteínas del retinoblastoma (Rb) (Menges et al., 2006), mientras que los E₂ pueden activar la vía de PI3K/AKT por acción dependiente de receptor de estrógenos (ER) (Guo et al., 2006), **por** lo que la activación de la vía PI3K/AKT regula varios mecanismos,

incluidos la activación transcripcional de miR-21 y la inactivación de PTEN en presencia de la oncoproteína E7 del VPH-16 y los E₂ (Figura 12).

miR-143 actúa como un supresor de tumor y ha sido encontrado disminuido en líneas celulares de CC y en tumores cervicales (Deftereos et al., 2011; Li et al., 2011; Liu et al., 2011; Liu et al., 2012; Lui et al., 2007; Martinez et al., 2008; McBee et al., 2011; Pereira et al., 2010; Wang et al., 2008). En este estudio fue encontrado que la expresión de miR-143 fue significativamente disminuido en el modelo K14E7 y en una línea celular (Saos-2) que expresa la oncoproteína E7 del VPH-16; asimismo fue observado que los niveles de expresión de miR-143 fueron disminuidos por los E₂ en los ratones transgénicos y NT tratados con E₂, similar a lo reportado en líneas celulares derivadas de cáncer de mama (Bhat-Nakshatri et al., 2009). Nuestros resultados sugieren por primera vez que la oncoproteína E7 del VPH-16 induce una disminución de la expresión de miR-143 tanto *in vivo* como *in vitro* y que el tratamiento E₂ también está implicado en la disminución de este importante miRNA *in vivo*.

Por otro **lado**, se ha observado que miR-143 está involucrado en la regulación de la expresión de Bcl-2 en CC (Liu et al., 2012), así mismo miR-143 tiene un efecto supresor de la proliferación celular e inducción de la apoptosis, en parte por la disminución de la expresión de Bcl-2 (Liu et al., 2012). **Además**, se ha reportado que la activación anormal de Bcl-2 concuerda con un aumento significativo en la resistencia a la apoptosis de células transfectadas con la oncoproteína E7 (Du et al., 2004). De la misma manera, los E₂ inhiben apoptosis particularmente por la activación transcripcional de Bcl-2 (Perillo et al., 2000). Nosotros observamos que tanto los niveles de mRNA como de proteína de Bcl-2 fueron marcadamente aumentados en el modelo murino K14E7, así como en la línea celular que expresa la oncoproteína E7 del VPH-16. Igualmente, la expresión de Bcl-2 fue incrementada en ratones tratados con E₂, lo cual indica que los estrógenos inducen un aumento de los niveles de Bcl-2 en tejido cervical del ratón, similar a lo observado en líneas celulares derivadas de cáncer de mama (MCF-7) (Perillo et al., 2000). Por otra parte, fue observada una relación inversa entre la expresión de miR-143 y los niveles de mRNA y proteína de Bcl-2, comparable a lo encontrado en

líneas derivadas de cáncer cervical y en tumores cervical humanos (Liu et al., 2012). Una posible explicación para la baja expresión de miR-143 en el modelo murino K14E7 es que este miRNA es transcrito por el factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Zhang et al., 2009), el cual es disminuido por la oncoproteína E7 (Spitkovsky et al., 2002); por lo tanto, en presencia de la oncoproteína E7 del VPH-16 hay una disminución de la expresión de miR-143, lo cual podría dar lugar al aumento de la expresión de Bcl-2 conllevando a un bloqueo de la apoptosis en nuestros modelos (Figura 12).

En este estudio también fue confirmado en muestras de pacientes con CC positivas a la infección de VPH-16 que la expresión de miR-21 fue significativamente aumentada, mientras que la de miR-143 fue disminuida con respecto a cepillados vaginales (negativos a la infección por VPH), como lo reportado en CC positivo a la infección por VPH (Deftereos et al., 2011; Li et al., 2011; Liu et al., 2011; Liu et al., 2012; Lui et al., 2007). Esto es consistente con la hipótesis de que la oncoproteína E7 del VPH-16 **está relacionada con** la desregulación de estos miRNAs en pacientes con CC positivos a la infección del VPH-16.

En conclusión, demostramos el papel de la oncoproteína E7 del VPH-16 y del 17 β -estradiol en la regulación de la expresión de miR-21 y miR-143 en tejido cervical. Dos principales tendencias fueron observadas *in vivo* e *in vitro* en presencia de la oncoproteína E7: 1) elevación de los niveles de expresión miR-21 y disminución de PTEN y 2) miR-143 fue disminuido, mientras que los niveles de Bcl-2 fueron aumentados. También fue observado que los estrógenos están involucrados en la desregulación de los niveles de expresión de miR-21 y miR-143 *in vivo*. Postulamos que la alteración en la regulación de los genes estudiados contribuye a cambios en muchos procesos biológicos que conducen al desarrollo de cáncer cervical, incluyendo la proliferación y la apoptosis. Lo encontrado en este estudio no sólo proporciona información sobre la interrelación entre la oncoproteína E7 del VPH-16, estrógenos y miRNAs en tejido cervical, sino que abre nuevas perspectivas de diagnóstico del CC.

X. REFERENCIAS

- Arbeit, J.M., Howley, P.M., Hanahan, D., 1996. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 2930-2935.
- Arvanitis, D.A., Spandidos, D.A., 2008. Deregulation of the G1/S phase transition in cancer and squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: A case control study. *Oncology Reports* 20, 751-760.
- Attwooll, C., Denchi, E.L., Helin, K., 2004. The E2F family: specific functions and overlapping interests. *The EMBO Journal* 23, 4709-4716.
- Avvakumov, N., Torchia, J., Mymryk, J.S., 2003. Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. *Oncogene* 22, 3833-3841.
- Bader, A.G., Kang, S., Zhao, L., Vogt, P.K., 2005. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature Reviews Cancer* 5, 921-929.
- Barnard, P., McMillan, N.A., 1999. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon- α . *Virology* 259, 305-313.
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136, 215-233.
- Bernard, S., Eilers, M., 2006. Control of cell proliferation and growth by Myc proteins. *Results and Problems in Cell Differentiation* 42, 329-342.
- Bernards, A., Settleman, J., 2009. Loss of the Ras Regulator RASAL1: Another Route to Ras Activation in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 136, 46-48.
- Bernat, A., Avvakumov, N., Mymryk, J.S., Banks, L., 2003. Interaction between the HPV E7 oncoprotein and the transcriptional coactivator p300. *Oncogene* 22, 7871-7881.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Bhat-Nakshatri, P., Wang, G., Collins, N.R., Thomson, M.J., Geistlinger, T.R., Carroll, J.S., Brown, M., Hammond, S., Srour, E.F., Liu, Y., 2009. Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic Acids Research* 37, 4850-4861.
- Bodily, J.M., Mehta, K.P., Laimins, L.A., 2011. Human Papillomavirus E7 Enhances Hypoxia-Inducible Factor 1-Mediated Transcription by Inhibiting Binding of Histone Deacetylases. *Cancer Research* 71, 1187-1195.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., GÖRlich, D., 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185-191.
- Brake, T., Lambert, P.F., 2005. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2490-2495.
- Brehm, A., Nielsen, S.J., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., Kouzarides, T., 1999. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *The EMBO journal* 18, 2449-2458.
- Bueno, M.J., de Cedrón, M.G., Laresgoiti, U., Fernández-Piqueras, J., Zubiaga, A.M., Malumbres, M., 2010. Multiple E2F-induced microRNAs prevent replicative stress in response to mitogenic signaling. *Molecular and Cellular Biology* 30, 2983-2995.
- Burgers, W., Blanchon, L., Pradhan, S., De Launoit, Y., Kouzarides, T., Fuks, F., 2007. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene* 26, 1650-1655.
- Calin, G.A., Croce, C.M., 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews. Cancer* 6, 857-866.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and

- genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2999-3004.
- Córdova-Alarcón, E., Centeno, F., Reyes-Esparza, J., García-Carrancá, A., Garrido, E., 2005. Effects of HRAS Oncogene on Cell Cycle Progression in a Cervical Cancer-Derived Cell Line. *Archives of Medical Research* 36, 311-316.
- Crosbie, E.J., Einstein, M.H., Franceschi, S., Kitchener, H.C., 2013. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet* 382, 889-899.
- Chung, S.-H., Franceschi, S., Lambert, P.F., 2010. Estrogen and ER α : Culprits in Cervical Cancer? *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21, 504-511.
- Chung, S.-H., Wiedmeyer, K., Shai, A., Korach, K.S., Lambert, P.F., 2008. Requirement for estrogen receptor α in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Research* 68, 9928-9934.
- Deftereos, G., Corrie, S.R., Feng, Q., Morihara, J., Stern, J., Hawes, S.E., Kiviat, N.B., 2011. Expression of mir-21 and mir-143 in cervical specimens ranging from histologically normal through to invasive cervical cancer. *PLoS ONE* 6, e28423.
- Deligeoroglou, E., Michailidis, E., Creatsas, G., 2003. Oral contraceptives and reproductive system cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 997, 199-208.
- Delvenne, P., Herman, L., Kholod, N., Caberg, J.-H., Herfs, M., Boniver, J., Jacobs, N., Hubert, P., 2007. Role of hormone cofactors in the human papillomavirus-induced carcinogenesis of the uterine cervix. *Molecular and Cellular Endocrinology* 264, 1-5.
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., Hannon, G.J., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.
- Deroo, B.J., Korach, K.S., 2006. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation* 116, 561-570.
- Dimitrakakis, C., Kymionis, G., Diakomanolis, E., Papaspyrou, I., Rodolakis, A., Arzimanoglou, I., Leandros, E., Michalas, S., 2000. The Possible Role of p53 and bcl-2 Expression in Cervical Carcinomas and Their Premalignant Lesions. *Gynecologic Oncology* 77, 129-136.
- Doorbar, J., 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 110, 525-541.
- Doorbar, J., Campbell, D., Grand, R., Gallimore, P., 1986. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *The EMBO Journal* 5, 355.
- Du, J., Chen, G.G., Vlantis, A.C., Chan, P.K.S., Tsang, R.K.Y., van Hasselt, C.A., 2004. Resistance to apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression. *Cancer Letters* 205, 81-88.
- Duensing, S., Lee, L.Y., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S.-o., Gonzalez, S., Crum, C.P., Münger, K., 2000. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 10002-10007.
- Duensing, S., Münger, K., 2002. The Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncoproteins Independently Induce Numerical and Structural Chromosome Instability. *Cancer Research* 62, 7075-7082.
- Dufourcq, P., Leroux, L., Ezan, J., Descamps, B., Lamazière, J.-M.D., Costet, P., Basoni, C., Moreau, C., Deutsch, U., Couffignal, T., Dupláa, C., 2008. Regulation of Endothelial Cell Cytoskeletal Reorganization by a Secreted Frizzled-Related Protein-1 and Frizzled 4- and Frizzled 7-Dependent Pathway: Role in Neovessel Formation. *The American Journal of Pathology* 172, 37-49.
- Dyson, N., 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes & Development* 12, 2245-2262.

- Dyson, N., Guida, P., McCall, C., Harlow, E., 1992a. Adenovirus E1A makes two distinct contacts with the retinoblastoma protein. *Journal of Virology* 66, 4606-4611.
- Dyson, N., Guida, P., Münger, K., Harlow, E., 1992b. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *Journal of Virology* 66, 6893-6902.
- Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K., Harlow, E.D., 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934-937.
- Eferl, R., Wagner, E.F., 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 3, 859-868.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., Izaurralde, E., 2007. P-Body Formation Is a Consequence, Not the Cause, of RNA-Mediated Gene Silencing. *Molecular and Cellular Biology* 27, 3970-3981.
- Evans, M.F., Adamson, C.S.-C., Schned, L.M., John, T.L.S., Leiman, G., Ashikaga, T., Cooper, K., 2010. HPV is detectable in virtually all abnormal cervical cytology samples after reinvestigation of HPV negatives with multiple alternative PCR tests. *Diagnostic Molecular Pathology* 19, 144-150.
- Fang J, Zhang M, Q., L., 2011. Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with tumor cell proliferation and invasion in cervical cancer. *The American Journal of the Medical Sciences* 342, 198-204.
- Frazer, I.H., 2004. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature Reviews Immunology* 4, 46-55.
- Fujita, S., Ito, T., Mizutani, T., Minoguchi, S., Yamamichi, N., Sakurai, K., Iba, H., 2008. miR-21 Gene Expression Triggered by AP-1 Is Sustained through a Double-Negative Feedback Mechanism. *Journal of Molecular Biology* 378, 492-504.
- Funk, J.O., Waga, S., Harry, J.B., Espling, E., Stillman, B., Galloway, D.A., 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes & Development* 11, 2090-2100.
- Gaffney, D.K., Haslam, D., Tsodikov, A., Hammond, E., Seaman, J., Holden, J., Lee, R.J., Zempolich, K., Dodson, M., 2003. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 56, 922-928.
- GLOBOCAN, 2012. <http://globocan.iarc.fr/>.
- Gocze, K., Gombos, K., Kovacs, K., Juhasz, K., Gocze, P., Kiss, I., 2015. MicroRNA Expressions in HPV-induced Cervical Dysplasia and Cancer. *Anticancer Research* 35, 523-530.
- Gómez-Gómez, Y., Organista-Nava, J., Gariglio, P., 2013. Deregulation of the miRNAs Expression in Cervical Cancer: Human Papillomavirus Implications. *BioMed Research International* 2013, 15 pages. doi:10.1155/2013/407052.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., Shiekhattar, R., 2005. Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell* 123, 631-640.
- Gregory, R.I., Yan, K.-p., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., Shiekhattar, R., 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235-240.
- Guo, R.-X., Wei, L.-H., Tu, Z., Sun, P.-M., Wang, J.-L., Zhao, D., Li, X.-P., Tang, J.-M., 2006. 17 β -Estradiol activates PI3K/Akt signaling pathway by estrogen receptor (ER)-dependent and ER-independent mechanisms in endometrial cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 99, 9-18.
- Hagensee, M.E., Yaegashi, N., Galloway, D.A., 1993. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *Journal of Virology* 67, 315-322.

- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., Kim, V.N., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development* 18, 3016-3027.
- Hausen, H.Z., 2006. *Infections causing human cancer*. John Wiley [distributor], Weinheim Chichester.
- Hebner, C.M., Laimins, L.A., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, 83-97.
- How, C., Hui, A., Boutros, P., Clarke, B., Pintilie, M., Fyles, A., Liu, F.-F., microRNA-196b regulates HOXB7 in cervical cancer [abstract]. In: *Proceedings of the 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*; 2012 Mar 31-Apr 4; Chicago, IL. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 2012;72(8 Suppl):Abstract nr 2311. doi:1538-7445.AM2012-2311.
- How, C., Hui, A.B., Fyles, A.W., Liu, F.-F., The role of microRNA-196b in cervical cancer, In: *Proceedings of the 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*: 2010 Apr 17-21, Washington, DC. Philadelphia (PA):AACR; 2010. Abstract (2059).
- Huang, S.-M., McCance, D., 2002. Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. *Journal of Virology* 76, 8710-8721.
- Huh, K.-W., DeMasi, J., Ogawa, H., Nakatani, Y., Howley, P.M., Münger, K., 2005. Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11492-11497.
- Hwang, S.G., Lee, D., Kim, J., Seo, T., Choe, J., 2002. Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *Journal of Biological Chemistry* 277, 2923-2930.
- International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2007. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16 573 women with cervical cancer and 35 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *The Lancet* 370, 1609-1621.
- Jeon, S., Lambert, P.F., 1995. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 1654-1658.
- Jeong, Y., Noh, E., Lee, Y., Yu, H., Jang, K., Lee, S., Kim, J., Kim, J., 2010. 17beta-estradiol induces up-regulation of PTEN and PPARgamma in leiomyoma cells, but not in normal cells. *International Journal of Oncology* 36, 921-927.
- Kakehashi, A., Tago, Y., Yoshida, M., Sokuza, Y., Wei, M., Fukushima, S., Wanibuchi, H., 2012. Hormonally Active Doses of Isoflavone Aglycones Promote Mammary and Endometrial Carcinogenesis and Alter the Molecular Tumor Environment in Donryu Rats. *Toxicological Sciences* 126, 39-51.
- Kent, O.A., Mendell, J.T., 2006. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 25, 6188-6196.
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 12180-12184.
- Kottakis, F., Polytaichou, C., Foltopoulou, P., Sanidas, I., Kampranis, Sotirios C., Tsiachlis, Philip N., 2011. FGF-2 Regulates Cell Proliferation, Migration, and Angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 Pathway. *Molecular Cell* 43, 285-298.
- Lambert, P.F., Griep, A.E., 2007. In vivo models for the study of animal and human papillomaviruses, *The Papillomaviruses*. Springer, pp. 253-275.

- Lee, J.-W., Choi, C.H., Choi, J.-J., Park, Y.-A., Kim, S.-J., Hwang, S.Y., Kim, W.Y., Kim, T.-J., Lee, J.-H., Kim, B.-G., Bae, D.-S., 2008. Altered MicroRNA Expression in Cervical Carcinomas. *Clinical Cancer Research* 14, 2535-2542.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* 23, 4051-4060.
- Leslie, N.R., Downes, C.P., 2002. PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cellular Signalling* 14, 285-295.
- Li, J., Smyth, P., Flavin, R., Cahill, S., Denning, K., Aherne, S., Guenther, S., O'Leary, J., Sheils, O., 2007. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnology* 7, 36.
- Li, Y., Wang, F., Xu, J., Ye, F., Shen, Y., Zhou, J., Lu, W., Wan, X., Ma, D., Xie, X., 2011. Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29. *The Journal of Pathology* 224, 484-495.
- Lin, S., Gregory, R.I., 2015. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer* 15, 321-333.
- Liu, B., Peng, X.C., Zheng, X.L., Wang, J., Qin, Y.W., 2009. MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Lung Cancer* 66, 169-175.
- Liu, L., Wang, Y.L., Wang, J.F., 2011. Differential expression of miR-21, miR-126, miR-143, miR-373 in normal cervical tissue, cervical cancer tissue and Hela cell]. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban; Journal of Sichuan University. Medical science edition* 43, 536.
- Liu, L., Yu, X., Guo, X., Tian, Z., Su, M., Long, Y., Huang, C., Zhou, F., Liu, M., Wu, X., 2012. miR-143 is downregulated in cervical cancer and promotes apoptosis and inhibits tumor formation by targeting Bcl-2. *Molecular Medicine Reports* 5, 753-760.
- Lizano-Soberón, M., Carrillo-García, A., Contreras-Paredes, A., 2009. Infección por virus del papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Cancerología* 4, 205-216.
- Lui, W.-O., Pourmand, N., Patterson, B.K., Fire, A., 2007. Patterns of Known and Novel Small RNAs in Human Cervical Cancer. *Cancer Research* 67, 6031-6043.
- Lüscher-Firzlaff, J.M., Westendorf, J.M., Zwicker, J., Burkhardt, H., Henriksson, M., MuÈller, R., Pirolet, F., LuÈscher, B., 1999. Interaction of the fork head domain transcription factor MPP2 with the human papilloma virus 16 E7 protein: enhancement of transformation and transactivation. *Oncogene* 18, 5620-5630.
- Manavi, M., Hudelist, G., Fink-Retter, A., Gschwandtler-Kaulich, D., Pischinger, K., Czerwenka, K., 2007. Gene profiling in Pap-cell smears of high-risk human papillomavirus-positive squamous cervical carcinoma. *Gynecologic Oncology* 105, 418-426.
- Marino, M., Acconcia, F., Trentalancia, A., 2003. Biphasic Estradiol-induced AKT Phosphorylation Is Modulated by PTEN via MAP Kinase in HepG2 Cells. *Molecular Biology of the Cell* 14, 2583-2591.
- Martinez, I., Gardiner, A.S., Board, K.F., Monzon, F.A., Edwards, R.P., Khan, S.A., 2008. Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene* 27, 2575-2582.
- Massimi, P., Pim, D., Banks, L., 1997. Human papillomavirus type 16 E7 binds to the conserved carboxy-terminal region of the TATA box binding protein and this contributes to E7 transforming activity. *Journal of General Virology* 78, 2607-2613.
- Mattie, M.D., Benz, C., Bowers, C.J., Sensinger, K., Wong, L., Scott, G.K., Fedele, V., Ginzinger, D., Getts, R., Haqq, C., 2006. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel

- biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Molecular Cancer* 5, 4850–4861
- Maufort, J.P., Shai, A., Pitot, H.C., Lambert, P.F., 2010. A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer Research* 70, 2924-2931.
- McBee, W.C., Gardiner, A.S., Edwards, R.P., Lesnock, J.L., Bhargava, R., 2011. MicroRNA Analysis in Human Papillomavirus (HPV)-Associated Cervical Neoplasia and Cancer. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis* 1, 1-9. doi:10.4172/2157-2518.1000114.
- McFarlane-Anderson, N., Bazuaye, P.E., Jackson, M.D., Smikle, M., Fletcher, H.M., 2008. Cervical dysplasia and cancer and the use of hormonal contraceptives in Jamaican women. *BMC Women's Health* 8, 1-6.
- McIntyre, M.C., Frattini, M.G., Grossman, S.R., Laimins, L.A., 1993. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *Journal of Virology* 67, 3142-3150.
- 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, 2130-2135.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Huh, K.-W., Münger, K., 2008. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. *Journal of Virology* 82, 8695-8705.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Münger, K., 2009. The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein. *Virology* 384, 335-344.
- Melar-New, M., Laimins, L.A., 2010. Human Papillomaviruses Modulate Expression of MicroRNA 203 upon Epithelial Differentiation to Control Levels of p63 Proteins. *Journal of Virology* 84, 5212-5221.
- Menges, C.W., Baglia, L.A., Lapoint, R., McCance, D.J., 2006. Human Papillomavirus Type 16 E7 Up-regulates AKT Activity through the Retinoblastoma Protein. *Cancer Research* 66, 5555-5559.
- Middleton, K., Peh, W., Southern, S., Griffin, H., Sotlar, K., Nakahara, T., El-Sherif, A., Morris, L., Seth, R., Hibma, M., Jenkins, D., Lambert, P., Coleman, N., Doorbar, J., 2003. Organization of Human Papillomavirus Productive Cycle during Neoplastic Progression Provides a Basis for Selection of Diagnostic Markers. *Journal of Virology* 77, 10186-10201.
- Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Piret, J.P., Barbieux, A., Raes, M., Michiels, C., 2001. c-JUN Gene Induction and AP-1 Activity Is Regulated by a JNK-Dependent Pathway in Hypoxic HepG2 Cells. *Experimental Cell Research* 265, 114-124.
- Miñano, A., Xifró, X., Pérez, V., Barneda-Zahonero, B., Saura, C.A., Rodríguez-Alvarez, J., 2008. Estradiol facilitates neurite maintenance by a Src/Ras/ERK signalling pathway. *Molecular and Cellular Neuroscience* 39, 143-151.
- Miska, E.A., 2005. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Current Opinion in Genetics & Development* 15, 563-568.
- Moody, C.A., Laimins, L.A., 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer* 10, 550-560.
- Moreno, V., Bosch, F.X., Muñoz, N., Meijer, C.J., Shah, K.V., Walboomers, J.M., Herrero, R., Franceschi, S., Group, I.A.f.R.o.C.M.C.C.S., 2002. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *The Lancet* 359, 1085-1092.
- Morin, G., Fradet-Turcotte, A., Di Lello, P., Bergeron-Labrecque, F., Omichinski, J.G., Archambault, J., 2011. A Conserved Amphipathic Helix in the N-Terminal Regulatory Region of the Papillomavirus E1 Helicase Is Required for Efficient Viral DNA Replication. *Journal of Virology* 85, 5287-5300.

- Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K.M., Hayakawa, H., Nguyen, C.L., Owens, M., Grace, M., Huh, K., 2004. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *Journal of Virology* 78, 11451-11460.
- Münger, K., Werness, B.A., Dyson, N., Phelps, W.C., Harlow, E., Howley, P.M., 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *The EMBO Journal* 8, 4099-4105.
- Muñoz, N., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., Snijders, P.J.F., Meijer, C.J.L.M., 2003. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine* 348, 518-527.
- Myklebust, M.P., Bruland, O., Fluge, O., Skarstein, A., Balteskard, L., Dahl, O., 2011. MicroRNA-15b is induced with E2F-controlled genes in HPV-related cancer. *British Journal of Cancer* 105, 1719-1725.
- Nguyen, C.L., Eichwald, C., Nibert, M.L., Münger, K., 2007. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component γ -tubulin. *Journal of Virology* 81, 13533-13543.
- Nguyen, C.L., McLaughlin-Drubin, M.E., Münger, K., 2008. Delocalization of the microtubule motor Dynein from mitotic spindles by the human papillomavirus E7 oncoprotein is not sufficient for induction of multipolar mitoses. *Cancer Research* 68, 8715-8722.
- Nguyen, C.L., Münger, K., 2009. Human papillomavirus E7 protein deregulates mitosis via an association with nuclear mitotic apparatus protein 1. *Journal of Virology* 83, 1700-1707.
- Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S.A., 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* 1, 1559-1582.
- Ofir, M., Hacohen, D., Ginsberg, D., 2011. miR-15 and miR-16 are direct transcriptional targets of E2F1 that limit E2F-induced proliferation by targeting cyclin E. *Molecular Cancer Research* 9, 440-447.
- Park, J.-S., Kim, E.-J., Kwon, H.-J., Hwang, E.-S., Namkoong, S.-E., Um, S.-J., 2000. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 275, 6764-6769.
- Pereira, P.M., Marques, J.P., Soares, A.R., Carreto, L., Santos, M.A.S., 2010. MicroRNA Expression Variability in Human Cervical Tissues. *PLoS One* 5, e11780.
- Perillo, B., Sasso, A., Abbondanza, C., Palumbo, G., 2000. 17 β -Estradiol Inhibits Apoptosis in MCF-7 Cells, Inducing bcl-2 Expression via Two Estrogen-Responsive Elements Present in the Coding Sequence. *Molecular and Cellular Biology* 20, 2890-2901.
- Pett, M.R., Alazawi, W.O., Roberts, I., Downen, S., Smith, D.I., Stanley, M.A., Coleman, N., 2004a. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer research* 64, 1359-1368.
- Pett, M.R., Alazawi, W.O.F., Roberts, I., Downen, S., Smith, D.I., Stanley, M.A., Coleman, N., 2004b. Acquisition of High-Level Chromosomal Instability Is Associated with Integration of Human Papillomavirus Type 16 in Cervical Keratinocytes. *Cancer Research* 64, 1359-1368.
- Pillai, M.R., Halabi, S., McKalip, A., Jayaprakash, P.G., Rajalekshmi, T.N., Nair, M.K., Herman, B., 1996. The presence of human papillomavirus-16/-18 E6, p53, and Bcl-2 protein in cervicovaginal smears from patients with invasive cervical cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 5, 329-335.
- Qin, X., Yan, L., Zhao, X., Li, C., Fu, Y., 2012. microRNA-21 overexpression contributes to cell proliferation by targeting PTEN in endometrioid endometrial cancer. *Oncology Letter* 4, 1290-1296.

- Reimers, L.L., Anderson, W.F., Rosenberg, P.S., Henson, D.E., Castle, P.E., 2009. Etiologic heterogeneity for cervical carcinoma by histopathologic type, using comparative age-period-cohort models. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 18, 792-800.
- Riley, R.R., Duensing, S., Brake, T., Münger, K., Lambert, P.F., Arbeit, J.M., 2003. Dissection of Human Papillomavirus E6 and E7 Function in Transgenic Mouse Models of Cervical Carcinogenesis. *Cancer Research* 63, 4862-4871.
- Schwartz, Y.B., Pirrotta, V., 2007. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nature Reviews Genetics* 8, 9-22.
- Spitkovsky, D., Hehner, S.P., Hofmann, T.G., Möller, A., Schmitz, M.L., 2002. The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF- κ B activation by targeting the I κ B kinase complex. *Journal of Biological Chemistry* 277, 25576-25582.
- Tasaki, T., Mulder, L.C., Iwamatsu, A., Lee, M.J., Davydov, I.V., Varshavsky, A., Muesing, M., Kwon, Y.T., 2005. A family of mammalian E3 ubiquitin ligases that contain the UBR box motif and recognize N-degrons. *Molecular and Cellular Biology* 25, 7120-7136.
- The International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2007. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: Collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *International Journal of Cancer* 120, 885-891.
- Thompson, D.A., Zacny, V., Belinsky, G.S., Classon, M., Jones, D.L., Schlegel, R., Munger, K., 2001. The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor α -mediated apoptosis in normal human fibroblasts. *Oncogene* 20, 3629.
- Tommasino, M., Adamczewski, J., Carlotti, F., Barth, C., Manetti, R., Contorni, M., Cavalieri, F., Hunt, T., Crawford, L., 1993. HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene* 8, 195-202.
- Vázquez-Ulloa, E., Lizano, M., Avilés-Salas, A., Alfaro-Moreno, E., Contreras-Paredes, A., 2011. Abnormal distribution of hDlg and PTEN in premalignant lesions and invasive cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 122, 663-668.
- Vessey, M., Painter, R., 2006. Oral contraceptive use and cancer. Findings in a large cohort study, 1968–2004. *British Journal of Cancer* 95, 385-389.
- Wan, H., Yuan, M., Simpson, C., Allen, K., Gavins, F.N.E., Ikram, M.S., Basu, S., Baksh, N., O'Toole, E.A., Hart, I.R., 2007. Stem/Progenitor Cell-Like Properties of Desmoglein 3dim Cells in Primary and Immortalized Keratinocyte Lines. *Stem Cells* 25, 1286-1297.
- Wang, X., Tang, S., Le, S.-Y., Lu, R., Rader, J.S., Meyers, C., Zheng, Z.-M., 2008. Aberrant Expression of Oncogenic and Tumor-Suppressive MicroRNAs in Cervical Cancer Is Required for Cancer Cell Growth. *PLoS One* 3, e2557.
- Wang, X., Wang, H.-K., McCoy, J.P., Banerjee, N.S., Rader, J.S., Broker, T.R., Meyers, C., Chow, L.T., Zheng, Z.-M., 2009. Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6. *RNA* 15, 637-647.
- Xu, J., Zhang, W., Lv, Q., Zhu, D., 2015. Overexpression of miR-21 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells via the inhibition of PTEN. *Oncology Reports* 33, 3108-3116.
- Yao, Q., Xu, H., Zhang, Q.-Q., Zhou, H., Qu, L.-H., 2009. MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) in HeLa cervical carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388, 539-542.
- Yao, T., Lin, Z., 2012. MiR-21 is involved in cervical squamous cell tumorigenesis and regulates CCL20. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822, 248-260.
- Yi, R., Poy, M.N., Stoffel, M., Fuchs, E., 2008. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature* 452, 225-229.

- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development* 17, 3011-3016.
- Yu, J., Wang, Y., Dong, R., Huang, X., Ding, S., Qiu, H., 2012a. Circulating microRNA-218 was reduced in cervical cancer and correlated with tumor invasion. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 138, 671–674.
- Yu, X., Zhang, X., Dhakal, I.B., Beggs, M., Kadlubar, S., Luo, D., 2012b. Induction of cell proliferation and survival genes by estradiol-repressed microRNAs in breast cancer cells. *BMC cancer* 12, 29.
- Yuan, H., Ito, S., Senga, T., Hyodo, T., Kiyono, T., Kikkawa, F., Hamaguchi, M., 2009. Human papillomavirus type 16 oncoprotein E7 suppresses cadherin-mediated cell adhesion via ERK and AP-1 signaling. *International Journal of Oncology* 35, 309-314.
- Zaldívar Lelo de Larrea, G., Martín Molina, F., Sosa Ferreyra, C.F., Ávila Morales, J., Lloret Rivas, M., Román Lara, M., Vega Malagón, G., 2012. Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología* 77, 315-321.
- Zhang, S., Liu, F., Mao, X., Huang, J., Yang, J., Yin, X., Wu, L., Zheng, L., Wang, Q., 2015. Elevation of miR-27b by HPV16 E7 inhibits PPAR γ expression and promotes proliferation and invasion in cervical carcinoma cells. *International Journal of Oncology* 47, 1759-1766.
- Zhang, X., Liu, S., Hu, T., Liu, S., He, Y., Sun, S., 2009. Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression. *Hepatology* 50, 490-499.
- Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S., Mo, Y.-Y., 2008. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Research* 18, 350-359.