



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

**LA ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH-16 Y LOS ESTROGENOS
INCREMENTAN LA EXPRESION DE OCT3/4 Y DE GENES
RELACIONADOS CON LA TRONCALIDAD CELULAR**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
M. en C. B. JORGE ORGANISTA NAVA

DIRECTOR DE TESIS
DR. PATRICIO GARIGLIO
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

COMITÉ TUTOR
DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. MARCELA LIZANO SOBERON
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO DE 2017



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. Luis Vaca Dominguez

Secretario:

Dr. Patricio Gariglio

Vocal:

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

Vocal:

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Vocal:

Dra. Vilma Maldonado Lagunas

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 12294. 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

Mi esposa Yazmín, porque no pude tener mejor compañera mejor que tú, pues eres una mujer verdaderamente excepcional. Por ser mi apoyo incondicional, por ser mi amiga, mi cómplice y la madre de mis hijos y por todo lo que has soportado a mi lado sin quejarte. Después de todos estos años te amo más que al principio.

Mis hijos Elliot Caleb y Derek Itzaé, a quienes siempre cuidaré para verlos hechos personas capaces y que puedan valerse por sí mismos. Y recuerden que lo importante no es cuantas veces hayan caído, sino cuantas veces se hayan levantado. Los amo!

Mi madre y Jose por han sido personas importantes en muchas de las etapas de mi vida, por su apoyo incondicional durante todo este tiempo. Muchas Gracias!!

Mis hermanas, Norma y Monzerrat, por estar conmigo y apoyarme siempre, las quiero mucho!

Abuelos Celestino (Chetino, QEPE) y Trinidad (Ine), quienes fueron personas que se preocupaban por mí. Porque me enseñaron muchas cosas vitales para la vida, y me encaminaron por el buen sendero. Mil Gracias!

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutor, Dr. Patricio Gariglio Vidal, Dr. Alejandro García Carranca y Dra. Marcela Lizano Soberón, por todos sus consejos y apoyo incondicional. Gracias.

A los miembros del jurado de examen de grado, Dr. Luis Vaca Dominguez, Dr. Patricio Gariglio, Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, Dra. Leticia Rocha Zavaleta, Dra. Vilma Maldonado Lagunas 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.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), que me permitió realizar mis estudios de Doctorado.

Al Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez y la Dra. Berenice Illades Aguiar, por todo el gran apoyo que me han brindado. Muchas Gracias.

A Sara Méndez Ibáñez del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por todo el apoyo brindado en este tiempo. Mil gracias!

Y a todas aquellas personas que en una u otra manera me apoyaron en la realización de este trabajo.

ÍNDICE DE CUADRO Y FIGURAS

Cuadro 1. Secuencias de los oligonucleótidos usados en este trabajo	31
Figure 1. Organización del genoma de los VPHs	3
Figura 2. Mecanismo de infección del Virus del Papiloma Humano (VPH)	5
Figura 3. Estructura de la oncoproteína E7	7
Figura 4. Papel de la proteína E7 en la alteración del ciclo celular	8
Figura 5. La oncoproteína E7 afecta numeroso procesos celulares a través de interacciones con múltiples proteínas celulares	10
Figura 6. Modelo de reprogramación epigenética por la oncoproteína E7	12
Figura 7. Esquema de como la oncoprotein E7 de los VPHs inactiva la función de IRF-1	13
Figura 8. Vía de señalización del estrógeno.....	14
Figura 9. Características claves en la regulación de la pluripotencia	18
Figura 10. Oct3/4-Sox2-Nanog forman un circuito de redes que regulan la maquinaria de las células troncales	20
Figura 11. Expresión de PCNA, p63, CK17 y E7 en tejido cervical del ratón transgénico K14E7 VPH16.....	36
Figura 12. Niveles de expresión del mRNA y proteína de Oct3/4 en tejido cervical de ratones transgénicos K14E7 de 7 meses de edad tratados con E2	38
Figura 13. Niveles de expresión de la proteína de Sox2, Nanog y Fgf4 en tejido cervical de ratones transgénicos K14E7 de 7 meses de edad tratados con E2... ..	40
Figura 14. La oncoproteína E7 del PHV16 incrementa los niveles del mRNA y proteína de Oct3/4 en queratinocitos normales humanos	42
Figura 15. Expresión de Sox2, Nanog y Fgf4 en células que expresan la oncoproteína E7.....	44
Figura 16. Las células que expresan la oncoproteína E7 del VPH16 presentaron mayor capacidad de auto-renovación	45
Figura 17. La oncoproteína E7 del VPH16 induce un aumento de la expresión de Oct3/4, Sox2, Nanog y Fgf4 en esferas	47
Figura 18. Modelo del posible rool de la oncoproteína E7 del VPH16 en la auto-renovación celular	51

CONTENIDO

I.	ABREVIACIONES	I
II.	RESUMEN	III
III.	INTRODUCCIÓN	1
3.1.	CANCER CERVICAL.....	1
3.2.	CANCER CERVICAL Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	1
3.3.	CARACTERISTICAS DE LOS VPHs	2
3.3.1.	CARACTERÍSTICAS DE LA ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH	6
3.3.2.	FUNCIONES LA ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH DE ALTO RIESGO.....	7
3.4.	ESTROGENOS Y RIESGO DE CANCER CERVICAL	14
3.5.	PAPEL DE LOS ESTRÓGENO Y ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH DE ALTO RIEGO EN EL DESARROLLO DE CÁNCER CERVICAL.....	15
3.6.	CÉLULAS TRONCALES.....	16
3.6.1.	REGULACIÓN DE LA PLURIPOTENCIA Y DIFERENCIACIÓN CELULAR	17
3.6.2.	LOS FACTORES DE TRANSCRPCION OCT3/4, SOX2 Y NANOG REGULADORES DEL ESTADO PLURIPOTENTE DE LA CÉLULA TRONCAL.....	18
3.6.3.	INTERACCIÓN ENTRE FACTORES DE LOS TRANSCRIPCIÓN OCT3/4, SOX2 Y NANOG PARA NANTENER LA TRONCALIDAD CELULAR	19
3.7.	CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS Y CANCER CERVICAL	20
3.8.	DESREGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE OCT3/4, SOX2, NANOG EN CANCER CERVICAL.....	22
3.8.1.	<i>Oct3/4</i>	22
3.8.2.	<i>Sox2</i>	23
3.8.3.	<i>Nanog</i>	24
3.9.	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE OCT3/4, SOX2, NANOG Y FGF4 POR LOS ESTRÓGENOS.....	24
IV.	JUSTIFICACIÓN	25
V.	OBJETIVOS	26
VI.	DIAGRAMA DE TRABAJO	27
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
7.1.	LÍNEAS CELULARES.....	28
7.2.	CULTIVO DE TUMOR-ESFERAS	29
7.3.	RATONES TRANSGÉNICOS.....	29
7.4.	TRATAMIENTO HORMONAL	30
7.5.	SACRIFICIO DE RATONES Y DISECCIÓN DEL TEJIDO CERVICAL	30
7.6.	EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	30

7.7.	CUANTIFICACION DEL mRNA USANDO PCR TIEMPO REAL CUANTITATIVA (RT-qPCR)	31
7.8.	INMUNOHISTOQUÍMICA-INMUNOFLUORESCENCIA	32
7.9.	CAPTURA, ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LAS IMÁGENES	33
7.10.	WESTERN BLOT	33
7.11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
VIII.	RESULTADOS	35
8.1.	LA ONCOPROTEÍNA E7 AFECTA LA EXPRESIÓN DE PCNA, P63 Y CK17 EN TEJIDO CERVICAL DEL RATÓN TRANSGÉNICO K14E7.....	35
8.2.	LA ONCOPROTEÍNA E7 Y EL 17β-ESTRADIOL INDUCEN LA EXPRESION DE Oct3/4 EN EPITELIO CERVICAL DEL RATÓN TRANSGÉNICO K14E7	35
8.3.	AUMENTO EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA TRONCALIDAD CELULAR SON OBSERVADOS EN EPITELIO ESCAMOSO CERVICAL DEL RATÓN K14E7	40
8.4.	LA ONCOPROTEINA E7 TAMBIEN INCREMENTA LOS NIVELES DE OCT3/4 EN QUERATINOCITOS PRIMARIOS HUMANOS Y EN CELULAS SAOS-2.....	41
8.5.	INCREMENTO EN LOS NIVELES DE EXPRESION DE SOX2, NANOG Y FGF4 SON OBSERVADOS EN CÉLULAS QUE EXPRESAN LA ONCOPROTEINA E7	43
8.6.	PHK Y CÉLULAS SAOS-2, QUE EXPRESAN LA ONCOPROTEÍNA E7 PRESENTAN UNA MAYOR CAPACIDAD DE AUTO-RENOVACIÓN CELULAR	46
8.7.	LAS ESFERAS QUE EXPRESAN LA ONCOPROTEÍNA E7 PRESENTAN ALTOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL mRNA DE OCT3/4, SOX2, NANOG Y FGF4	46
IX.	DISCUSIÓN	48
X.	REFERENCIAS	53
XI.	ANEXOS	63

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 :	17 β -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
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

II. RESUMEN

Oct3/4 es un factor de transcripción que se encuentra involucrado en mantener la pluripotencia y auto-renovación de las células madre; también se ha observado que este factor puede actuar como un oncogén. La oncoproteína E7 del VPH-16 y los estrógenos (E₂) tales como el 17β-estradiol son factores importantes en el desarrollo de lesiones premalignas y cáncer cervical. La oncoproteína E7 del VPH-16 induce crecimiento y bloqueo de la diferenciación celular, a través de la degradación de la proteína supresora de tumor pRb, lo cual contribuye en la carcinogénesis cervical *in vivo*. Además se ha observado que Oct3/4, la oncoproteína E7 y los E₂ estimulan la expresión de muchos genes a nivel de proteína. En este trabajo se investigó el efecto de la oncoproteína E7 del VPH-16 y del 17β-estradiol sobre el patrón de expresión de Oct3/4 y genes relacionados con la troncalidad celular (Sox2, Nanog y Fgf4). Así mismo se determinó si la oncoproteína E7 está asociada con la auto-renovación celular. Fue observado que la oncoproteína E7 del VPH-16 está involucrada en el bloqueo de la diferenciación celular, en parte debido a que esta oncoproteína incrementa la expresión de p63 y Ck17 (marcadores de indiferenciación) en cáncer cervical (CC). Por otro lado encontramos que tanto la expresión del mRNA como de la proteína de Oct3/4 y genes relacionados con la troncalidad celular (Sox2, Nanog y Fgf4) son aumentados por la oncoproteína E7 del VPH-16 *in vivo* e *in vitro* y el tratamiento con E₂ también está implicado en la desregulación de estos importantes factores *in vivo*. Además en este estudio se demostramos que la oncoproteína E7 del VPH-16 está involucrada en la auto-renovación de las células madre cancerosas. Estos resultados sugieren que la oncoproteína E7 del VPH-16 incrementa la expresión de Oct3/4, Sox2, Nanog y Fgf4 para mantener la capacidad de auto-renovación de la células madre cancerosas.

ABSTRACT

Oct3/4 is a key regulatory factor that maintains the pluripotency and self-renewing capacity that are hallmarks of embryonic stem cells (ESCs); there is emerging evidence that it can function as oncogene. The HPV16 E7 oncoprotein and 17 β -estradiol are key factors for the development of premalignant lesions and cervical cancer. This viral oncoprotein induces cell growth and blocks cellular differentiation in part through degradation of the pRb tumor suppressor protein, contributing to carcinogenesis *in vivo*. Furthermore, Oct3/4, the E7 oncoprotein and estrogen (E₂) stimulate the expression of many genes at the protein level. In the present study, we aimed to investigate the effect of E7 and E₂ on the expression pattern of Oct3/4 and stemness-related genes (Sox2, Nanog and Fgf4). We also determined whether the E7 oncoprotein is associated with the increase of the cell self-renewal. In this study, we observed that the HPV16 E7 oncoprotein is involved in the blocking of cellular differentiation, in part due to p63 and Ck17 upregulation (markers for poorly differentiated epithelial cells) in cervical cancer (CC). This work demonstrate that Oct3/4, Sox2, Nanog and Fgf4 are upregulated by the E7 oncoprotein *in vivo* and *in vitro* and that E₂ treatment is also implicated in the upregulation of these important factors *in vivo*. Furthermore, we demonstrated that the E7 oncoprotein is increases in the cell self-renewal of cancer cells. These results suggest that the HPV16 E7 oncoprotein is involved in the upregulation of Oct3/4, Sox2, Nanog and Fgf4 for maintaining self-renewal of cancer stem cells in cervical cancer.

III. INTRODUCCIÓN

3.1 CANCER CERVICAL

El cáncer cervical (CC) es el tercer tipo de cáncer más común en mujeres en todo el mundo y el segundo tipo de cáncer más frecuente en México (GLOBOCAN, 2012); aproximadamente 500,000 nuevos casos y más de 270, 000 muertes ocurren cada año debido a esta neoplasia (Schiffman et al., 2007). El CC es más prevalente entre mujeres de estado socioeconómico bajo y es un problema de salud pública en países en desarrollo (Ardahan, 2016). Estudios epidemiológicos han identificado varios factores de riesgo asociados con el desarrollo del CC, dentro de los cuales se encuentran estado socioeconómico, múltiples parejas sexuales, uso de anticonceptivos orales por periodos largos, la dieta, tabaquismo, factores genéticos tales como; activación de oncogenes e inhibición de genes supresores de tumor e infecciones virales como por ejemplo la del virus del papiloma humano (VPH) (Husain and Ramakrishnan, 2015).

3.2 CANCER CERVICAL Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El virus del papiloma humano (VPH) es considerado como el agente causal para el desarrollo del CC (Baseman and Koutsky, 2005; Muñoz et al., 2003; Walboomers et al., 1999). La prevalencia del VPH en población abierta varía de manera importante en distintas partes del mundo, desde 1.4 % hasta 25.6 % (Clifford et al., 2005). Estos valores se incrementan en mujeres con alteraciones neoplásicas y cáncer (Baseman and Koutsky, 2005; Velázquez-Márquez et al., 2009). Y ha sido encontrado que más del 90 % de los casos de CC están relacionados con la presencia del VPH (Baseman and Koutsky, 2005; Muñoz et al., 2003).

Los VPHs que son capaces de infectar las mucosas se dividen en genotipos de alto y bajo riesgo, de acuerdo a si su infección puede conducir o no al desarrollo de cáncer (Zaldívar Lelo de Larrea et al., 2012). Se han descrito más de 120 tipos de VPHs y aproximadamente una tercera parte de ellos son capaces de infectar el epitelio del tracto genital (Moody and Laimins, 2010; Stanley et al., 2007). Los VPHs de alto riesgo (VPH-AR) son clasificados como potencialmente oncogénicos, ya que

están asociados con más del 99% de los cánceres del cérvix. Las infecciones genitales por el VPH son transmitidas principalmente por contacto sexual, pero no exclusivamente durante el coito. Mientras la mayoría de las infecciones son transitorias y benignas, la infección genital persistente con VPH-AR puede conducir al desarrollo de lesiones precancerosas y de cáncer (Zaldívar Lelo de Larrea et al., 2012).

El número de HR-HPVs varía entre 13 y 19, pero los tipos VPH-16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56 y 58 conllevan constantemente un alto riesgo (Muñoz et al., 2003; Walboomers et al., 1999). De estos, el VPH-16 se encuentra en aproximadamente el 60% de todos los CC, mientras el VPH-18 está involucrado en un 10-20%; los VPHs tipo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y 73 juntos constituyen el 20-30% restante (Muñoz et al., 2003). A pesar de que la tasa de progresión carcinogénica es relativamente baja, las infecciones con VPH-AR se encuentran en la mayoría de los cánceres cérvicouterinos humanos (Walboomers et al., 1999; Zur Hausen, 2002).

3.3 CARACTERISTICAS DE LOS VPHs

Los VPHs pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, que incluye virus relativamente pequeños, sin envoltura, con un diámetro de 55 nm. Tienen una cápside icosaédrica formada por 360 copias de la proteína L1 y 12 copias de la proteína L2, que se organizan en 72 capsómeros (Modis et al., 2002).

El genoma del VPH es una molécula circular de ADN de doble cadena, de aproximadamente 8,000 pb y ocho o nueve marcos abiertos de lectura (ORF, Open Reading Frame), los cuales son transcritos como ARNm policistrónicos (Doorbar, 2006; Hebner and Laimins, 2006). El genoma se encuentra dividido en tres regiones: una región reguladora no codificante, que abarca cerca del 10 % del genoma y se denomina región larga de control (LCR; long control region); la región de genes de expresión temprana (E; early) y la región de genes de expresión tardía (L;late)(Velázquez-Márquez et al., 2004) (Figura 2).

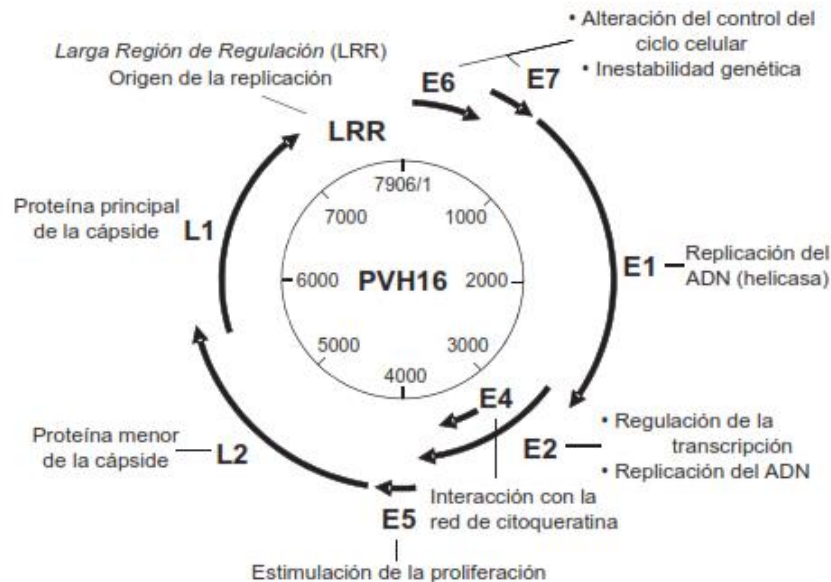


Figure 1. Organización del genoma de los VPHs. El genoma del VPH es una molécula de ADN circular de doble cadena. Se divide en tres regiones: la región larga de control (LCR) que no contiene marco de lectura alguno, pero está involucrada en la regulación de la expresión génica y replicación viral; la región temprana, que contiene los genes E1 a E7 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 (Mendoza et al., 2007).

La región E representa cerca del 50% del genoma viral y codifica las proteínas no estructurales E1, E2, E4, E5, E6 y E7, que se expresan al inicio de la infección y están involucradas en la estimulación de la proliferación celular (E5, E6 y E7) y en la regulación de la replicación viral (E1 y E2) (Ustav and Stenlund, 1991) o en la regulación de la transcripción del genoma viral (E2), así como otra proteína, E4 que se expresa a lo largo de la fase tardía del ciclo viral y que interviene en la fase de la maduración de la partícula viral (Doorbar et al., 1986).; por último, se encuentra la región que contiene los genes de expresión tardía (L), que codifica las proteínas estructurales L1 y L2, las cuales constituyen la cápside viral (Hagensee et al., 1993) Figura 2.

La infección por VPH ocurre a través de micro abrasiones en el epitelio, en particular en la zona de transformación del epitelio cervical, lo que ocasiona la

exposición de las células basales, permitiendo la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1, a nivel de su extremo carboxi terminal (Giroglou et al., 2001). Dicho receptor ha sido asociado estructuralmente con Heparán Sulfato para los tipos virales VHP-16, 31 y 58 (Bousarghin et al., 2003). Una vez unido el virus a la superficie celular, se produce su internalización al citoplasma de la célula huésped, proceso que ha sido identificado como endocitosis (Bousarghin et al., 2003). Posterior a la endocitosis, existe evidencia que la cápside viral experimenta degradación en el citoplasma celular, originando capsómeros y monómeros, los cuales son transportados al núcleo junto al ADN viral, con ello el genoma viral y las proteínas de la cápside participarían en los procesos de transcripción génica, replicación del ADN y maduración de viriones (Merle et al., 1999; Nelson et al., 2002).

Es posible definir una infección viral latente (no productiva), localizada en el estrato basal, en el cual se mantiene la replicación del ADN viral en un número de copias bajo (30-50 copias por célula), en forma extracromosómica, llamados episomas (Del Vecchio et al., 1992; Holmgren et al., 2005; Ruesch et al., 1998). Se postula que durante esta etapa se aseguraría que el ADN viral se distribuya difusamente por las células basales proliferantes y que al mantener un número reducido de copias se impediría la activación de la respuesta inmune (Peh et al., 2002). Por otro lado, es una infección productiva, las células basales proliferantes migran a los estratos parabasal y espinoso, amplificándose la expresión de genes virales tempranos y tardíos, los cuales permiten producir ADN a cientos de copias por célula dando lugar a la producción de partículas infecciosas (Frattini and Laimins, 1994); ésta etapa en el ciclo viral es conocida como la fase proliferante o productiva (Crosbie et al., 2013; Woodman et al., 2007).

En la fase proliferante, los genes tempranos del VPH son expresados a partir de un promotor temprano (PE); se generan las proteínas virales tempranas: E1, E2, E4, E5, E6 y E7 que son proteínas no estructurales, relacionadas con el control de la replicación, la transcripción y la expresión genética del virus. Su expresión está estrechamente regulada tanto por factores celulares específicos de tejido, como por las propias proteínas virales. Mientras tanto, en las capas superiores del epitelio los

genes tardíos se expresan en las células diferenciadas a partir de un promotor tardío (PL) para sintetizar las proteínas estructurales de la cápside viral. L1 y L2 encapsidan los genomas virales para formar viriones, los cuales se liberan de la célula, de esta manera el virus puede iniciar una nueva infección (Crosbie et al., 2013).

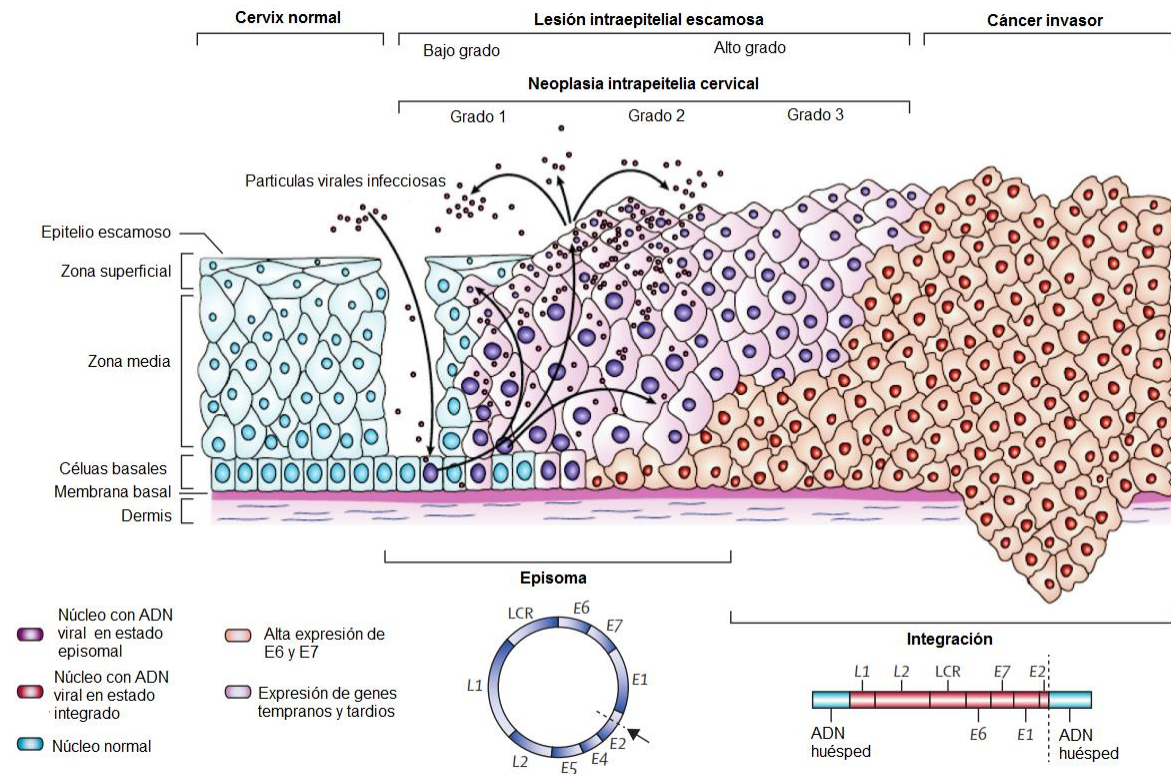


Figura 2. Mecanismo de infección del Virus del Papiloma Humano (VPH). Los VPHs tienen acceso a las células basales del epitelio cervical a través de micro abrasiones. Después de la infección los genes tempranos E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7 son expresados y se replica en ADN viral en su estado episomal. En las láminas superiores del epitelio (Zona media y superficial) el genoma viral es más replicado y los genes tardíos L1, L2 son expresados, así como también E4. Las proteínas L1 y L2 encapsulan al genoma viral para formar nuevos viriones en el núcleo, por lo que estos virus pueden iniciar una nueva infección. En las lesiones intraepiteliales de grado bajo hay una replicación viral productiva. Un número desconocido de infecciones por VPH-AR progresan a neoplasias intraepitelial de alto grado. La progresión de las lesiones no tratadas a cáncer microinvasivo e invasivo es asociado con la integración del ADN viral al genoma de la célula huésped (núcleos rojos), lo cual es asociado con la pérdida de las funciones de E2, y subsecuentemente la alta expresión de los oncogenes E6 y E7. LCR: región larga de control, VPH-AR: virus del papiloma humano de alto riesgo. (Bover et al., 2005; Woodman et al., 2007).

Los Papilomavirus son muy específicos de las especies que infectan y tienen un tropismo muy definido por las células del tejido epitelial estratificado queratinizado. Dependiendo del tipo de VPH que infecte el epitelio, se pueden producir lesiones de bajo grado o alto grado. Las lesiones sin tratar progresan a cáncer invasivo o microinvasivo y está asociado con la integración del genoma del VPH en los cromosomas del huésped, con la pérdida asociada o la interrupción de E2 y la sobre expresión de los oncogenes virales E6 y E7 (Lizano-Soberón et al., 2009).

3.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH

La oncoproteína E7 es un pequeño polipéptido, de aproximadamente 98 aminoácidos (Ghittoni et al., 2009); su secuencia de aminoácidos primaria presenta semejanzas con las proteínas E1A de los adenovirus y el antígeno T-grande del virus SV40. La proteína E7 está dividida en tres regiones conservadas, denotadas de una manera análoga a las E1A de los adenovirus como: CR1, CR2 y CR3 (Phelps et al., 1988). La CR1 está constituida por los residuos 1-15 del extremo aminoterminal. La CR2 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., 1992). Finalmente la CR3 de E7 está constituida por los residuos 39-98 del extremo carboxilo terminal; esta región contiene dos motivos CXXC que están separados por 29 o 30 residuos, 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).

La proteína E7 es estructuralmente dinámica, es decir, sufre transiciones conformacionales que le permiten establecer una serie ordenada de asociaciones con distintas proteínas que participan en diferentes procesos celulares. El extremo N-terminal es el que le confiere plasticidad conformacional a la oncoproteína E7 y el que establece contacto con otras proteínas (Alonso et al., 2002; García-Alai et al., 2007). Estas propiedades de transición y plasticidad de E7 juegan un papel clave

en su capacidad para interferir con procesos celulares y de esa forma iniciar la transformación maligna (Figura 3).

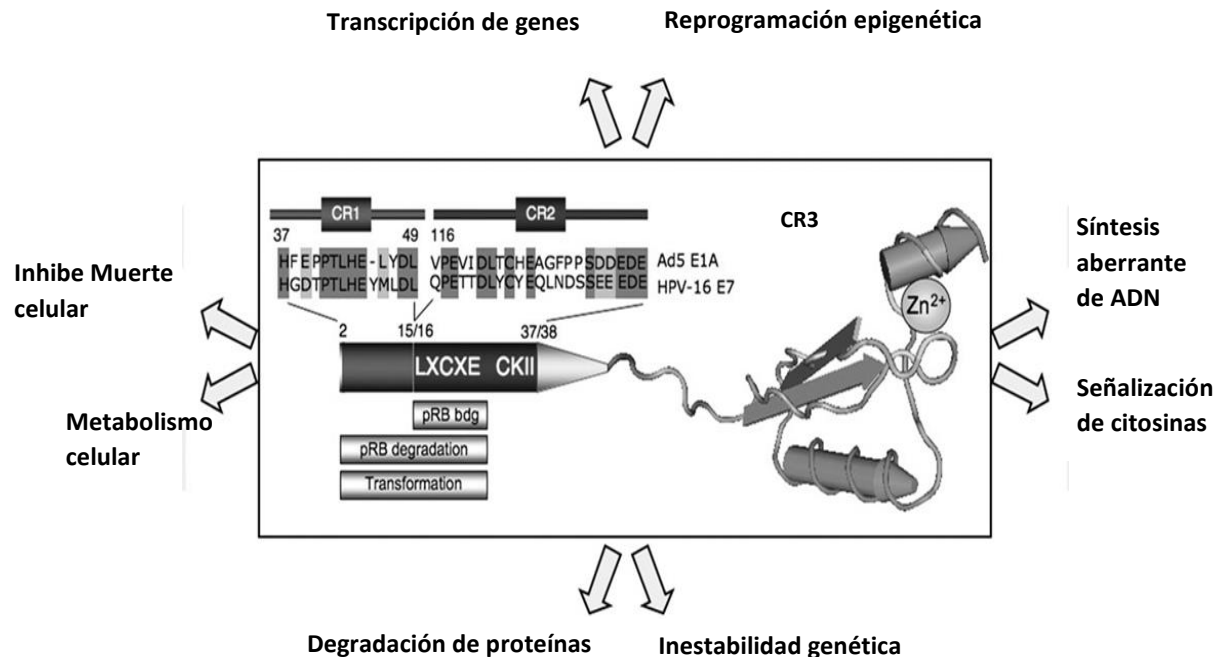


Figura 3. Estructura de la oncoproteína E7. Se muestran los tres dominios conservados (CR1, CR2 y CR3), así como en motivo en dedo de zinc en el dominio CR3 y los principales procesos celulares en los cuales se encuentra involucrada la oncoproteína E7 del VPH-16 (McLaughlin-Drubin and Münger, 2009).

3.3.2 FUNCIONES LA ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH DE ALTO RIESGO

Uno de los procesos que dan origen a la transformación celular es la inhibición del supresor de tumor pRB por la oncoproteína E7 de los VPHs de alto riesgo (Lee et al., 1998). La interacción de E7 con pRB conduce a la disociación del complejo pRB/E2F, y a la degradación subsecuente de pRB, lo que conduce a la activación de E2F, ocasionando que se encienda la transcripción de numerosos genes requeridos por la célula para entrar a la fase S. Entre los genes activados por E2F se encuentran los que codifican las ciclinas A y E y las cinasas dependientes de ciclina (CDK2). Las ciclinas son proteínas que regulan la transición entre distintas fases del ciclo celular debido a su función como factores de activación de cinasas: Figura 4 (Attwooll et al., 2004; Boshoff and Weiss, 2002; Gariglio et al., 2016; Nguyen and Münger, 2008).

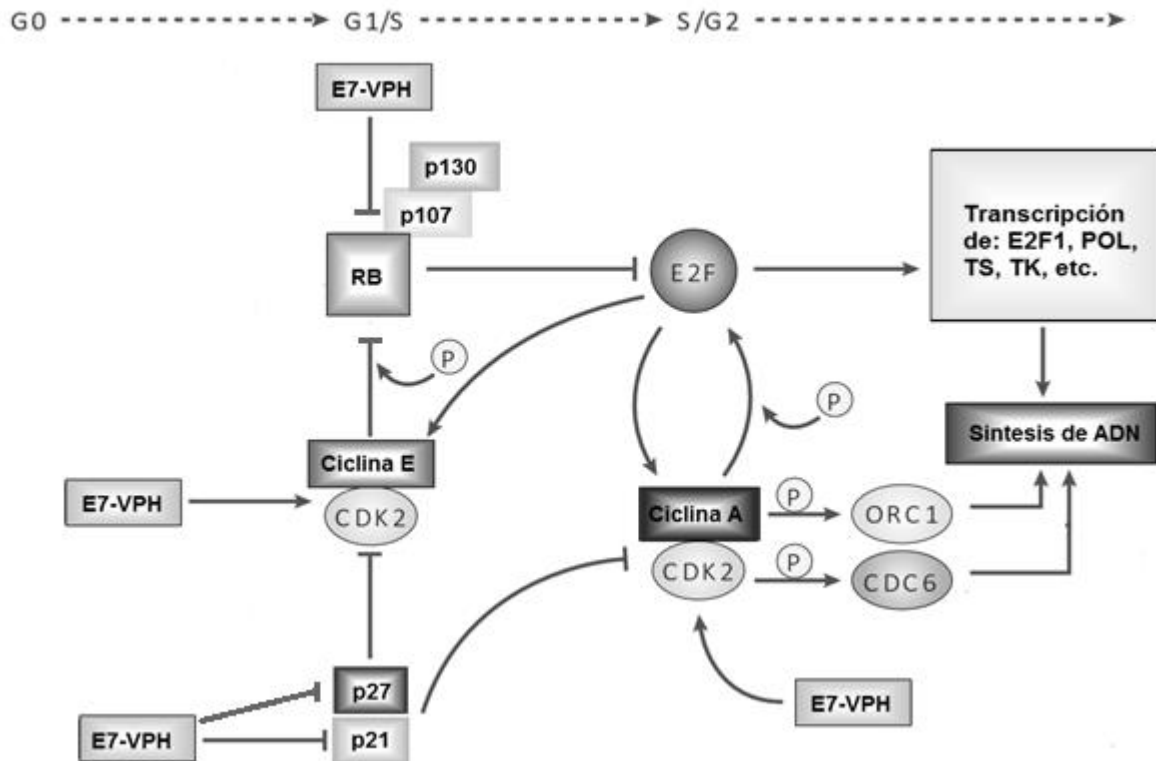


Figura 4. Papel de la proteína E7 en la alteración del ciclo celular. La proteína E7 inhibe la formación de complejos entre pRB y E2F o disocia los complejos pRB/E2F previamente formados. La proteína pRB permanece unida a E7 y es marcada con ubiquitina para ser degradada en el proteasoma. La liberación del factor de transcripción E2F activa la transcripción de genes que promueven el inicio de la fase S del ciclo celular. Entre estos se encuentran los genes de ciclinas y de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK). Estas cinasas promueven la fosforilación de numerosos reguladores del ciclo celular, incluyendo la pRB, que es inhibida. La inactivación de pRB por fosforilación refuerza la liberación del factor de transcripción E2F y cierra el ciclo de progresión hacia la fase S. La oncoproteína E7 puede activar los complejos ciclinas A y E/CDK2, ya sea por una interacción directa con ellos o mediante la activación de la fosfatasa Cdc25A que desfosforila a CDK2 y la reactiva. La E7 también disocia los complejos formados por los represores p21^{kip1} y p27^{kip1}, que mantienen secuestrado a CDK2 durante la fase G1; por lo tanto, se incrementa la disponibilidad de esta cinasa. La unión de E7 con p21 y p27 promueve su degradación en el proteasoma (Boshoff and Weiss, 2002).

Se ha descrito que la oncoproteína E7 es capaz de inducir el marcaje de proteínas con ubiquitina al interactuar con culina 2, una proteína que forma parte del complejo ubiquitín-ligasa. La unión de E7 con culina 2 promueve una ubiquitinación atípica de las proteínas de la familia de retinoblastoma (pRb, p107 y p130), lo que conduce a su degradación en el proteasoma (Huh et al., 2007; Wang et al., 2001).

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 de 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}) (Funk et al., 1997; He et al., 2003), 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., 1999a), 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 Mürnger, 2009) (Figura 5).

La oncoproteína E7 puede inhibir factores involucrados en la regulación del ciclo celular, lo cual incluye las proteínas p21^{cip1} y p27^{kip1}, que reprimen la acción de Cdk2 (Funk et al., 1997; He et al., 2003); esta activación conduce a la inducción aberrante de centrosomas supernumerarios y a la aneuploidía. La inducción de anomalías en los centrosomas mitóticos se lleva a cabo, en parte, por la asociación de E7 con la γ -tubulina, el regulador del centrosoma, y por la alteración concomitante del ensamblaje de γ -tubulina en los centrosomas, que conducen a la inestabilidad cromosomal (Zerfass-Thome et al., 1996). La proteína E7 también interactúa y activa a otras proteínas reguladoras de la transcripción, como la proteína de unión a caja TATA (TBP) y los factores de transcripción AP-1 y c-Myc (Arce et al., 2004; Pei, 1996). La interacción de E7 con estos factores de transcripción contribuye con el proceso de transformación maligna (Vallejo-Ruiz et al., 2015).

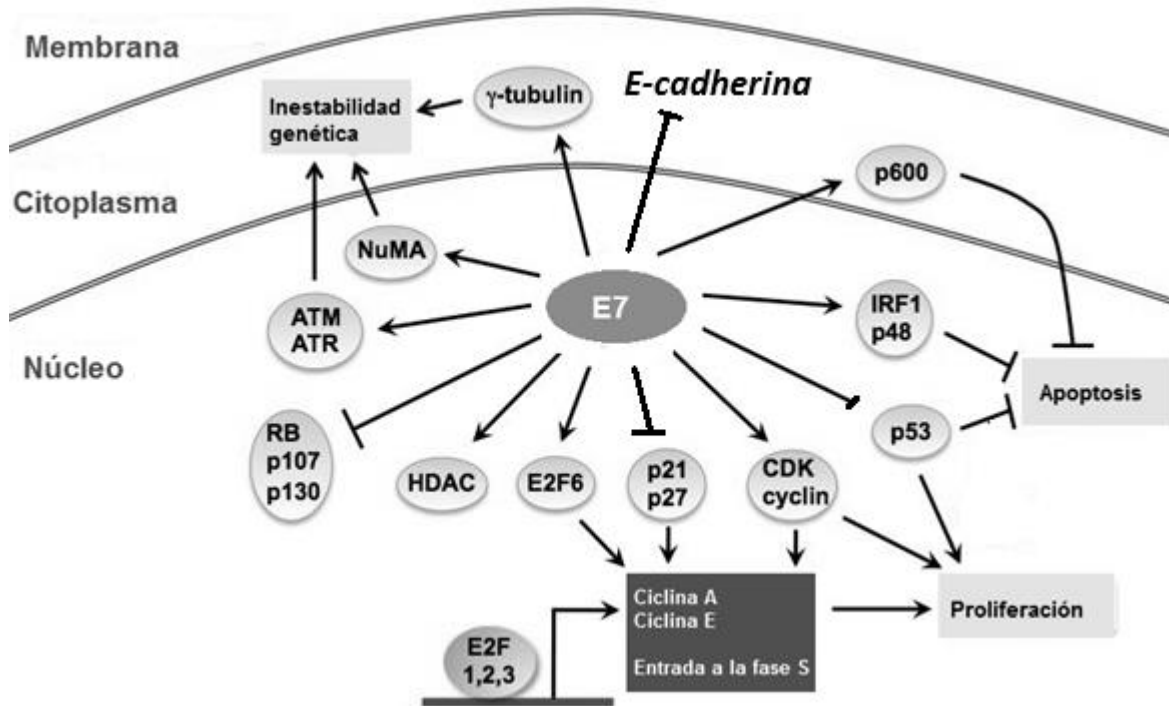


Figura 5. La oncoproteína E7 afecta numerosos procesos celulares a través de interacciones con múltiples proteínas celulares. La oncoproteína E7 desestabiliza el arresto de paso G1-S e induce hiperproliferación a través de la inhibición del supresor de tumor retinoblastoma (pRB) y la activación de genes responsivos a E2F. E7 también afecta la expresión de genes celulares por la interacción con deacetilasas de histonas (HDACs) y E2F6. E7 activa el ciclo celular por inhibición de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (tales como: p21 y p27), la estimulación de la 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 CKD2 y por interactuar con γ -tubulina, conduciendo a inestabilidad genética. E7 induce daño al ADN y activación de la vía ATM-ATR (ataxia telangelectacia-mutada-ATM) y daño al ADN en respuesta a RAD3), lo cual contribuye a la acumulación de alteraciones en los cromosomas. La interacción de E7 con p600 (una ubiquitin ligasa) 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 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 (Massimi and Banks, 1997).

Asimismo, se ha reportado 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), ocasionando pérdida de uniones célula-célula, lo cual sugiere 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. Sin embargo se ha reportado que E7 se une a p600 (Huh et al., 2005), una proteína involucrada en la resistencia a muerte celular por “anoikis” (Tasaki et al., 2005) y permite el crecimiento celular libre de anclaje (Huh et al., 2005).

Adicionalmente, la oncoproteína E7 puede interactuar con factores de transcripción lo que permite que E7 regule la expresión de genes por remodelamiento de la cromatina. Varios estudios han demostrado que la oncoproteína E7 puede directamente unirse a Mi2 (un componente importante del complejo HDAC-NuRD), lo cual conduce a la de-represión transcripcional de genes involucrados en diferentes procesos celulares, entre los cuales se encuentra la proliferación celular (Brehm et al., 1999a).

También fue reportado que la oncoproteína E7 se une y secuestra deacetilasas de histonas (HDAC), lo que permite 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). Asimismo se ha observado que la oncoproteína E7 está involucrada en la inducción de dos desmetilasas de histonas, KDM6A y KDM6B (McLaughlin-Drubin et al., 2011), lo cual conduce a una disminución de la tri-metilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3), permitiendo la activación transcripcional de genes reprimidos por esta marca epigenética (Schwartz and Pirrotta, 2007). Por otro lado, E7 se une directamente al factor de transcripción E2F6 y esta interacción tiene un impacto en la actividad de este factor, que es un componente importante del complejo represor Polycomb (PRC), por lo que E7 afecta la formación de los complejos E2F6-PcG (McLaughlin-Drubin et al., 2008) Figura 6. Estos datos sugieren que E7 induce una disminución de los niveles de la H3K27me3 conduciendo a 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), Figura 7. 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 las 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).

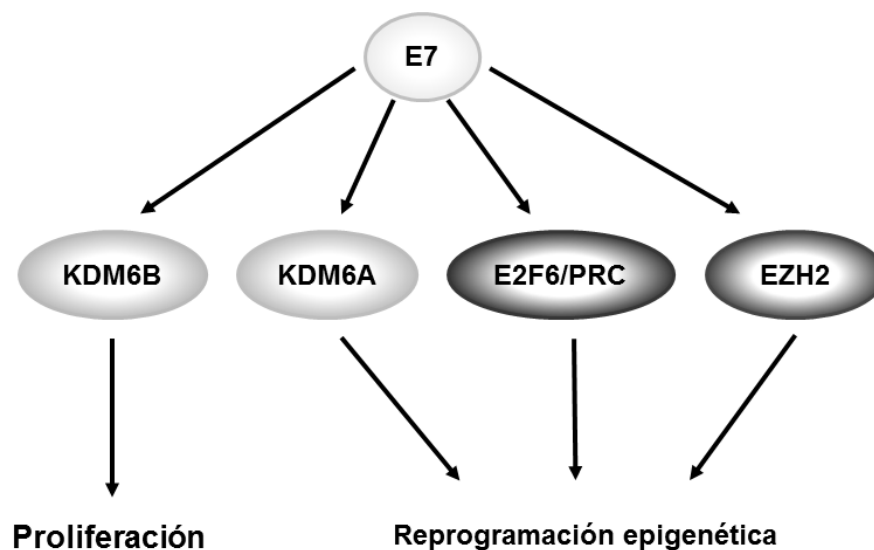


Figura 6. Modelo de reprogramación epigenética por la oncoproteína E7. La oncoproteína E7 del VPH-16 causa incremento en la expresión de KDM6A, KDM6B, EZH2 e interacciona directamente con E2F6. Lo que conduce a una alteración de los niveles de H3K27me3 y afecta la formación de los complejos E2F6-PcG, lo que conlleva a la proliferación aberrante y una reprogramación epigenética (McLaughlin-Drubin et al., 2011).

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., 2004). 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 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 (Nguyen and Münger, 2009), 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).

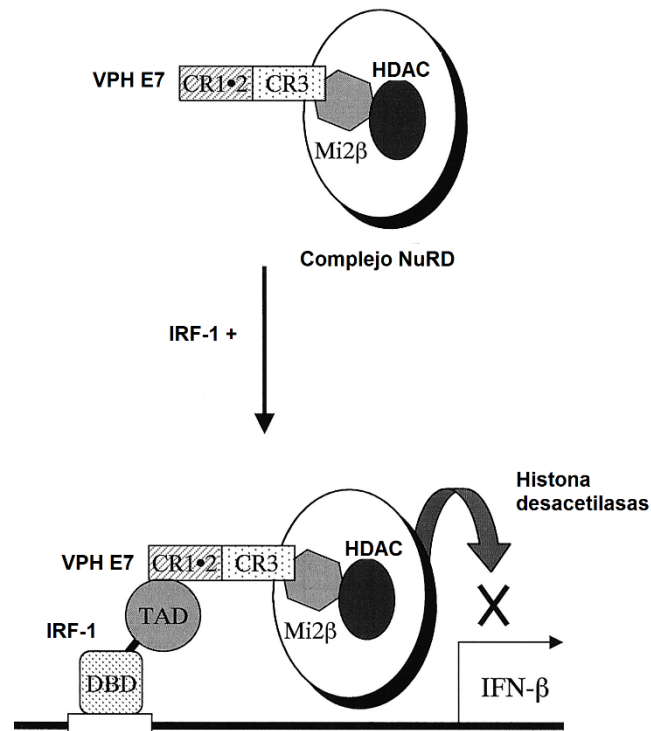


Figura 7. Esquema de cómo la oncoproteína E7 de los VPHs inactiva la función de IRF-1.

La oncoproteína E7 se asocia con HDAC a través de una interacción directa entre Mi2b y los dedos de Zinc de la región carboxilo-terminal de E7. Además, el dominio amino-terminal de E7 interacciona con el dominio de transactivación carboxilo-terminal (TAD) de IRF-1. IRF-1, un factor de transcripción, el cual se une a elementos de respuesta a IRF-1 (IRFRE) localizados en muchos genes inducidos por IFN, por ejemplo el gen IFN- β . Durante la infección por HPV, la oncoproteína E7 primero se asocia con el complejo NuRD, el cual contiene HDAC (responsable de mediar la deacetilación de histonas) y estos interaccionan con IRF-1. Estas interacciones pudieran ser las responsables de la inactivación del factor de transcripción IRF-1 por la oncoproteína E7, lo cual está implicado en la evasión de la respuesta inmune dependiente de IRF-1 en la carcinogénesis cervical (Park et al., 2000).

3.4 ESTROGENOS Y RIESGO DE CANCER CERVICAL

Los estrógenos son hormonas; a través de sus receptores nucleares $ER\alpha$, $ER\beta$ y su receptor de membrana GPR30, influyen en la función de procesos fisiológicos de varios tejidos/sistemas incluidos pero no limitados al tracto reproductivo femenino y mama, también tienen un efecto en tejidos no-reproductores como en los sistemas cardiovascular, óseo, nervioso y sistema inmune (Deroo and Korach, 2006).

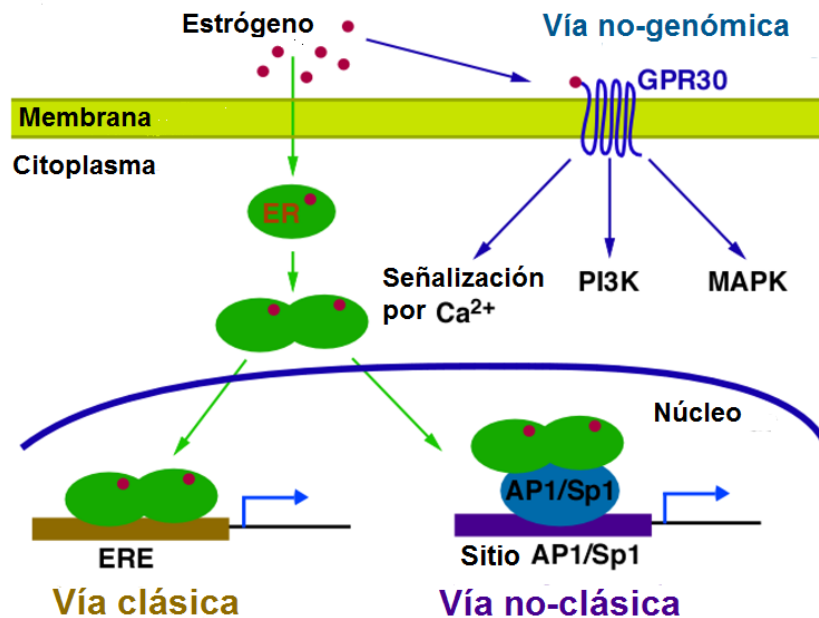


Figura 8. Vía de señalización del estrógeno (Chung et al., 2010).

El estrógeno se une a sus receptores en el citoplasma e induce homo- o dimerización y es translocado al núcleo, donde activa o reprime genes por medio de dos mecanismos: Clásico, donde estrógeno-ER se une a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y regula la expresión de sus genes diana, y No-clásico, donde el estrógeno-ER se une a los factores de transcripción AP1 y SP1 para modificar la función de estos factores. El estrógeno también puede unirse al receptor de membrana GPR30, el cual es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G. La unión estrógeno-GPR30 conduce a la activación de varias vías de señalización, incluida pero no limitada a las vías fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K),

proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la señalización por Ca^{2+} (vía no-genómica)(Figura 8) (Chung et al., 2010).

A pesar que se ha demostrado que los VPHs tienen un papel oncogénico, también se ha reportado que la infección de VPH es necesaria pero no es suficiente para el desarrollo de CC, por lo que se requiere de otros factores importantes tales como; la respuesta inmune, factores químicos y biológicos, dentro de los cuales los estrógenos juegan un papel importante en la carcinogénesis cervical por diferentes mecanismos, incluyendo la inducción de metaplasia escamosa en la zona de transformación del cérvix uterino (Delvenne et al., 2007).

Algunos estudios reportan que el uso prolongado de anticonceptivos orales pueden ser un factor de riesgo para el desarrollo de displasia y CC (Deligeoroglou et al., 2003; Williams, 1991). Por otro lado se ha observado que mujeres que usan anticonceptivos orales tiene 1.92 veces (IC 95%: 1.1-3.3) el riesgo de desarrollar displasia cervical (McFarlane-Anderson et al., 2008). Asimismo se ha observado que mujeres que usan anticonceptivos orales por un periodo mayor de 8 años tienen 6.01 (IC 95% 2.5-17.9) veces más el riesgo de desarrollar CC (Vessey and Painter, 2006). En otros estudios se ha reportado resultados muy similares, donde se observa que el uso de anticonceptivos orales por periodos entre 5 a 10 años tienen un riesgo relativo de 2.2 (IC 95%: 1.9-2.4) veces más el riesgo de desarrollar CC (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2007). Sin embargo se ha observado que el riesgo de desarrollar CC incrementa en mujeres infectadas con VPH de alto riesgo (riesgo relativo 2.5 IC 95%: 1.6-3.9)(Moreno et al., 2002).

3.5 PAPEL DE LOS ESTRÓGENOS Y ONCOPROTEÍNA E7 DEL VPH DE ALTO RIESGO EN EL DESARROLLO DE CÁNCER CERVICAL.

La fuerte evidencia de que el estrógeno está implicado en la carcinogénesis cervical proviene de estudios en ratones transgénicos. En estos ratones se ha usado la expresión de los oncogenes 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) (Chung et al., 2010). Aunque en estos ratones

transgénicos se observan tumores espontáneos en piel, raramente desarrollan cáncer cervical espontáneamente (Lambert and Griep, 2007). Sin embargo cuando los ratones transgénicos son tratados con 17β -estradiol, estos eficientemente desarrollan cáncer cervical (Brake and Lambert, 2005; Chung et al., 2008; Riley et al., 2003).

Ha sido observado en ratones transgénicos (K14E7 VPH-16) que la oncoproteína E7 en conjunto con el 17β -estradiol fueron suficientes para inducir hiperproliferación e inhibición de la diferenciación epitelial, requisitos necesarios que conducen a una displasia de alto grado; además fue encontrado que el 17β -estradiol y la oncoproteína E7 sinergizan para producir lesiones de alto grado y cáncer invasor (Riley et al., 2003), lo que sugiere que el 17β -estradiol puede ser un carcinógeno directo que puede contribuir en la iniciación de lesiones epiteliales. Asimismo, el 17β -estradiol no sólo contribuye en la génesis, sino también en el mantenimiento de neoplasias cervicales (Brake and Lambert, 2005). Los ratones transgénicos (K14E7 VPH-16) recapitulan los aspectos clave del CC observados en mujeres entre los que se encuentran: 1) la enfermedad neoplásica progresiva que conduce a cáncer es muy similar a lo observado en mujeres; 2) los cánceres con frecuencia surgen en la zona de transformación del cuello del útero; y 3) los cánceres cervicales que surgen en estos ratones expresan biomarcadores similares a los observados en CC humano (Brake et al., 2003; Elson et al., 2000).

3.6 CÉLULAS TRONCALES

La célula troncal se define como aquella célula que es capaz de autodividirse de manera ilimitada y dar origen a alrededor de 200 linajes distintos. Muchos tejidos humanos experimentan un rápido y continuo recambio celular a través de procesos estrictamente regulados de renovación. Bajo condiciones fisiológicas este proceso es sostenido por una pequeña minoría de células con un extraordinario potencial de expansión, conocidas como células troncales (Liu et al., 2005). Las células troncales están definidas por tres propiedades principales: a) *Auto renovación*: la capacidad para formar nuevas células troncales idénticas, con el potencial intacto para proliferación, expansión, y diferenciación; b) *Potencial de diferenciación*: se refiere

a la capacidad para dar origen a una progenie heterogénea de células, las cuales progresivamente se diversifican y dan origen a células maduras diferenciadas y c) *Control homeostático*: la capacidad para modular y balancear la diferenciación de la auto-renovación de acuerdo con la estimulación del medio ambiente y las limitaciones genéticas (Dalerba et al., 2007; Liu et al., 2005). Sin embargo se ha observado que defectos en los mecanismos de auto-renovación pueden conducir a un envejecimiento prematuro y a cáncer (Shenghui et al., 2009).

3.6.1 REGULACIÓN DE LA PLURIPOTENCIA Y DIFERENCIACIÓN CELULAR

Una de las propiedades de las células troncales es su continua auto-renovación, lo que requiere de un perfil único de expresión de factores de transcripción que permitan mantener el estado pluripotente. Además, las células troncales para diferenciarse en diferentes linajes celulares, deben cambiar a perfiles de transcripción alternativos. Los mecanismos transcripcionales y epigenéticos juegan un papel importante en el mantenimiento del perfil transcripcional. Por otro lado, los microRNAs (miRNAs), quienes son otros reguladores de la expresión génica, también tienen un papel importante como reguladores claves de la pluripotencia (Chen and Daley, 2008). En la Figura 9, se resume las redes regulatorias clave de la pluripotencia. En células troncales, los factores transcripcionales de pluripotencia trabajan junto con reguladores epigenéticos para activar genes involucrados en el mantenimiento del estado pluripotente y para reprimir los genes involucrados en el desarrollo (Chen and Daley, 2008). En un estado diferenciado, los factores de pluripotencia disminuyen, lo cual también es facilitado por un perfil característico de miRNAs, dando un cambio en el perfil de transcripción, lo que conduce a que los genes requeridos para mantener la pluripotencia sean silenciados. Asimismo, la cromatina en células diferenciadas se vuelve más compacta, lo cual correlaciona con la disminución en el potencial de diferenciación y restricción a linaje (Chen and Daley, 2008).

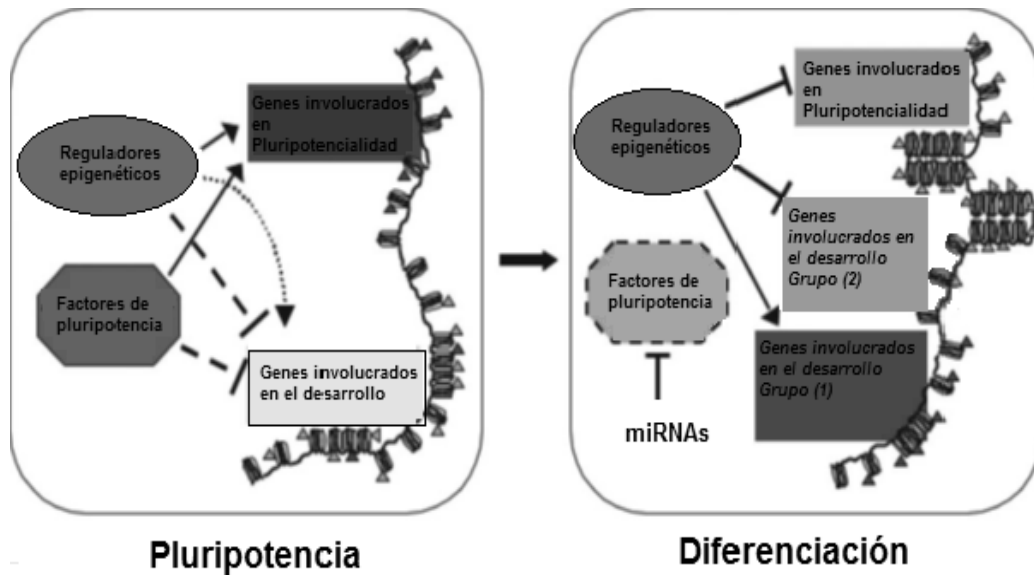


Figura 9. Características claves en la regulación de la pluripotencia (Chen and Daley, 2008)

3.6.2 LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN OCT3/4, SOX2 Y NANOG REGULADORES DEL ESTADO PLURIPOTENTE DE LA CÉLULA TRONCAL

Diversos estudios han sugerido que las células pluripotentes expresan un único perfil de factores que son la base de la troncalidad, los cuales son denominados factores de pluripotencialidad, quienes son funcionalmente importantes para mantener su estado pluripotente y sirven como marcadores de las células pluripotentes (Ivanova et al., 2002; Ramalho-Santos et al., 2002; Sato et al., 2003).

Entre los factores de pluripotencialidad tenemos: a Oct3/4, Sox2 y Nanog. El factor Oct3/4 (abreviación de Octamer 4 y también llamado Oct3 y Pou5f1) es un factor de transcripción con homeodominio que pertenece a la familia de proteínas POU. Oct3/4, junto con Sox2, es el único factor necesario para mantener la capacidad de pluripotencia y autorrenovación de la célula troncal. La importancia de Oct3/4 en la diferenciación celular se hace evidente en los embriones de ratón Oct4^{-/-}, que no pueden formar las células del interior del blastocisto (ICM) y el embrión se diferencia a trofoectodermo (Nichols et al., 1998).

Nanog es un factor de transcripción que tiene un dominio de unión a ADN, al igual que Oct3/4. Nanog tiene la capacidad de mantener a las células troncales en

ausencia del factor de crecimiento LIF (Leukemia Inhibitory Factor, que de otra manera es necesario para mantener a estas células creciendo) (Mitsui et al., 2003). La sobreexpresión de Nanog aumenta la capacidad de auto-renovación y las células se mantienen un estado indiferenciado. Por otro lado, se ha observado que la ausencia de Nanog en células del interior del blastocito, conduce a la diferenciación hacia endodermo (Loh et al., 2006; Mitsui et al., 2003).

El factor Sox2 es un miembro de la familia de factores de transcripción Sox (SRY-related HMG box), caracterizados por tener un dominio de unión a DNA del tipo HMG (High Mobility Group). Experimentos en ratones han demostrado que Sox2 es necesario para el desarrollo embrionario y para prevenir la diferenciación celular (Avilion et al., 2003). Asimismo ha sido observado que la reducción en la expresión de Sox2 en células del interior del blastocito conduce a la pérdida del estado pluripotente (Avilion et al., 2003).

3.6.3 INTERACCIÓN ENTRE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN OCT3/4, SOX2 Y NANOG PARA MANTENER LA TRONCALIDAD CELULAR

A través de diversos estudios se ha revelado que los tres factores (Oct3/4, Sox2 y Nanog) se encuentran unidos en un complejo a sus propios promotores, formando un circuito de autorregulación que mantiene la pluripotencia celular. Además se ha demostrado que estos tres factores o combinaciones de dos de ellos se unen a los promotores de cientos de genes (Chew et al., 2005; Loh et al., 2006). Por tanto, Oct3/4, Sox2 y Nanog no controlan sus genes diana independientemente sino que trabajan de manera conjunta para mantener el perfil transcripcional requerido para la pluripotencia (Chew et al., 2005). Por otro lado, se ha observado que entre los genes a los que se une Oct3/4, la mitad de ellos también son reconocidos por Sox2. Mientras que aprox. el 90% de las regiones promotoras de unión a Oct3/4 y Sox2 son también reconocidas por Nanog (Pan et al., 2002). Por otro lado se ha observado que la otra mitad reconocidos por Oct3/4, Sox2 y Nanog son genes inactivos y la mayoría de ellos son genes también regulados por proteínas del grupo Polycomb (proteínas PcG) (Boyer et al., 2006). Las proteínas PcG forman varios tipos de complejos que reprimen la expresión génica (PRC,

Polycomb Repressive Complexes). Estos complejos son responsables del silenciamiento de genes a través de mecanismos epigenéticos, y principalmente la metilación de histonas, que llevan a la cromatina a un estado silente (Schwartz and Pirrotta, 2008). Típicamente, los complejos de PcG son responsables de la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) y se ha observado que Ezh2 mantiene los niveles de H3K27me3 en células troncales (O'Carroll et al., 2001). Por otro lado se ha reportado un incremento de los niveles H3K27me3 en células que expresan Oct3/4, Sox2 y Nanog (Wernig et al., 2007), esto a través de la inducción de Ezh2 por Oct3/4, Sox2 y Nanog (Chew et al., 2005) (Figura 10).

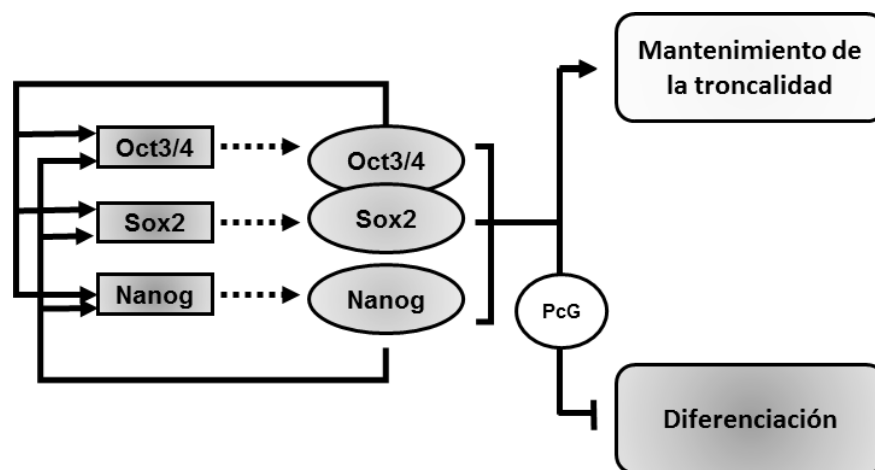


Figura 10. Oct3/4-Sox2-Nanog forman un circuito de redes que regulan la maquinaria transcripcional de las células troncales. Varios promotores de genes diana son reconocidos y co-ocupados por Oct3/4, Sox2 y Nanog. Los cuales pueden ser clasificados en dos grupos de genes, quienes ejercen funciones opuestas. Un grupo incluye la activación genes asociados con proliferación, remodeladores de la cromatina y señalización (Mantenimiento de la troncalidad). Por otro lado, La transcripción de muchos genes que codifican para factores de transcripción “maestros” es inhibida por proteínas del grupo Polycomb (PcG). Las proteínas del PcG son reguladas por Oct3/4, Sox2 y Nanog (Bosnali et al., 2009; Boyer et al., 2005).

3.7 CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS Y CANCER CERVICAL

Ha sido reportado que los tumores son una población de células heterogéneas con diferentes propiedades biológicas; la capacidad de la formación del tumor y el crecimiento reside exclusivamente en una pequeña población de células tumorales, las cuales han sido nombradas como células troncales tumorales (CTT), células troncales cancerosas (CTCs) o células iniciadoras de tumor (Marx,

2003; Pardal et al., 2003). Las CTCs son una subpoblación de células tumorales que tienen la capacidad de auto-renovación para generar los diferentes linajes celulares que componen un tumor. Las CTCs han sido identificadas en diversos tumores sólidos de mama (Al-Hajj et al., 2003), ovario (Szotek et al., 2006), endometrio (Friel et al., 2008), próstata (Collins et al., 2005), pulmón (Ho et al., 2007) y cáncer cervical (Hou et al., 2015; Wang et al., 2014; Zhang et al., 2012a).

Recientemente, fue reportado que la neoplasia cervical escamosa y columnar es derivada de la infección por VPH-AR de células epiteliales localizadas en la unión escamo-columnar o zona de transformación (TZ) del epitelio cervical (Feng et al., 2009; Herfs et al., 2012). Asimismo se ha mostrado que las células de esta zona presentan marcadores únicos [por ejemplo, Queratina 7 (KRT7), “cluster” de diferenciación (CD63), metaloproteinasas de matriz 7 (MMP7)] (Feng et al., 2009).

Otras observaciones sugieren que las células troncales de la TZ del epitelio cervical son blanco de la transformación maligna (Feng et al., 2009). Los argumentos que apoyan esto son: (1) Las células troncales tienen la maquinaria de auto-renovación activada, lo cual es una marca del cáncer; por lo tanto, pueden requerir un menor número de mutaciones para la transformación maligna en comparación con las células maduras. (2) Las células troncales persisten por largos periodos de tiempo, en comparación de las células maduras las cuales viven por periodos cortos. Esto significa que hay una mayor oportunidad de acumulación de mutaciones en células troncales que en células maduras (Reya et al., 2001). (3) La zona de transformación del epitelio cervical es un nicho de células con un único perfil de expresión y con características embrionarias (Feng et al., 2009; Herfs et al., 2013; Reya et al., 2001). (4) Las células diana de los VPH-AR son células cuboides epiteliales localizadas en la TZ del epitelio cervical (las cuales son consideradas células troncales del epitelio cervical) (Feng et al., 2009; Herfs et al., 2013).

Nanog, Nucleostemina y Musashi 1 han sido identificados como los primeros marcadores putativos de células troncales en CC (Ye et al., 2008). Por otro lado se han usado marcadores de superficie tales como: CD44 y Citoqueratina (CK17) para enriquecer la población celular stem-like en CC (Martens et al., 2004). Feng *et al.*,

encontró que un grupo celular de tejido cervical de CC posee la capacidad tumorigénica y expresan genes relacionados a troncalidad de células adultas y embrionarias (Piwil2, c-Myc, Stat3, Oct3/4 y Sox2) (Feng et al., 2009). Asimismo fue reportado que células CD44⁺CK17⁺ de CC poseen características de células troncales (Feng et al., 2009). Además, estas células muestran las características de auto-renovación, quimioresistencia, y tumorigenicidad *in vivo*, promoviendo la recurrencia del cáncer y posiblemente metástasis (Feng et al., 2009). Por otro lado, se presume que las células diana de la infección por VPH-AR son las células troncales del epitelio cervical de la TZ, lo cual es soportado por lo reportado por Martens *et al.*, que describen que p63 y CK17 son marcadores de células troncales cervicales en tejido ectocervical, endocervical normal, y en neoplasia intraepitelial cervical grado I, II y III (Martens et al., 2004).

Recientemente ha sido reportado que dentro de los marcadores de células troncales del epitelio cervical se encuentra la expresión de ALDH1, Oct3/4, Sox2, Nanog y CD49f los cuales también han sido identificados en CTCs cervicales (Hou et al., 2015; Kim et al., 2015). Además, se ha observado un incremento en la expresión de estos marcadores en carcinoma de células escamosas cervicales y su expresión está estrechamente relacionada con la sobrevivencia de los pacientes con cáncer cervical, lo cual sugiere un importante papel de estos marcadores en la predicción del pronóstico clínico de esta neoplasia (Hou et al., 2015). Por otro lado, se ha observado que el silenciamiento de Oct3/4, Sox2 y Nanog en líneas celulares derivadas de cáncer cervical ocasiona un incremento de la apoptosis de las células tumorales, disminución en la formación de tumor-esferas e inhibición de la formación del tumor en modelos de xenotransplante (Shen et al., 2014), lo cual sugiere que Oct3/4, Sox2 y Nanog son marcadores de CTCs en cáncer cervical (Kim et al., 2015).

3.8 DESREGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE OCT3/4, SOX2, NANOG EN CANCER CERVICAL

3.8.1 Oct3/4

El factor de transcripción Oct3/4 juega un papel muy importante en la pluripotencia de las células troncales y diferenciación celular (Rodda et al., 2005; Rosner et al., 1990). Ha sido reportado que Oct3/4 es responsable del mantenimiento de la auto-renovación de las CTCs cervicales, además de contribuir en la iniciación del tumor (Li et al., 2015). Asimismo se ha observado una alta expresión de Oct3/4 en líneas celulares derivadas de cáncer cervical VPH positivas y la expresión de Oct3/4 está estrechamente relacionada con la infección viral de VPH16/18 (Liu et al., 2011).

Por otro lado se encontró que células Oct3/4 positivas son resistentes a la quimioterapia y eventualmente pueden conducir a la recurrencia del tumor (Li et al., 2015; Shen et al., 2014). También se ha reportado que la expresión de Oct3/4 se asocia con la radioresistencia y con una pobre sobrevivencia de las pacientes (56.39%) con carcinoma cervical avanzado (Shen et al., 2014).

3.8.2 Sox2

Sox2 está involucrado en la regulación del ciclo celular, reparación de ADN y auto-renovación de las células troncales (Peng et al., 2012). Ji y Zheng examinaron la expresión de Sox2 en tejido normal y tumoral cervical y observaron que la expresión de Sox2 es incrementada con forme avanza el grado de lesión cervical (Ji and Zheng, 2010). Asimismo, se ha observado que Sox2 es establemente expresado en las líneas celulares de cáncer cervical (SiHa y HeLa) y se reportó que células Sox2 positivas muestran un aumento en proliferación, clonogenicidad y tumorigenicidad mediante ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* (Ji and Zheng, 2010).

Recientemente ha sido reportado que la alta expresión de Sox2 es asociada con la pérdida de la diferenciación celular; además este factor transcripcional contribuye a la migración e invasión del CC (Shen et al., 2014). Por otro lado, Ji et al., reportaron que aquellos pacientes con altos niveles de expresión de Sox2 (55.81%) tienen una sobrevivencia mucho más baja (Ji et al., 2014). Estos resultados proveen evidencia que los altos niveles de expresión de Sox2 pudieran ser usados como un predictor de pobre pronóstico en pacientes con CC.

3.8.3 *Nanog*

Nanog juega un papel muy importante en el mantenimiento de la auto-renovación y pluripotencia de las células troncales (Pan and Thomson, 2007; Pereira et al., 2006). Ye et al., examinaron la expresión de Nanog en lesiones epiteliales cervicales y en carcinoma cervical; reportaron que los altos niveles de expresión de Nanog aumentaron con forme incrementa el grado de lesión; observando que los niveles de Nanog fueron significativamente altos en el 23.40 % de carcinoma de células escamosas cervicales comparado a aquellos con neoplasia intraepitelial cervical (NIC), donde se observó que el 20.42% fueron positivas. Además, se observó que la expresión de Nanog en el 25.12% de los pacientes con NIC fue mucho más elevada que en individuos aparentemente sanos (Ye et al., 2008). Por otro lado, se ha observado que Nanog promueve la progresión del CC tanto *in vivo* como *in vitro* (Gu et al., 2012). Los resultados indican que Nanog pudiera estar involucrado en la carcinogénesis cervical.

3.9 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE OCT3/4, SOX2, NANOG Y FGF4 POR LOS ESTRÓGENOS

Recientemente, ha sido reportado que la vía de señalización de los estrógenos está implicada en la regulación de las células troncales cancerosas (Fillmore et al., 2010). Asimismo, se ha observado que el tratamiento con estrógeno induce propiedades de células troncales cancerosas (Fillmore et al., 2010; Sun et al., 2014). Además, fue reportado que los estrógenos están implicados en la inducción de la expresión de Oct3/4, Sox2, Nanog y Fgf4 en líneas celulares derivadas de cáncer de mama (Fillmore et al., 2010; Jung et al., 2010; Sun et al., 2014; Zhang et al., 2012b). Un mecanismo propuesto para esta situación es que el receptor de estrógenos α (ER α) activa la transcripción de Oct3/4, Sox2 y Nanog. Por ejemplo se ha observado que ER α se une al promotor de Oct3/4, lo cual promueve alta expresión de Oct3/4, conduciendo a la activación de la auto-renovación de las células troncales cancerosas (Jung et al., 2011).

IV. JUSTIFICACION

El cáncer cervicouterino es una de las neoplasias de mayor importancia en México ya que, dentro de las enfermedades neoplásicas, es la segunda causa de muerte y representa un problema de salud pública en la población femenina en nuestro país. Actualmente, se ha sugerido que los tumores están sostenidos por una subpoblación minoritaria de células denominadas Células Troncales Tumorales (CTC), las cuales son resistentes a la quimio y radio terapia y poseen la capacidad de autorenovarse y diferenciarse aberrantemente, por lo que pueden generar los diferentes linajes celulares que componen un tumor.

Las CTC requieren de un perfil único de expresión de factores de transcripción para poder mantener estas características de troncalidad. Hasta ahora, muchos factores de transcripción claves han sido identificados como esenciales para la identidad de las células troncales embrionarias, incluidos Oct3/4, Sox2 y Nanog. Recientemente se ha reportado en CC que existe una subpoblación de células que expresan Oct3/4, Sox2 y Nanog; además, se ha observado que la expresión de estos factores está estrechamente relacionada a la infección por VPH-AR. Sin embargo, no ha sido estudiado si la oncoproteína E7 participa en la desregulación de Oct3/4, Sox2 y Nanog en CC. Tampoco se sabe si los estrógenos participan en esta desregulación.

Por otra parte, los ratones transgénicos K14E7, modelo de cáncer cervical, son una herramienta muy importante para evaluar el efecto de la oncoproteína E7 y del 17β -estradiol (E_2) como factores involucrados en el desarrollo de esta enfermedad. Además, es bien conocido que la progresión de la carcinogénesis cervical en el modelo K14E7 es muy similar a la que ocurre en los humanos. Por lo que el modelo murino K14E7 nos permite evaluar el efecto de la oncoproteína E7 del VPH-16 y los estrógenos sobre la expresión de Oct3/4, Sox2 y Nanog de manera separada y en conjunto en tejido de cáncer cervical, de una manera controlada.

V. OBJETIVOS

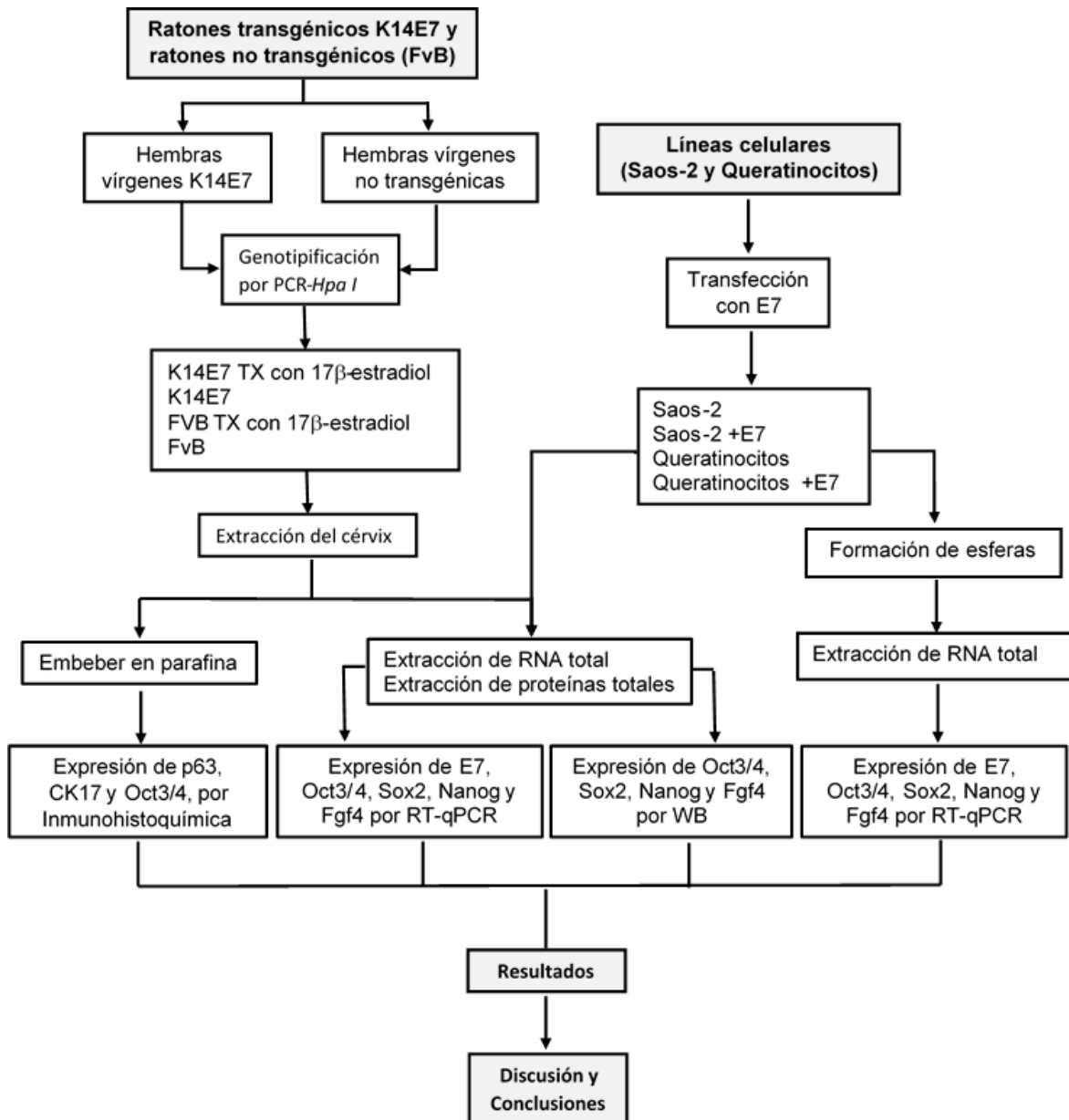
GENERAL

Determinar el efecto de la oncoproteína E7 del VPH-16 y el 17 β -estradiol (E₂) sobre la expresión de Oct3/4, Sox2, Nanog y Fgf4 en un modelo murino de carcinogénesis cervical (ratón transgénico K14E7), así como también en líneas celulares transfectadas con la oncoproteína E7 del VPH-16.

ESPECÍFICOS

1. Determinar los cambios de expresión de PCNA, p63, Ck17, Oct3/4 y genes relacionados con la troncalidad celular (Sox2, Nanog y Fgf4) provocados por la oncoproteína E7 del VPH-16 y el E₂, usando tejido cervical de ratones transgénicos K14E7+E₂.
2. Determinar los cambios de expresión de los mencionados genes provocados únicamente por la oncoproteína E7 del VPH-16 usando tejido cervical de ratones transgénicos K14E7.
3. Determinar los cambios de expresión de los mencionados genes provocados únicamente por E₂ usando tejido cervical de ratones no transgénicos (FvB+E₂).
4. Determinar los cambios de expresión de Oct3/4 y genes relacionados con la troncalidad celular (Sox2, Nanog y Fgf4) en líneas celulares transfectadas con la oncoproteína E7 (Saos-2 + E7 y queratinocitos + E7).
5. Determinar si la oncoproteína E7 está involucrada en la auto-renovación celular en líneas celulares transfectadas con la oncoproteína E7 (Saos-2 + E7 y queratinocitos + E7).

VI. DIAGRAMA DE TRABAJO



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. LÍNEAS CELULARES

Los queratinocitos primarios humanos (PHK, por sus siglas en inglés “Primary human keratinocytes”) fueron obtenidos de prepucios de donadores de dos años de edad. Los PHK fueron cultivados en Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco/ Mezcla de nutrientes (DMEM/F12, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), suplementado con 0.18 mM de adenina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.1 µg/mL de hidrocortisona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 4 µg/mL de insulina (Gibco, Life Technologies, USA), 20 ng/mL de factor de crecimiento epidermal (PeproTech®), 5% de suero fetal bovino (Gibco, Life Technologies, USA) y una mezcla de antibióticos-antimicóticos (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e incubadas a 37°C en un ambiente húmedo con un 5% de CO₂. Los PHKs fueron positivos a Citoqueratina 5, 10 y 14, presentaron baja expresión de Vimentina y negativos a Decorina. Los PHKs fueron transfectados con el oncogen E7 usando Attractene (QIAGEN, Valencia, CA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para obtener células establemente transfectadas, se seleccionaron y se mantuvieron en un medio de crecimiento que contuvo 200 mg/mL geneticina (G418) (Invitrogen®, Carlsbad, CA,

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/estreptomina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e incubadas a 37°C en un ambiente húmedo con un 5% de CO₂. 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.

7.2. CULTIVO DE TUMOR-ESFERAS

Para examinar la capacidad de formación de esferas de las líneas celulares que expresan la oncoproteína E7, las células con una confluencia de aproximadamente 80%, fueron resuspendidas en un medio de cultivo para esferas libre de suero (MammoCult, StemCell Technologies, Inc., Canada) y suplementos de proliferación MammoCult. Se realizó el cambio de cultivo cada 48 horas. Una “esfera” fue definida por más de 15 células. Las esferas se sedimentaron y la formación de tumor-esferas fueron examinadas y contabilizadas en al menos 9 diferentes campos bajo el microscopio. El número de esferas formadas durante 1, 3, y 5 días fue contado. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

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 transgénicos 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 libres 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 las oncoproteínas 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 solo 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 17 β -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 libera 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 fue requerida 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 17 β -estradiol (K14E7+E₂), 2) hembras K14E7 sin tratamiento (K14E7), 3) hembras no transgénicas tratadas con 17 β -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 (rotura de cuello) e inmediatamente se extrajo el cérvix el cual fue colocado en solución “RNA later” (Ambion, USA) 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 RNAlater e inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido y fue almacenado a -80 °C hasta su uso.

7.6. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

El método de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) fue utilizado para extraer RNA total (ARNs grandes y pequeños) de la línea celular (Saos-2 y Queratinocitos) y de los tejidos cervicales, de acuerdo las instrucciones del fabricante. La integridad y concentración del ARN fue evaluada por medio de espectrofotometría midiendo la relación de la absorbancia.

7.7. CUANTIFICACION DEL RNAm USANDO PCR TIEMPO REAL CUANTITATIVA (RT-qPCR).

Para la cuantificación de ARNm específico, el RNA total (1 µg) fue convertido a cDNA usando Kit “SuperScript™ II First Strand Syntesis (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, USA) 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 minuto, 60 °C por un minuto y 72°C por 1 minuto.

Cuadro 1. Secuencias de los oligonucleótidos usados en este trabajo

	Oligonucleótido sentido (5' a 3')	Oligonucleótido antisentido (5' a 3')	Tamaño del amplificado (bp)
Ratón			
Oct3/4	GGATGGCATACTGTGGACCT	AGTTGCTTTCCACTCGTGCT	105
HPRT	CCAGCAAGCTTGCAACCTTAAC	GTAATGATCAGTCAACGGGGG	177
Humano			
Oct3/4	TTCGCAAGCCCTCATTTC	GAGAAGGCGAAATCCGAAG	87
Sox2	TGCGAGCGCTGCACAT	GCAGCGTGTACTTATCCTTCTTCA	93
Nanog	AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG	TGCGTCACACCATTGCTATTCTTC	149
Fgf4	CCAACAACCTACAACGCCTACGA	CCCTTCTTGGTCTTCCATTCT	83
β ₂ -MG	ACCCCACTGAAAAAGATGAG	ATGATGCTGCTTACATGTCTCG	100
E7	AAGTGTGACTCTACGCTTCGGTT	GCCCATTAACAGGTCTTCCAAA	78

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 MgCl₂ (concentración final) y SYBR Green I dye (*Applied Biosystems, U.S.A.*)], 1 µL de cada oligonucleótido (0.5 µM), 500ng de cDNA por reacción y agua ultrapura. La secuencia de los oligonucleótidos y los tamaños de los productos de PCR son mostrados en el cuadro 1. Todas las reacciones fueron realizadas en 5 diferentes ratones y la expresión relativa de los ARNms en células y en los ratones fue normalizada a la expresión de β₂M y HPRT, respectivamente. La expresión de los ARNms fue determinada con el ciclo umbral (C_t) y los niveles relativos de expresión fueron calculados utilizando el método 2^{-ΔΔC_t} (Nolan et al., 2006).

7.8. INMUNOHISTOQUÍMICA-INMUNOFLUORESCENCIA

Los tejidos cervicales fueron fijados en paraformaldehído al 4% en buffer fosfato salino 1X (conocido también por sus siglas en inglés, PBS) durante toda la noche a 4°C. Los tejidos fueron lavados en PBS 1X, posteriormente fueron embebidos en parafina y cortados en secciones de 3 μm utilizando el micrótopo Leica (RM2125 RTS, USA). Secciones seriadas fueron utilizadas para realizar la tinción por inmunohistoquímica de PCNA, p63, CK17 y Oct3/4. Las células cultivadas en monocapa fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 min y fueron usadas para detectar a Oct3/4. Las proteínas fueron detectadas utilizando el sistema Mouse/Rabbit PolyDetector HRP/DAB (Bio SB, USA). La actividad de la peroxidasa endógena fue inactivada por incubación con H_2O_2 al 3% durante 5 min. La recuperación de antígeno fue realizada por calentamiento de las muestras (121 °C) en la solución de citratos ImmunoRetriever (Bio SB, USA) durante 15 minutos y bajo una presión de 20 lb. Después de la recuperación de antígeno las laminillas fueron incubadas por 24 hrs a 4 °C con los anticuerpos primarios diluidos (1:100) en Immuno Detector Protein Blocker/Antibody Diluent (Bio SB, USA). Los anticuerpos primarios usados en este estudio fueron anti-PCNA (Sc-25280, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-p63 (Sc-71827, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-Ck17 (Sc-101931, Santa Cruz Biotechnology, USA) y anti-Oct3/4 (ab19857, Abcam, USA). Posteriormente, las laminillas fueron incubadas por 1 hr con el anticuerpo secundario acoplado a peróxidasa de rábano (HRP) (PolyDetector HRP label; Bio SB, USA). Las secciones fueron incubadas con el sustrato apropiado (PolyDetector DAB chromogen, Bio SB, USA) y contrateñidas con hematoxilina.

El anticuerpo anti-Oct3/4 (ab19857, Abcam, USA) diluido a 1:100 fue usado también para la inmunofluorescencia. Después de la incubación con el anticuerpo secundario marcado con tetrametilrodamina (TRITC), las células fueron contrateñidas con DAPI, y montadas con Vectashield (Vector). Las células fueron visualizadas en un microscopio de inmunofluorescencia Zeiss.

7.9 CAPTURA, ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LAS IMÁGENES

Las imágenes fueron capturadas usando la cámara digital DFC290 HD (Leica Microsystems, USA). Posterior las imágenes fueron procesadas digitalmente para igualar el brillo y contraste usando el software PhotoImpact (Ulead PhotoImpact SE ver. 3.02; Ulead Systems, USA) y de acuerdo a los métodos reportados por (Ocadiz-Delgado et al., 2012). El conteo de la señal positiva de la inmunohistoquímica fue realizada en 16 áreas diferentes del tejido cervical (solamente epitelio) de cada ratón (6 ratones/ grupo experimental). La señal positiva y negativa fue sumada para obtener el total de la señal (100% del conteo). El porcentaje relativo de la señal positiva fue obtenida como: % relativo de la señal positiva= $100 \times (\text{señal positiva}) / \text{total de la señal}$.

7.10 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. 20 µg de las proteínas 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 20mmol/L pH 7.5, NaCl 150 mmol/L). Posteriormente fue incubada toda la noche con cada uno de los siguientes: anticuerpos Oct3/4 (1:500; ab19857, Abcam, USA), Sox2 (1:500; Sc-20088, Santa Cruz, Biotechnology Inc., CA), Nanog (1:500; Sc-134218, Santa Cruz, Biotechnology Inc., CA), Fgf4 (1:500; Sc-1361, Santa Cruz, Biotechnology Inc., CA) y β-actin (Sc-130617, Santa Cruz Biotechnology, USA). Al siguiente día la membrana fue lavada 3 veces por 5 minutos con TBST 1X (Tris-HCl 20mmol/L pH 7.5, NaCl 150 mmol/L y Tween-20 0.5%) e incubada por 1 hora con el anticuerpo

secundario anti-ratón (Sc-205, Santa Cruz Biotechnology, USA) o anti-conejo (Sc-2313, Santa Cruz Biotechnology, USA) o anti-cabra (Sc-2020, Santa Cruz Biotechnology, USA) acoplados a peróxidasa de rábano. La membrana se reveló con Super Signal^R West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Pierce Protein Research Products, Rockford, IL, USA), 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.

7.11 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 ARNm 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 AFECTA LA EXPRESIÓN DE PCNA, P63 Y CK17 EN TEJIDO CERVICAL DEL RATÓN TRANSGÉNICO K14E7

Inicialmente fue evaluada la proliferación y diferenciación del epitelio cervical (Figura 11). El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es una proteína nuclear expresada durante la fase S del ciclo celular y es un marcador importante de proliferación celular (Rong et al., 2013). p63 y citoqueratina (CK17) han sido descritos como marcadores de tejido indiferenciado, particularmente en órganos que contienen epitelio escamoso (cérvix, vagina y piel) (Kurita et al., 2005; Martens et al., 2004). La expresión de PCNA, fue restringida a células de la lámina basal del epitelio escamoso estratificado del cervix de ratones NT (Figura 11A). PCNA fue aumentado en células parabasales del primer tercio del epitelio en ratones NT tratados con 17 β -estradiol (E₂) (Figura 11D), reflejando así la hiperplasia inducida por los estrógenos. En ratones transgénicos sin tratamiento con E₂, las células positivas a PCNA fueron observadas a través de todo el epitelio cervical (Figura 11G), y en tejido tumoral se observó una señal más abundante (ratones transgénicos K14E7 tratados con E₂ durante 6 meses, Figura 11J). El patrón de expresión de p63 fue similar a lo observado a PCNA (Figura 11B, E, H y K). La expresión de CK17 también mostro un patrón muy similar, principalmente en CC (Figura 11C, F, I y L). Estos resultados confirman que la oncoproteína E7 y el E₂ en un grado menor, inducen proliferación e inhiben la diferenciación del epitelio cervical de ratones transgénicos tratados con E₂. La expresión del mRNA de E7 solamente fue detectado en tejido cervical de ratones transgénico K14E7 con o sin tratamiento del E₂ (Figura 11M).

8.2. LA ONCOPROTEÍNA E7 Y EL 17 β -ESTRADIOL INDUCEN LA EXPRESION DE Oct3/4 EN EPITELIO CERVICAL DEL RATÓN TRANSGÉNICO K14E7.

Este trabajo fue enfocado al estudio de Oct3/4; usamos un par de oligonucleótidos específicos para la isoforma de Oct3/4A (Anexo 1 y 2) que fueran

capaces de discriminar la expresión del transcrito del gen de *Oct3/4* (cromosoma 17) de todos los pseudogenes conocidos en el ratón (Chin et al., 2009).

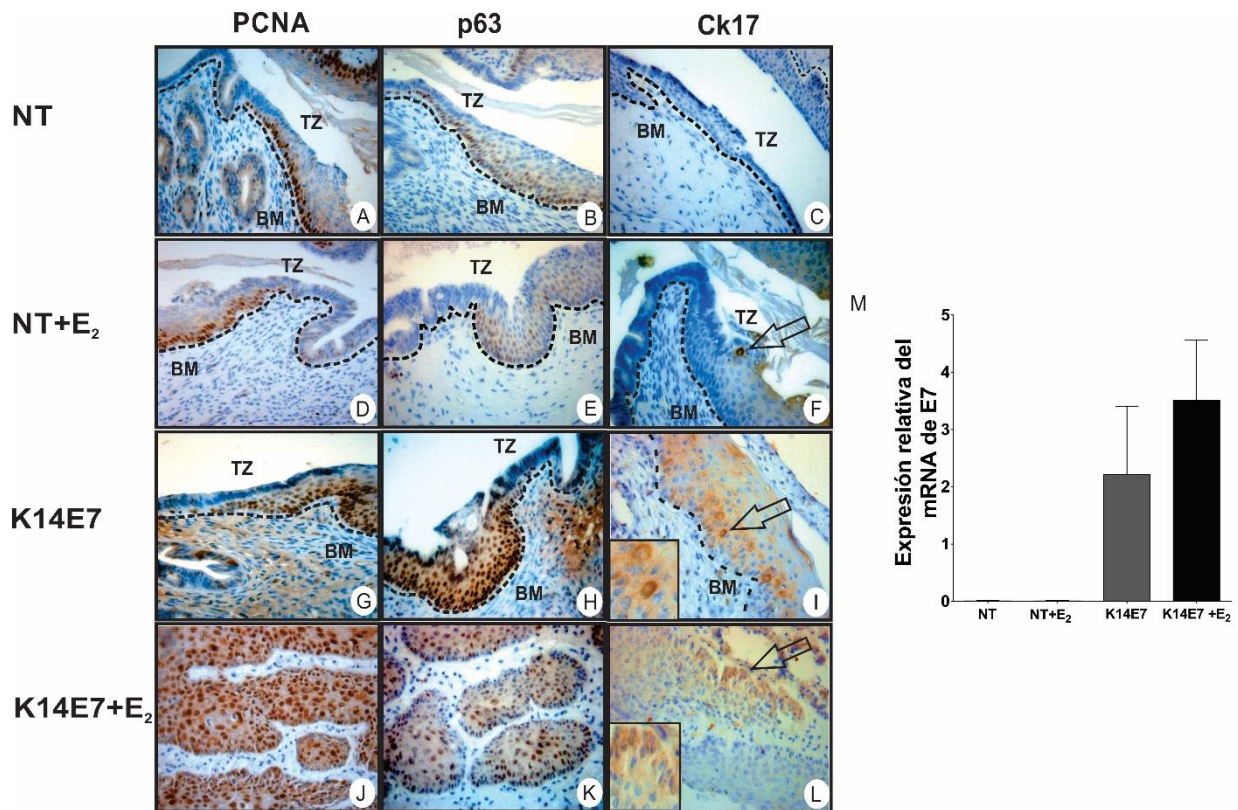


Figura 11. Expresión de PCNA, p63, CK17 y E7 en tejido cervical del ratón transgénico K14E7 VPH16. La inmunohistoquímica para el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), p63 y CK17 (marcadores de células epiteliales escamosas inmaduras cervicales) fue realizada como se describe en Materiales y Métodos. PCNA (A), p63 (B) y CK17 (C) son localizados solo en células parabasales del epitelio escamoso cervical normal del ratón no transgénico (NT). Los niveles de expresión de PCNA (D), p63 (E) y CK17 (F) fueron ligeramente incrementados en el epitelio cervical de ratones no transgénicos tratados con 17 β -estradiol (NT+E₂). En ratones NT+E₂ las células positivas fueron observadas en el primer tercio del epitelio cervical. La expresión de las proteínas correspondientes fueron significativamente incrementadas en tejido cervical del ratón transgénico K14E7 (G-I). Estos marcadores se observan a lo largo de todo el espesor del epitelio de los ratones transgénicos K14E7, lo que indica que la oncoproteína E7 indujo un aumento generalizado de la actividad proliferativa y una inhibición de la diferenciación del epitelio cervical. En ratones transgénicos tratados con 17 β -estradiol (K14E7+E₂), los niveles de expresión de PCNA, p63 y CK17 fueron observados en todo el epitelio escamoso (J-L). Como se esperaba, el mRNA de E7 no fue detectado en tejido cervical de ratones NT y NT+E₂ (M); este mRNA solamente fue detectado en epitelio escamoso cervical de ratones transgénico K14E7 con o sin tratamiento con E₂. N: 6 ratones por grupo. Amplificación: 40X. CK17: citoqueratina 17. E2: 17 β -estradiol.

Fue usado como control positivo de la expresión de Oct3/4 el cDNA de embrión de ratón de 7 días de gestación (Dato no mostrado) y se realizó la amplificación por PCR de un fragmento de aprox. 105 pb del exón 1 del gen de *Oct3/4*, el cual posteriormente fue secuenciado. La secuencia de nucleótidos obtenida de los cDNAs fue idéntica a la secuencia del transcrito del gen de Oct3/4 (NM_013633) y diferente a todos los posibles transcritos derivados de los pseudogenes.

El análisis de RT-qPCR para mRNA en tejido cervical claramente mostró que la expresión del transcrito de Oct3/4 fue significativamente incrementado en ratones transgénicos K14E7+E₂ comparado con ratones NT (Figura 12A). Se observó un aumento de 2.6 ± 0.77 veces [media \pm desviación estándar (SD)] en ratones K14E7+E₂ comparado con ratones NT ($p= 0.029$). En ratones transgénicos K14E7 sin tratamiento con E₂, los niveles de expresión de Oct3/4 también fueron significativamente incrementados, observándose un aumento de 2.4 ± 0.18 veces comparado a ratones NT ($p= 0.027$). En ratones NT tratado con E₂ (NT+E₂) los niveles de expresión del mRNA de Oct3/4 fueron también incrementados por el tratamiento con E₂, pero este incremento no fue estadísticamente significativo ($p= 0.200$; Figura 12A).

Asimismo se determinaron los niveles de proteína de Oct3/4 en tejido epitelial derivado de ratones NT y transgénicos K14E7 (6 ratones por grupo). Como se muestra en la Figura 12B, la proteína de Oct3/4 fue altamente expresada en tejido cervical de ratones transgénicos K14E7 con o sin tratamiento con E₂. La proteína de Oct3/4 fue aumentada 2.93 ± 0.21 (media \pm SD) veces en tejido cervical de ratones K14E7+E₂ comparado con los ratones NT ($p < 0.001$). En tejido de ratones K14E7 sin tratamiento con E₂, los niveles de expresión de Oct3/4 fueron aumentados en 2.31 ± 0.29 veces comparado con los ratones NT ($p= 0.001$), la proteína de Oct3/4 también fue detectada en tejido cervical normal de ratones NT, observándose un aumento de 2.56 ± 0.46 veces ($p= 0.006$) los niveles de Oct3/4 por el tratamiento con E₂ en ratones NT+E₂. El coeficiente de correlación de Pearson's fue utilizado para explorar la correlación entre los niveles de expresión del mRNA y proteína en tejido cervical de ratones

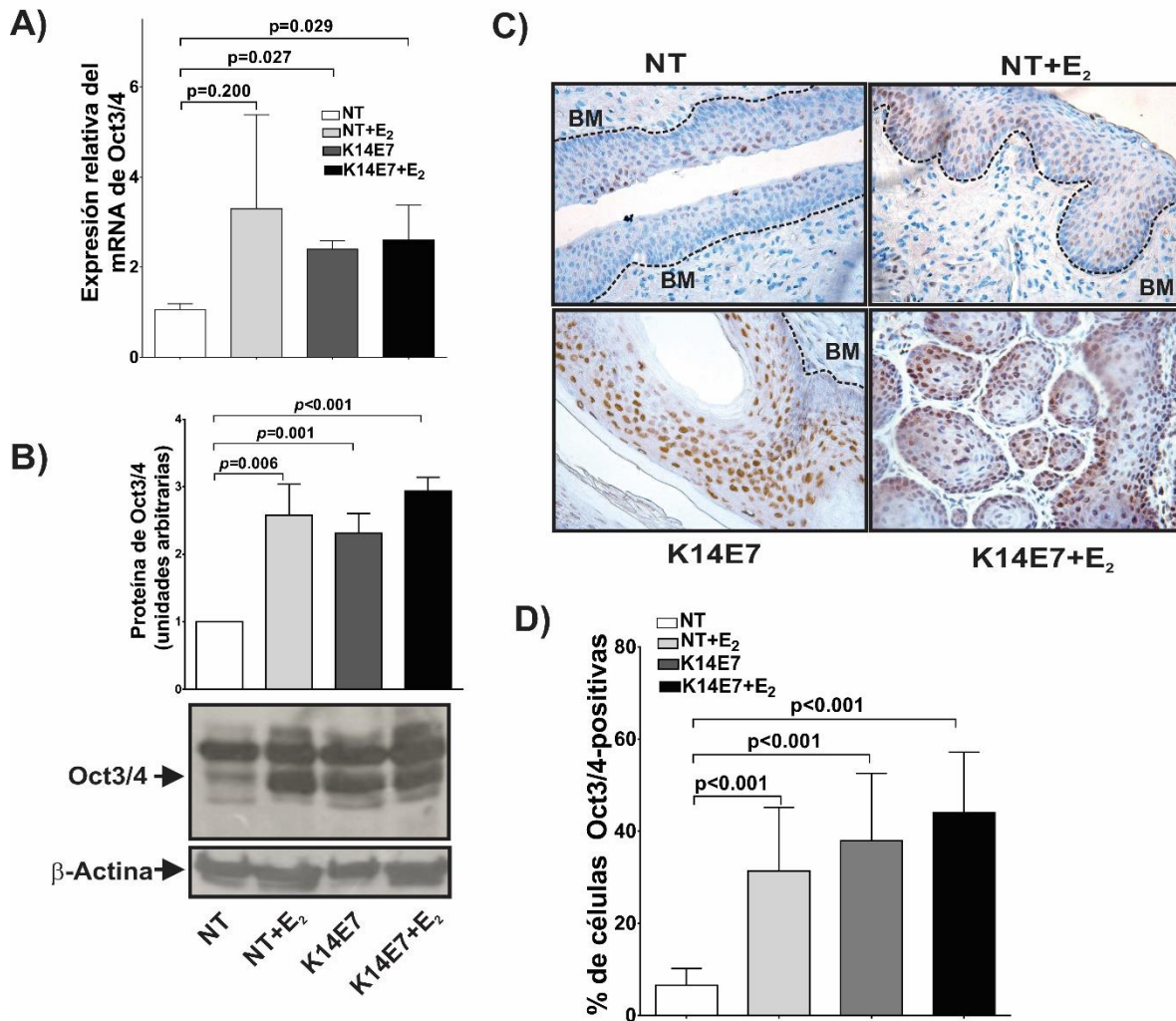


Figura 12. Niveles de expresión del mRNA y proteína de Oct3/4 en tejido cervical de ratones transgénicos K14E7 de 7 meses de edad tratados con E₂. (A) El análisis de RT-qPCR en tiempo real fue realizado para determinar los niveles de expresión del mRNA de Oct3/4. (B) Análisis de Western blot y densitometría semicuantitativa de la proteína de Oct3/4. (C) La Inmunohistoquímica (IHC) para la detección de Oct3/4 se realizó en tejido cervical de ratones NT y transgénicos K14E7 con y sin tratamiento con E₂, como se describe en Materiales y Métodos. (C) Bajos niveles de la proteína de Oct3/4 fueron detectados en epitelio escamoso cervical de ratones NT. La expresión de Oct3/4 fue ligeramente incrementada en tejido cervical de ratones NT+E₂. Comparado con ratones NT (A-D). La expresión de Oct3/4 fue significativamente incrementada por la oncoproteína E7 en epitelio escamoso cervical de ratones transgénicos K14E7 (A-D). (C y D) Células positivas a Oct3/4 fueron observadas en todo el epitelio de ratones transgénicos K14E7 tratados con E₂. Los resultados indican que tanto la oncoproteína E7 como los E₂ incrementan el número de células stem-like. Los experimentos de RT-qPCR fueron realizados por triplicado y los valores son expresados como medias \pm desviaciones estándar (SD) (normalizados a la expresión de HPRT). La prueba *t* fue utilizada para comparar las diferencias entre los niveles de expresión de Oct3/4 en ratones NT y ratones NT+E₂, K14E7 y K14E7+E₂. Los análisis de RT-qPCR, IHC y western blot fueron realizados en 6 ratones por grupo. NT: no transgénico, E₂: 17 β -estradiol.

(*K14E7+E2*: $r= 0.973$, $p= 0.026$; *K14E7*: $r= 0.978$, $p= 0.021$; *NT+E2*: $r= 0.964$, $p= 0.036$). Por otro lado nosotros no observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión del mRNA y proteína de Oct3/4 en ratones *NT+E2* comparado con los ratones *K14E7* (mRNA: $p= 0.343$, proteína: $p= 0.853$), lo cual sugiere que la expresión de Oct3/4 es similar en este grupo de ratones, pero totalmente diferente al grupo de ratones *NT* (Figura 12A y 12B).

Además, fue examinada la expresión y localización subcelular de la proteína de Oct3/4 en el epitelio escamoso cervical embebido en parafina de todos los grupos de ratones (6 ratones por grupo). La expresión de Oct3/4 fue localizada principalmente en el núcleo de la célula. En tejido cervical de ratones transgénicos *K14E7* se observó un incremento en la señal así como en el número de células positivas a Oct3/4 independiente del tratamiento con E_2 (Figura 12C). Así mismo, como se muestra en la figura 12D, el número de células positivas a Oct3/4 fue incrementado en tejido cervical de ratones *NT* y *K14E7* después del tratamiento con E_2 .

En cáncer cervical (ratones *K14E7+E2*), fue observado que el 44% de las células fueron positivas para Oct3/4, mientras que en tejido de ratones *K14E7* sin E_2 fue observado que el 37% de las células fueron positivas para Oct3/4 y en tejido de ratones *NT+E2* el 31% de las células fueron positivas. Sin embargo, el aumento en el porcentaje de células positivas observado en ratones *NT+E2* no fue estadísticamente significativo comparado a lo observado en ratones *K14E7* ($P= 0.083$), lo cual sugiere que el efecto individual de los E_2 y de la oncoproteína *E7* sobre la expresión de Oct3/4 puede ser muy similar en estos ratones, pero completamente diferente cuando se compara a lo observado en tejido cervical de ratones *NT* sin tratamiento con E_2 (Figura 12C y 12D), lo que indica que las células tumorales son heterogéneas en términos de la expresión de Oct3/4. En conjunto, estos datos sugieren que la oncoproteína *E7* conduce un incremento de la expresión de Oct3/4 en tejido cervical; sin embargo, como se observa en la figura 12A y 12B, los E_2 también de alguna manera están involucrados en la inducción de la expresión de Oct3/4 en tejido cervical de ratones *NT*.

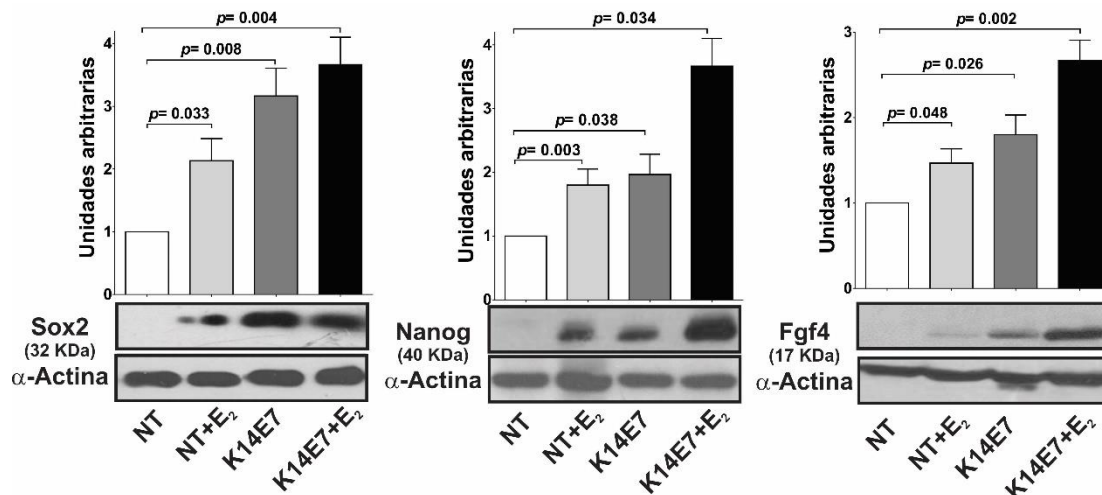


Figura 13. Niveles de expresión de la proteína de Sox2, Nanog y Fgf4 en tejido cervical de ratones transgénicos K14E7 de 7 meses de edad tratados con E₂. (A) El Análisis de Western blot y densitometría semicuantitativa de la proteína de Sox2, Nanog y Fgf4. La expresión de Sox2, Nanog y Fgf4 fue significativamente incrementada por la oncoproteína E7 en epitelio escamoso cervical de ratones transgénicos K14E7. La prueba de Mann-Whitney fue utilizada para determinar las diferencias de los niveles de proteína. El análisis de Western blot fue realizado en 6 ratones por grupo y los niveles de expresión fueron normalizados a los niveles de b-actina. NT: no transgénico, E₂: 17β-estradiol.

8.3. AUMENTO EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA TRONCALIDAD CELULAR SON OBSERVADOS EN EPITELIO ESCAMOSO CERVICAL DEL RATÓN K14E7.

Varios estudios han reportado que la proteína Oct3/4 tiene como genes blanco a Sox2, Nanog y Fgf4 (Dailey et al., 1994; Ng and Surani, 2011; Sharov et al., 2008), los cuales son factores muy importantes en la autorenovación celular de las células troncales cancerosas (CSCs, por sus siglas en inglés) (López et al., 2012; Organista-Nava et al., 2014). Para evaluar la posible activación de los genes *Sox2*, *Nanog* y *Fgf4* en tejido cervical de ratones K14E7, fue realizado un análisis de Western blot y se observó que la expresión de las proteínas codificadas por estos genes fueron aumentadas (6 ratones por grupo, Figura 13) en tejido tumoral cervical (ratones K14E7+E₂, barras negras).

El promedio de expresión de Sox2 fue 6.67 ± 0.44 (media \pm SD) veces más alto en ratones K14E7+E₂ que en ratones NT ($P=0.004$). Asimismo fue encontrado que los niveles de expresión de Nanog fueron significativamente aumentados

($P=0.034$), con un promedio de 3.70 ± 0.43 veces. La expresión de *Fgf4* fue también aumentada en tejido cervical de ratones K14E7+E₂, con un promedio de 2.67 ± 0.24 ($P=0.002$). Se observó que los niveles de proteína de Sox2 (3.12 -veces ± 0.41 , $P=0.008$), Nanog (1.97 -veces ± 0.32 , $P=0.038$) y *Fgf4* (1.80 -veces ± 0.23 , $P=0.026$) fueron significativamente aumentados en tejido cervical de ratones K14E7 sin tratamiento con E₂. Por otro lado, en tejido cervical de ratones NT, el tratamiento con E₂ condujo ligeramente a un incremento de los niveles de Sox2, Nanog y *Fgf4* (2.13 -veces, 1.80 -veces y 1.45 -veces), Figura 13.

8.4. LA ONCOPROTEINA E7 TAMBIEN INCREMENTA LOS NIVELES DE OCT3/4 EN QUERATINOCITOS PRIMARIOS HUMANOS Y EN CELULAS SAOS-2

Para corroborar el efecto de la oncoproteína E7 del VPH16 sobre la expresión del gen *Oct3/4*, fueron utilizados queratinocitos primarios humanos (PHK, por sus siglas en inglés "Primary human keratinocytes") y células Saos-2 que constitutivamente expresan la oncoproteína E7. En este estudio se usó un par de oligonucleótidos que permiten discriminar la expresión del gen de *Oct3/4* (presente en el cromosoma 6 en humano) de aquellas isoformas y pseudogenes conocidos (Anexo 1 y Anexo 3). Como control positivo de expresión de *Oct3/4* fue utilizado cDNA obtenido de células teratocarcinoma (NTERA, dato no mostrado). El análisis de PCR amplificó un fragmento de aprox. 87 pb del exón 1a del gen de *Oct3/4* (Anexo 1 y Anexo 3). Como se muestra en la Figura 14A, las células transfectadas con E7 presentaron niveles significativamente altos de *Oct3/4* ($P>0.05$); el promedio de expresión del mRNA de *Oct3/4* fue de 25.50 y 1.96-veces más alto, respectivamente, que las células control (vector vacío).

Para determinar si la proteína de *Oct3/4* es expresada en células transfectadas con el oncogén E7, se realizó un análisis de Western blot, utilizando proteínas totales del mismo grupo de células transfectadas.

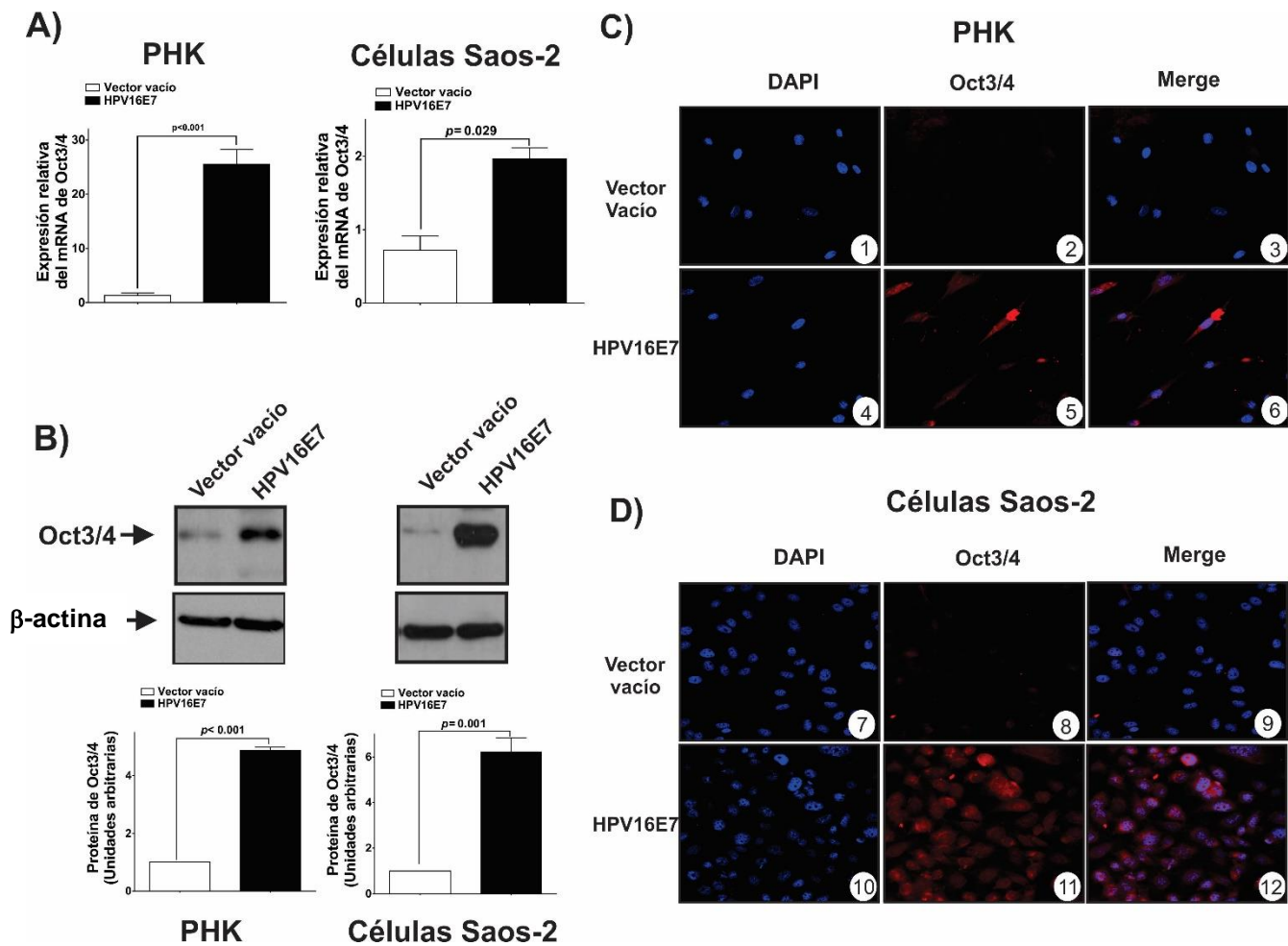


Figura 14. La oncoproteína E7 del PHV16 incrementa los niveles del mRNA y proteína de Oct3/4 en queratinocitos normales humanos. (A) Se realizó un análisis de RT-PCR en tiempo real para determinar los niveles de expresión del mRNA de Oct3/4 en queratinocitos primarios humanos (PHK, por sus siglas en inglés, "primary human keratinocytes") y en la línea celular Saos-2, los cuales fueron transfectadas establemente con el oncogén E7 del VPH16. Todos los experimentos de RT-PCR fueron realizados en tres diferentes cultivos independientes, los valores de expresión son mostrados como media \pm desviación estándar (normalizado a la expresión de β 2M). (B) el análisis de Western blot y densitometría semicuantitativa de la proteína de Oct3/4 en PHK y en células Saos-2. Todos los experimentos de Western blot fueron realizados en tres diferentes cultivos independientes y los niveles de expresión fueron normalizados a la expresión de β -actina. (C y D) Análisis de inmunofluorescencia de Oct3/4 en PHK y células Saos-2 las cuales expresaron establemente la oncoproteína E7. Utilizando un anticuerpo anti-Oct3/4 se muestra en color rojo la proteína de Oct3/4, los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Los paneles 1, 4, 7 y 10 muestran los núcleos de las células teñidos con DAPI, los panel 2, 5, 8 y 11 muestran las células positivas a Oct3/4. Los paneles 3, 6, 9 y 12 son el superposición o merge. Todos los experimentos de inmunofluorescencia fueron realizados en tres diferentes cultivos independientes. El test de Mann-Whitney fue utilizado para determinar las diferencias en los niveles de expresión del mRNA y proteína. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Como se observa en la Figura 14B, la proteína de Oct3/4 fue significativamente incrementada en células que expresaron la oncoproteína E7 ($P < 0.05$). El promedio de expresión de la proteína de Oct3/4 fue aproximadamente 4- (PHK) y 6-veces (células Saos-2) más alto que las células control (vector vacío). Por otro lado, fue examinada la expresión y localización subcelular de Oct3/4 en células transfectadas con el oncogén E7. En la Figura 14C y 14D se muestra que la proteína de Oct3/4 fue localizada principalmente en el núcleo de aquellas células que expresan la oncoproteína E7 del VPH16 (PHK+E7 y Saos-2+E7).

8.5. INCREMENTO EN LOS NIVELES DE EXPRESION DE SOX2, NANOG Y FGF4 SON OBSERVADOS EN CÉLULAS QUE EXPRESAN LA ONCOPROTEINA E7.

Sox2, Nanog y Fgf4 son factores de transcripción relacionados con la troncalidad celular. Se determinó la expresión de estos factores de transcripción en células que expresan la oncoproteína E7 y células de control (vector vacío). Como se muestra en la Figura 15, el análisis de PCR en tiempo real (Figuras 15A y 15B) y el Western blot (Figuras 15C y 15D), las células que expresan la oncoproteína E7 mostraron un aumento en los niveles del mRNA y de proteína de Sox2 Nanog y Fgf4 en comparación con los encontrados en las células control.

En la Figura 15A y 15B se observa que los PHK y las células Saos-2 transfectadas con E7 expresaron niveles significativamente más altos de Sox2 ($P = 0.022$; PHK y $P = 0.033$; células Saos-2). La expresión promedio del mRNA de Sox2 fue 16.31 (PHK) y 1.75 (Saos-2) veces más alta en comparación con las células de control (vector vacío). Así mismo se observó que los niveles de expresión del mRNA de Nanog fue significativamente mayor ($P = 0.015$; PHK y $P = 0.008$; células Saos-2), con aproximadamente 12 (PHK) y 1.6 veces (Saos-2). La expresión del mRNA de Fgf4 también fue incrementado en células que expresan la oncoproteína E7, con una media de aproximadamente 12.1 (PHK9; $P = 0.003$) y 5.6 veces (Saos-2; $P = 0.001$) comparado a las células control (vector vacío). Del mismo modo, los niveles de proteína de Sox2, Nanog y Fgf4 fueron incrementados significativamente en PHK y en células Saos-2 transfectadas de forma estable con el oncogén E7.

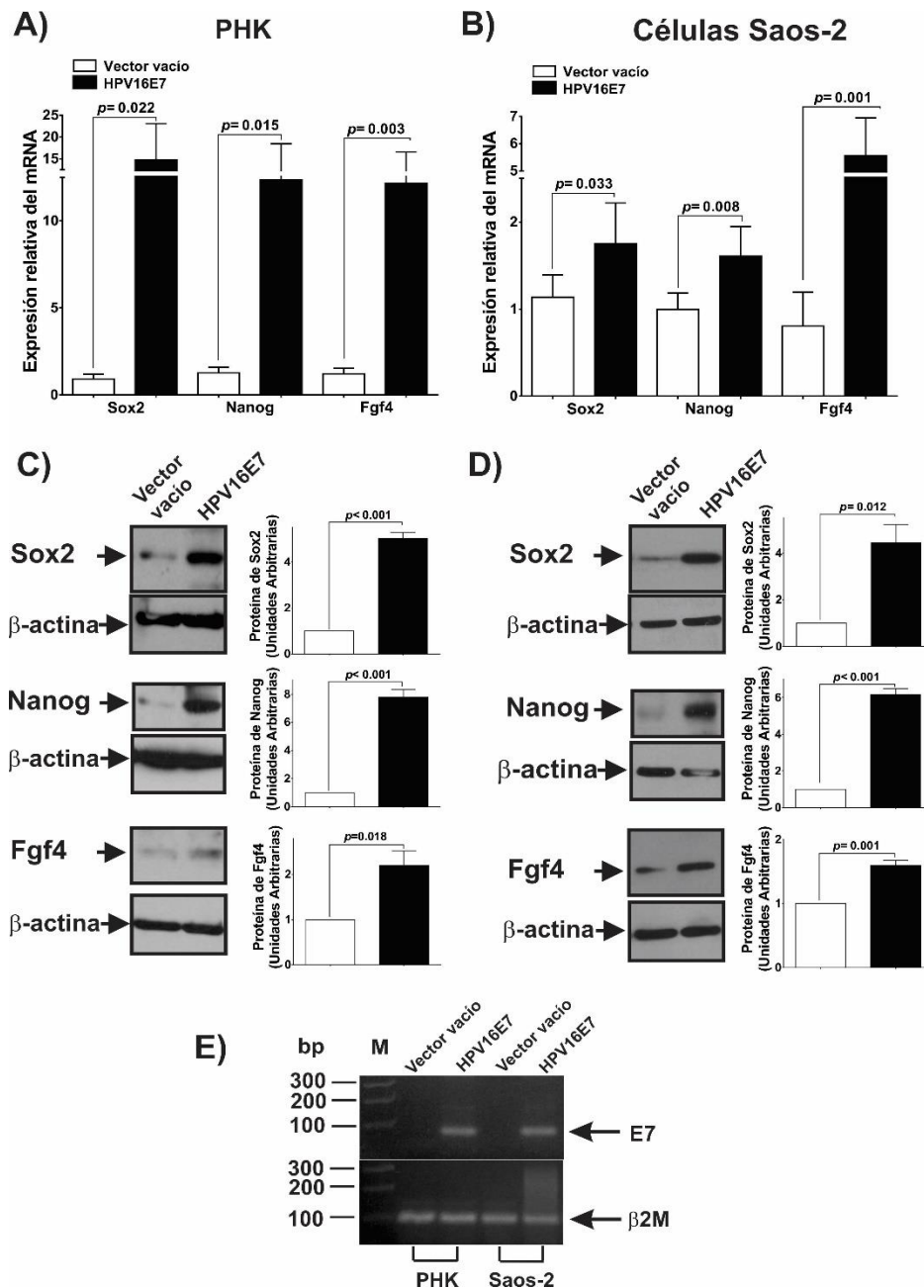


Figura 15. Expresión de Sox2, Nanog y Fgf4 en células que expresan la oncoproteína E7. (A y B) Se realizó un análisis de RT-PCR en tiempo real para determinar los niveles de expresión del mRNA de Sox2, Nanog y Fgf4 en PHK y en células Saos-2. Todos los experimentos de RT-PCR fueron realizados en tres diferentes cultivos independientes, los valores de expresión son mostrados como media \pm desviación estándar (normalizado a la expresión de β 2M). (C y D) el análisis de Western blot y densitometría semicuantitativa de la proteína de Sox2, Nanog y Fgf4 en PHK y en células Saos-2. Todos los experimentos de Western blot fueron realizados en tres diferentes cultivos independientes y los niveles de expresión fueron normalizados a la expresión de β -actina. (E) Expresión del mRNA de E7 en PHK y en células Saos-2 transfectadas establemente con el oncogén E7 del VPH16. Las flechas negras indican la expresión de los mRNA de E7 y β 2M en cultivos celulares en monocapa. El test de t student fue utilizado para determinar las diferencias en los niveles de expresión. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. β -2-microglobulina, PHK: queratinocitos primarios humanos.

El promedio de expresión de proteína de Sox2 fue de aproximadamente 5 (PHK) y 4.4 (Saos-2) veces más en y células que expresan la oncoproteína E7 que en las células control ($P < 0,05$). Los niveles de la proteína de Nanog fueron también altos, los cuales presentaron una media de 7.8 ($P < 0.001$ en PHK) y 6.2 ($P < 0,001$ en células Saos-2) veces más. Los niveles de expresión de la proteína de Fgf4 fue de 2.2 ($P < 0.001$ para PHK) y 1.6 veces ($P = 0.001$ para células Saos-2) más en células que expresaron la oncoproteína E7 en comparación con los niveles encontrados en las células control (Figuras 15C y 15D). Expresión del mRNA de E7 de HPV16 sólo fue observada en PHK y células Saos-2 que constitutivamente expresaron la oncoproteína E7 (Figura 15E).

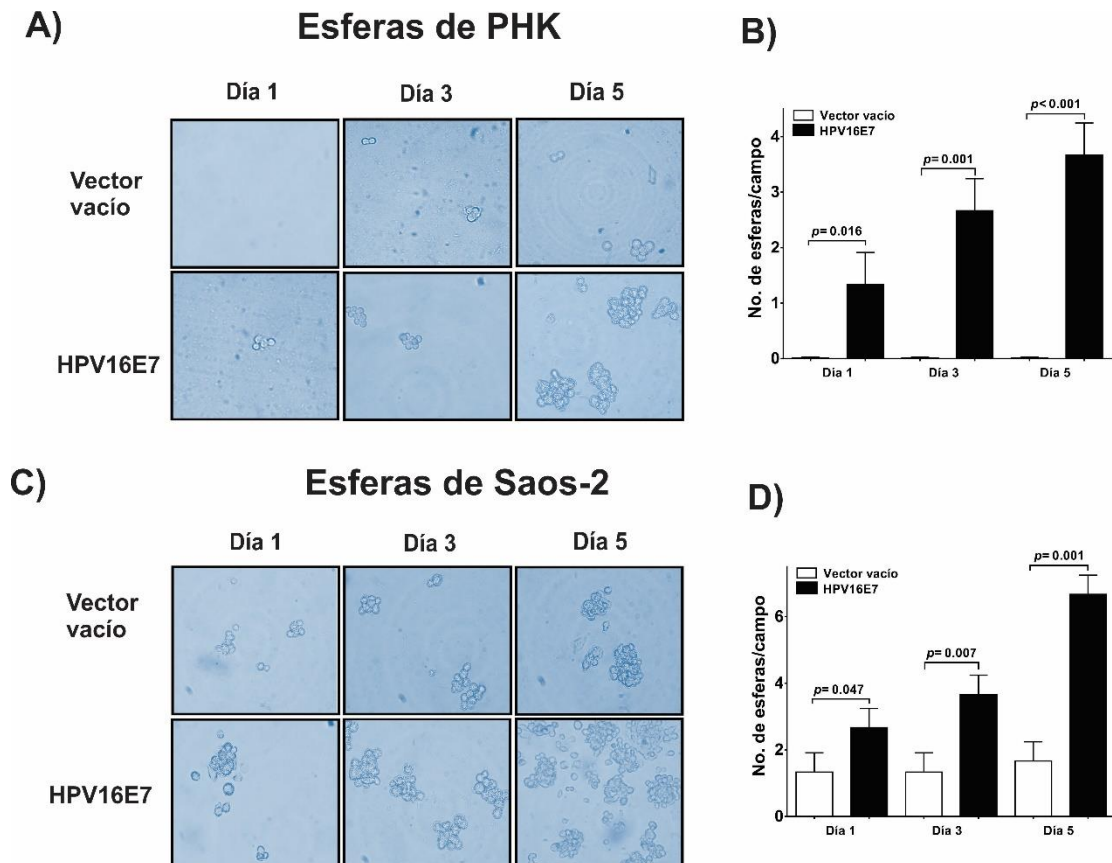


Figura 16. Las células que expresan la oncoproteína E7 del VPH16 presentaron mayor capacidad de auto-renovación. En los paneles A y C se presentan fotografías representativas de las esferas formadas por células que expresan la oncoproteína E7. (B y D) Número de esferas por campo generadas por PHK y células Saos-2 que expresan la oncoproteína E7. Una esfera se definió como un grupo de más de 15 células; se contó el número de esferas después de los días 1, 3, y 5 de cultivo. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos de cultivo independientes. Se utilizó la prueba *t*, y la significación estadística se determinó como $P < 0,05$. PHK: queratinocitos primarios humanos.

8.6. PHK Y CÉLULAS SAOS-2, QUE EXPRESAN LA ONCOPROTEÍNA E7 PRESENTAN UNA MAYOR CAPACIDAD DE AUTO-RENOVACIÓN CELULAR.

Además de su capacidad de formación de tumores, las células troncales cancerosas comparten dos características importantes con células troncales normales: la auto-renovación e inhibición de la diferenciación celular (Liu et al., 2014). El ensayo de formación de esfera es reconocido como un ensayo clásico de auto-renovación celular (Liu et al., 2014).

Para evaluar el papel de la oncoproteína E7 sobre la auto-renovación, fueron establecidas líneas celulares que constitutivamente expresaron la oncoproteína E7. Los PHK y células Saos-2 que expresaron la oncoproteína E7 y células control (vector vacío) fueron cultivadas en medio libre de suero en condiciones óptimas para el crecimiento de tumor-esferas. Cuando los PHK y las células Saos-2 fueron sembradas en un sistema de cultivo no adherente, estas células crecieron como esferas flotantes tridimensionales y se mantuvo su crecimiento durante cinco días. Como se muestra en la Figura 16, las células que expresan la oncoproteína E7 y células de control generaron las esferas clásicas (Figuras 16A y 16C). Sin embargo, las células que expresan la oncoproteína E7 formaron más esferas en cada cultivo comparado a lo observado en las células control ($P < 0.05$). En particular, en el día 5 los PHK y las células Saos-2 que expresan E7 presentaron aproximadamente 3.6- (PHK) y 6.6 (Saos-2) veces más aumento en el número de esferas formadas (Figuras 16B y 16D). En conjunto, estos datos sugieren fuertemente que la oncoproteína E7 del VPH16 tiene un papel importante en el aumento de la actividad de auto-renovación de las células cancerosas.

8.7. LAS ESFERAS QUE EXPRESAN LA ONCOPROTEÍNA E7 PRESENTAN ALTOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL MRNA DE OCT3/4, SOX2, NANOG Y FGF4.

Determinamos los niveles de expresión del mRNA de Oct3/4 y genes relacionados con la troncalidad celular (Sox2, Nanog y Fgf4) en esferas que expresan la oncoproteína E7 (PHK y células Saos-2; Figura 17). El análisis cuantitativo de PCR en tiempo real reveló que las esferas que expresan la

oncoproteína E7 presentaron significativamente altos niveles del mRNA de Oct3/4 [media; 1.9 veces ($P = 0.001$) para PHK y 2.52 veces para células Saos-2 ($P = 0.031$)] en comparación con las esferas control (vector vacío, Figura 17).

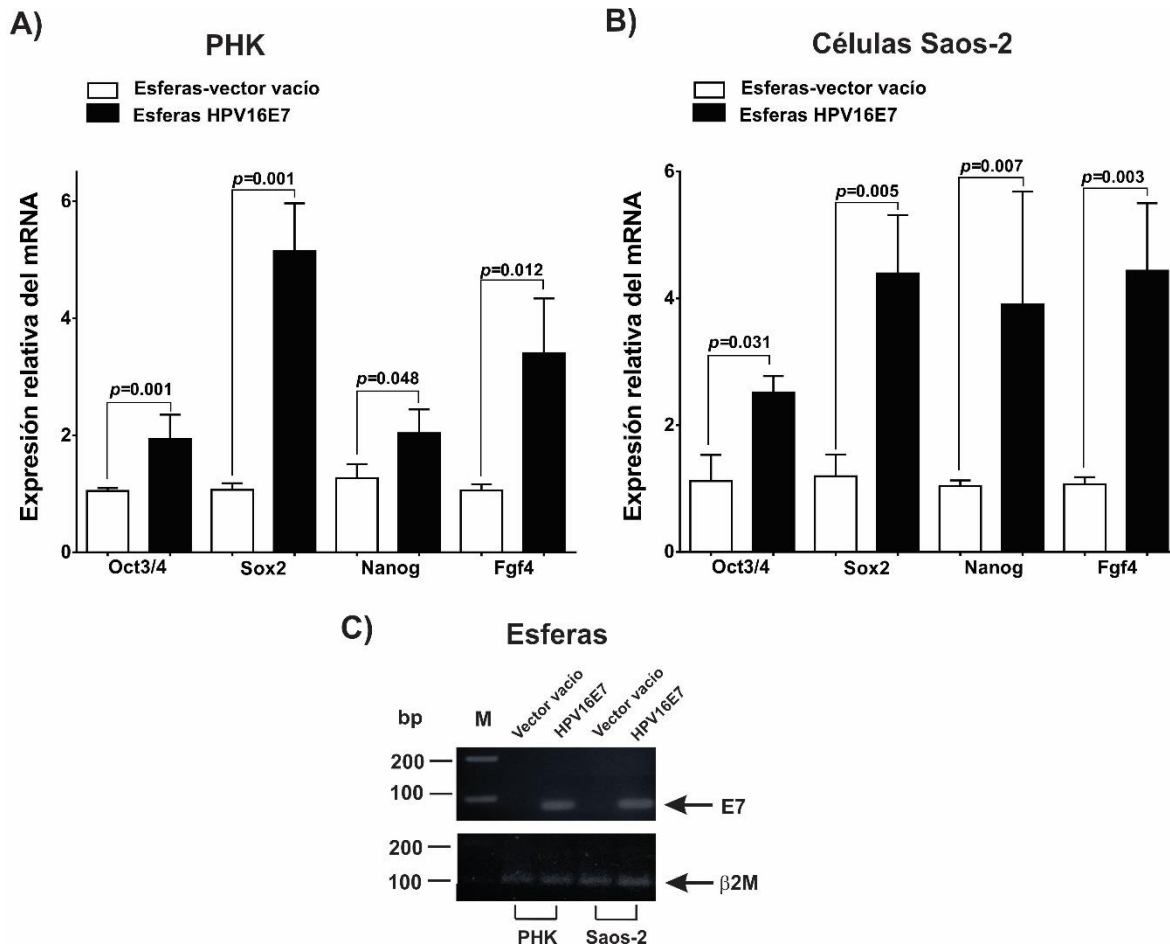


Figura 17. La oncoproteína E7 del VPH16 induce un aumento de la expresión de Oct3/4, Sox2, Nanog y Fgf4 en esferas. (A y B) Se realizó un análisis de RT-PCR en tiempo real para determinar los niveles de expresión del mRNA de Oct3/4, Sox2, Nanog y Fgf4. Todos los experimentos de RT-PCR fueron realizados en tres diferentes cultivos independientes, los valores de expresión son mostrados como media \pm desviación estándar (normalizado a la expresión de β 2M). El análisis se realizó para las esferas formadas de PHK y células Saos-2 que expresaron establemente el oncogén E7 del VPH16 E7. (C) Expresión del mRNA de E7 en PHK y en células Saos-2 que expresaron establemente el oncogén E7 del VPH16. Las flechas negras indican la expresión de los mRNA de E7 y β 2M en cultivos celulares de esferas. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. β -2-microglobulina, PHK: queratinocitos primarios humanos.

Los niveles del mRNA de los marcadores de troncalidad (Sox2, Nanog y Fgf4) fueron incrementados en las esferas que expresan la oncoproteína E7. La expresión

del mRNA de Sox2 incrementó (aproximadamente 5 veces en PHK y 4 veces en células Saos-2) en las células que expresan la oncoproteína E7 en comparación con las células de control ($P < 0.05$). Mientras que los niveles del mRNA de Nanog mRNA también fueron incrementados, con un aumento de aproximadamente 2 y 4 veces en los PHK y células Saos-2, respectivamente. Asimismo los niveles del mRNA de Fgf4 presentaron un aumento de 3.4- y 4.4 veces en PHK y en células Saos-2 que expresan la oncoproteína E7, respectivamente, en comparación con las células control ($P < 0,05$; Figuras 17A y 17B), lo cual verifica la firma de troncalidad de las esferas que expresan la oncoproteína E7 del VPH16 (Figura 16). Estos datos sugieren que la oncoproteína E7 del VPH16 juega un papel importante en el aumento de la expresión de Oct3/4 y de genes relacionados con la troncalidad celular (Sox2, Nanog y Fgf4) y en la capacidad de auto-renovación celular.

IX. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue investigar el efecto de la oncoproteína E7 de VPH16 y de los estrógenos (E_2) en la regulación de la expresión de Oct3/4, Sox2, Nanog y Fgf4 utilizando un modelo murino (K14E7) de carcinogénesis cervical. Además, utilizando líneas celulares que expresan la oncoproteína E7 del VPH16 [queratinocitos primarios humanos (PHK) y células Saos-2 transfectadas], se determinó si E7 está involucrado en el proceso de la auto-renovación celular. Fue observado un aumento de la expresión de Oct3/4 *in vivo* e *in vitro*, lo cual sugiere que E_2 o la oncoproteína E7 están involucrados en la sobreexpresión de este importante factor. Estos resultados son consistentes con reportes previos que demostraron que la oncoproteína E7 y E_2 inducen la expresión de Oct3/4 en fibroblastos de ratón y células troncales embrionarias (Brehm et al., 1999b; Jung et al., 2010). También observamos que la oncoproteína E7 del PVH16 está implicada en el proceso de auto-renovación celular.

En el modelo K14E7 fue observado que sólo la expresión de la oncoproteína E7 fue suficiente para inducir hiperproliferación en la zona de transformación y en el epitelio escamoso cervical, así como también se detectó inhibición de la diferenciación del epitelio cervical, los cuales son dos procesos necesarios en la

progresión carcinogénica, similar a lo observado por Riley et al. (2003). La hiperproliferación pudiera ser explicada por la habilidad de E7 para unirse e inactivar múltiples reguladores del ciclo celular (las proteínas de “pocket”, tales como: pRb, p107 y p130 e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, como p21 y p27)(Balsitis et al., 2005; Münger et al., 2001). Los ratones K14E7 tratados con E₂ durante seis meses eventualmente desarrollaron carcinoma de células escamosas (SCC) (Riley et al., 2003). Nuestros datos sugieren que la oncoproteína E7 complementa y amplifica el estímulo de los E₂, lo cual conduce al desarrollo de SCC cervical.

Por otro lado, para evaluar el estado de diferenciación de las células con proliferación aberrante en el modelo K14E7, se analizó la expresión de Ck17 y p63 (los cuales son marcadores de células epiteliales pobremente diferenciadas). Reportes previos han mostrado que estas proteínas se expresan en las células basales, células de reserva, células troncales y en células de metaplasia inmadura (Selvi et al., 2013). Así mismo ha sido reportado un incremento de la expresión de Ck17 y p63 acompañada del aumento en el grado de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN)(Selvi et al., 2013). En nuestro modelo murino K14E7 fue observado que en tejido cervical la proteína de p63 fue altamente expresada en presencia de la oncoproteína E7 del VPH16. Este patrón de expresión de p63 es comparable a lo observado en humanos con neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (Martens et al., 2004; Selvi et al., 2013). Una explicación para la sobreexpresión de p63 podría estar relacionada con la inhibición de expresión de miR-203 inducida por la oncoproteína E7 (Melar-New and Laimins, 2010), lo cual conduce tanto a la sobreexpresión de p63 como al bloqueo de la diferenciación celular (Gómez-Gómez et al., 2013; Melar-New and Laimins, 2010). Asimismo, se observó que la oncoproteína E7 del VPH16 en conjunto con los E₂ aumentan significativamente los niveles de expresión de la proteína de Ck17 en tumores cervicales, lo cual es muy similar a lo observado en mujeres con cáncer cervical (Ikeda et al., 2008; Selvi et al., 2013). Debido a que nuestros resultados sugieren que la oncoproteína E7 del VPH16 aumenta la expresión de Ck17 y p63 conduciendo al bloqueo de la diferenciación del epitelio escamoso cervical, hipotetizamos que dentro de esta

población de células indiferenciadas pudiera estar siendo expresado Oct3/4. Los resultados obtenidos revelaron que la oncoproteína E7 del VPH16 induce la expresión nuclear de Oct3/4 en los tumores cervicales y que los E₂ también están implicados en la sobreexpresión de este importante factor transcripcional. Por otro lado, observamos que aproximadamente el 5% de las células basales del epitelio cervical normal fueron positivas para la expresión de Oct3/4. Estas células pudieran constituir las células troncales del epitelio cervical normal, de acuerdo a lo sugerido por Smedts et al. (1992) y Peters (1986). Sin embargo, el ratón K14E7 de 7 meses de edad, este porcentaje aumenta a 37.93% y en presencia de E₂ a 44.07%.

La oncoproteína E7 puede interactuar con una gran variedad de proteínas celulares que juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación celular (Avvakumov et al., 2003; Bernat et al., 2003; Münger et al., 2001). En particular, la oncoproteína E7 también forma complejos con Oct3/4 y Sp1 *in vitro* (Brehm et al., 1999b; Peralta-Zaragoza et al., 2006; Yang et al., 2005), lo cual pudiera alterar la transcripción del gen *Oct3/4* por unión directa a su región promotora, particularmente después del tratamiento E₂. El efecto observado por los E₂ es probablemente debido al complejo formado entre ER α y Sp1, lo que pudiera afectar directa o indirectamente la expresión de Oct3/4 (Ovitt and Schöler, 1998; Yang et al., 2005). Por lo tanto, cuando el complejo ER α -Sp1 se une a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) de sus genes blanco, incluido al gen de *Oct3/4*, la proteína p300 es reclutada al complejo ER α -Sp1, la cual induce la acetilación de histonas y la activación de genes (Azahri et al., 2012; Shang et al., 2000). Además, se ha reportado que Oct3/4 y E7 pueden unirse a p300 y que E7 puede incrementar la función de transactivación mediada por p300 (Bernat et al., 2003; Göke et al., 2011), lo que pudiera explicar los altos niveles del mRNA y proteína de Oct3/4 observados en tejido cervical de ratones transgénicos K14E7 (44.07% de las células).

Por otro lado, Sox2 Nanog y Fgf4 son otros factores importantes que han sido identificados como marcadores ESCs (Boyer et al., 2005; Kosaka et al., 2009). Así mismo, estos marcadores también son reconocidos como biomarcadores de células troncales cancerosas (CSCs), los cuales juegan un papel importante en el

mantenimiento del comportamiento biológico de las CTCs (Gu et al., 2012; Ji et al., 2014; Ji and Zheng, 2010; Shen et al., 2014; Ye et al., 2008).

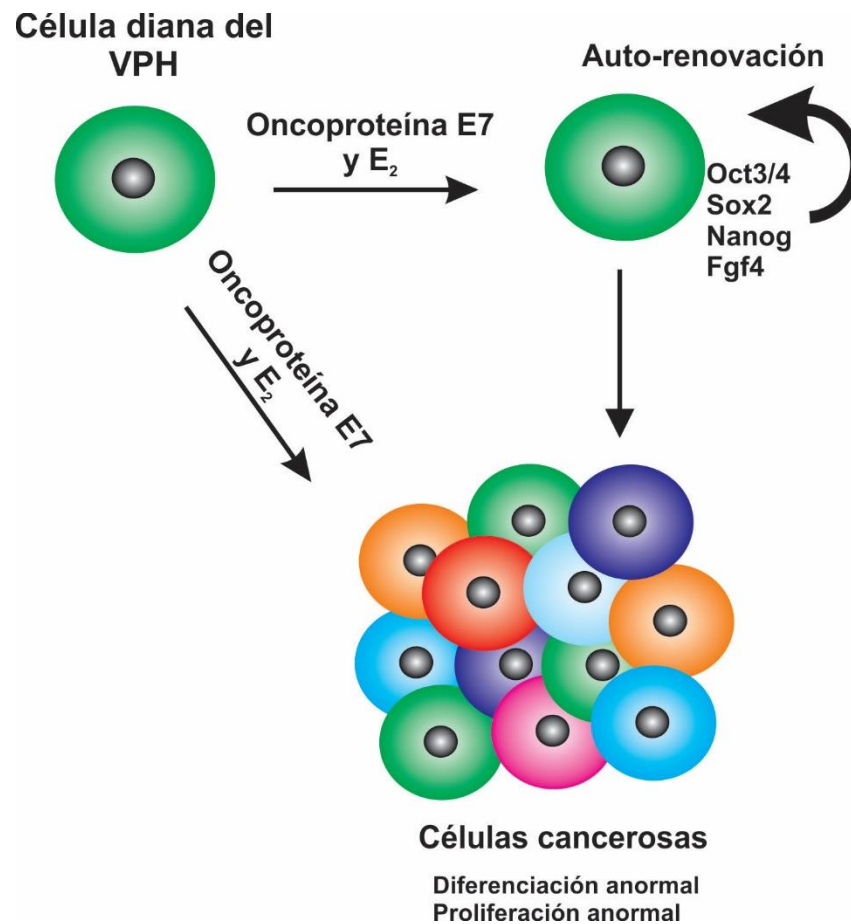


Figura 18. Modelo del posible rol de la oncoproteína E7 del VPH16 en la auto-renovación celular. La oncoproteína E7 del VPH16 induce la expresión de Oct3/4, Sox2, Nanog y Fgf4, lo cual conlleva al aumento de la auto-renovación, proliferación y escape del bloqueo de la diferenciación celular.

En este estudio, fue evaluado si la oncoproteína E7 del VPH16 induce la expresión de Sox2, Nanog y Fgf4 *in vivo* e *in vitro*. Comparado a lo observado en tejido cervical normal de ratones NT, se encontró que los niveles de proteína de estos factores fueron incrementados significativamente en tejido cervical de ratones K14E7 (independientemente del tratamiento con E₂), esto también fue encontrado en queratinocitos primarios humanos (PHK) y en células Saos-2 que expresan constitutivamente al oncogén E7 del VPH16. Estos resultados son consistentes con

lo observado en tejido de carcinoma de células escamosas de cuello uterino y en líneas celulares humanas de cáncer cervical (Gu et al., 2012; Ji et al., 2014; Ji and Zheng, 2010; Shen et al., 2014; Ye et al., 2008). Asimismo, el tratamiento con E₂ también eleva la expresión de Sox2, Nanog y Fgf4 en células cancerosas (Fillmore et al., 2010; Sun et al., 2014). En nuestro estudio fue observado que los E₂ aumentan la expresión de Sox2, Nanog y Fgf4 en tejido cervical del modelo murino K14E7, lo que sugiere que los E₂ están involucrados directa o indirectamente (a través de Oct3/4) (Wang et al., 2013) en la regulación positiva *in vivo* de estos importantes factores.

Estudios previos han demostrado que genes asociados a células troncales, incluyendo Oct3/4, Sox2 y Nanog, son altamente expresado en esferas tumorales de células de cáncer cervical (Alberti et al., 2015; Li et al., 2015; Wang et al., 2013). En nuestro estudio, detectamos altos niveles de expresión de Oct3/4, Sox2, Nanog y Fgf4 en esferas que expresan constitutivamente la oncoproteína E7 (derivadas tanto PHK y las células Saos-2), confirmando que HPV16 E7 es responsable de la sobreexpresión de estos factores.

En conclusión, este estudio proporciona la primera evidencia de la participación de la oncoproteína E7 y de los E₂ en la regulación positiva de la expresión de Oct3/4 y genes relacionados con la troncalidad de la célula (Sox2 Nanog y Fgf4) en cáncer cervical. Como se muestra en la Figura 8, hipotetizamos que la oncoproteína E7 del VPH16 y los E₂ están implicados en la sobreexpresión de Oct3/4, Sox2, Nanog y Fgf4 para mantener la capacidad de auto-renovación de células madre cancerosas en cáncer cervical. Estos hallazgos no sólo proporcionan información sobre la interacción entre la oncoproteína E7 y Oct3/4 en el tejido cervical, sino que también abren nuevas perspectivas relacionadas a las funciones de la oncoproteína E7 y de E₂ en condiciones patológicas, en particular el mecanismo implicado en el bloqueo de la diferenciación celular inducido por la oncoproteína E7.

X. REFERENCIAS

- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F., 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 3983-3988.
- Alberti, L., Losi, L., Leyvraz, S., Benhattar, J., 2015. Different Effects of BORIS/CTCF on Stemness Gene Expression, Sphere Formation and Cell Survival in Epithelial Cancer Stem Cells. *PLoS ONE* 10, e0132977.
- Alonso, L.G., García-Alai, M.M., Nadra, A.D., Lapeña, A.N., Almeida, F.L., Gualfetti, P., Prats-Gay, G.d., 2002. High-risk (HPV16) human papillomavirus E7 oncoprotein is highly stable and extended, with conformational transitions that could explain its multiple cellular binding partners. *Biochemistry* 41, 10510-10518.
- Arce, J.D.-C., Soto, U., Van Riggelen, J., Schwarz, E., Zur Hausen, H., Rösl, F., 2004. Ectopic expression of nonliganded retinoic acid receptor β abrogates AP-1 activity by selective degradation of c-Jun in cervical carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 279, 45408-45416.
- Ardahan, M., 2016. Incidence, Risk Factors, Diagnostic Criteria and Prevention Methods in Cervical Cancer, *Recent Advances in Cervical Cancer, AVID SCIENCE* ed, pp. 1-15.
- Attwooll, C., Denchi, E.L., Helin, K., 2004. The E2F family: specific functions and overlapping interests. *The EMBO Journal* 23, 4709-4716.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., Lovell-Badge, R., 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development* 17, 126-140.
- Avvakumov, N., Torchia, J., Mymryk, J.S., 2003. Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. *Oncogene* 22, 3833-3841.
- Azahri, N.S.M., Di Bartolo, B.A., Khachigian, L.M., Kavurma, M.M., 2012. Sp1, acetylated histone-3 and p300 regulate TRAIL transcription: Mechanisms of PDGF-BB-mediated VSMC proliferation and migration. *Journal of Cellular Biochemistry* 113, 2597-2606.
- Balsitis, S., Dick, F., Lee, D., Farrell, L., Hyde, R.K., Griep, A.E., Dyson, N., Lambert, P.F., 2005. Examination of the pRb-dependent and pRb-independent functions of E7 in vivo. *Journal of Virology* 79, 11392-11402.
- Barnard, P., McMillan, N.A., 1999. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon- α . *Virology* 259, 305-313.
- Baseman, J.G., Koutsky, L.A., 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology* 32, 16-24.
- 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.
- 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.
- Boshoff, C., Weiss, R., 2002. AIDS-related malignancies. *Nature Reviews Cancer* 2, 373-382.
- Bosnali, M., Münst, B., Thier, M., Edenhofer, F., 2009. Deciphering the stem cell machinery as a basis for understanding the molecular mechanism underlying reprogramming. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 3403-3420.
- Bousarghin, L., Touzé, A., Sizaret, P.-Y., Coursaget, P., 2003. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *Journal of Virology* 77, 3846-3850.

- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., Young, R.A., 2005. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 122, 947-956.
- Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., 2006. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349-353.
- Brake, T., Connor, J.P., Petereit, D.G., Lambert, P.F., 2003. Comparative Analysis of Cervical Cancer in Women and in a Human Papillomavirus-Transgenic Mouse Model Identification of Minichromosome Maintenance Protein 7 as an Informative Biomarker for Human Cervical Cancer. *Cancer Research* 63, 8173-8180.
- 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., 1999a. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *The EMBO Journal* 18, 2449-2458.
- Brehm, A., Ohbo, K., Zwerschke, W., Botquin, V., Jansen-Dürr, P., Schöler, H., 1999b. Synergism with germ line transcription factor Oct-4: viral oncoproteins share the ability to mimic a stem cell-specific activity. *Molecular and Cellular Biology* 19, 2635-2643.
- Burgers, W., Blanchon, L., Pradhan, S., De Launoit, Y., Kouzarides, T., Fuks, F., 2007. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene* 26, 1650-1655.
- Clifford, G., Gallus, S., Herrero, R., Munoz, N., Snijders, P., Vaccarella, S., Anh, P., Ferreccio, C., Hieu, N., Matos, E., 2005. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *The Lancet* 366, 991-998.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., Maitland, N.J., 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Research* 65, 10946-10951.
- Crosbie, E.J., Einstein, M.H., Franceschi, S., Kitchener, H.C., 2013. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet* 382, 889-899.
- Chen, L., Daley, G.Q., 2008. Molecular basis of pluripotency. *Human Molecular Genetics* 17, R23-R27.
- Chew, J.-L., Loh, Y.-H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W.-L., Yeap, L.-S., Li, P., Ang, Y.-S., Lim, B., Robson, P., 2005. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology* 25, 6031-6046.
- Chin, J.-H., Shiwaku, H., Goda, O., Komuro, A., Okazawa, H., 2009. Neural stem cells express Oct-3/4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388, 247-251.
- Chung, S.-H., Franceschi, S., Lambert, P.F., 2010. Estrogen and ER α : Culprits in cervical cancer? *Trends in Endocrinology & 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.
- Dailey, L., Yuan, H., Basilico, C., 1994. Interaction between a novel F9-specific factor and octamer-binding proteins is required for cell-type-restricted activity of the fibroblast growth factor 4 enhancer. *Molecular and Cellular Biology* 14, 7758-7769.

- Dalerba, P., Cho, R.W., Clarke, M.F., 2007. Cancer stem cells: models and concepts. *Annual Review of Medicine* 58, 267-284.
- Del Vecchio, A.M., Romanczuk, H., Howley, P.M., Baker, C.C., 1992. Transient replication of human papillomavirus DNAs. *Journal of Virology* 66, 5949-5958.
- 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.
- Deroo, B.J., Korach, K.S., 2006. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation* 116, 561-570.
- 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.
- 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.
- Dyson, N., Guida, P., McCall, C., Harlow, E., 1992. Adenovirus E1A makes two distinct contacts with the retinoblastoma protein. *Journal of Virology* 66, 4606-4611.
- Elson, D.A., Riley, R.R., Lacey, A., Thordarson, G., Talamantes, F.J., Arbeit, J.M., 2000. Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer Research* 60, 1267-1275.
- Feng, D., Peng, C., Li, C., Zhou, Y., Li, M., Ling, B., Wei, H., Tian, Z., 2009. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncology Reports* 22, 1129-1134.
- Fillmore, C.M., Gupta, P.B., Rudnick, J.A., Caballero, S., Keller, P.J., Lander, E.S., Kuperwasser, C., 2010. Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 21737-21742.
- Frattoni, M.G., Laimins, L.A., 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 12398-12402.
- Friel, A.M., Sargent, P.A., Patnaude, C., Szotek, P.P., Oliva, E., Scadden, D.T., Seiden, M.V., Foster, R., Rueda, B.R., 2008. Functional analyses of the cancer stem cell-like properties of human endometrial tumor initiating cells. *Cell Cycle* 7, 242-249.
- 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.
- García-Alai, M.M., Alonso, L.G., de Prat-Gay, G., 2007. The N-terminal module of HPV16 E7 is an intrinsically disordered domain that confers conformational and recognition plasticity to the oncoprotein. *Biochemistry* 46, 10405-10412.
- Gariglio, P., Organista-Nava, J., Alvarez-Rios, E., 2016. Role of HR-HPVs E6 and E7 Oncoproteins in Cervical Carcinogenesis. *Journal of Molecular and Genetic Medicine* 10, 216.
- Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., Gheit, T., Sylla, B., Tommasino, M., 2009. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 40, 1-13.

- Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R.E., Sapp, M., 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *Journal of Virology* 75, 1565-1570.
- GLOBOCAN, 2012. <http://globocan.iarc.fr/>.
- Göke, J., Jung, M., Behrens, S., Chavez, L., O'Keeffe, S., Timmermann, B., Lehrach, H., Adjaye, J., Vingron, M., 2011. Combinatorial Binding in Human and Mouse Embryonic Stem Cells Identifies Conserved Enhancers Active in Early Embryonic Development. *PLoS Computational Biology* 7, e1002304.
- 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.
- Gu, T.-T., Liu, S.-Y., Zheng, P.-S., 2012. Cytoplasmic NANOG-positive stromal cells promote human cervical cancer progression. *The American Journal of Pathology* 181, 652-661.
- Hagensee, M.E., Yaegashi, N., Galloway, D., 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.
- He, W., Staples, D., Smith, C., Fisher, C., 2003. Direct activation of cyclin-dependent kinase 2 by human papillomavirus E7. *Journal of Virology* 77, 10566-10574.
- Hebner, C.M., Laimins, L.A., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology* 16, 83-97.
- Herfs, M., Vargas, S.O., Yamamoto, Y., Howitt, B.E., Nucci, M.R., Hornick, J.L., McKeon, F.D., Xian, W., Crum, C.P., 2013. A novel blueprint for 'top down' differentiation defines the cervical squamocolumnar junction during development, reproductive life, and neoplasia. *The Journal of Pathology* 229, 460-468.
- Herfs, M., Yamamoto, Y., Laury, A., Wang, X., Nucci, M.R., McLaughlin-Drubin, M.E., Münger, K., Feldman, S., McKeon, F.D., Xian, W., 2012. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 10516-10521.
- Ho, M.M., Ng, A.V., Lam, S., Hung, J.Y., 2007. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Research* 67, 4827-4833.
- Holmgren, S.C., Patterson, N.A., Ozbun, M.A., Lambert, P.F., 2005. The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. *Journal of Virology* 79, 3938-3948.
- Hou, T., Zhang, W., Tong, C., Kazobinka, G., Huang, X., Huang, Y., Zhang, Y., 2015. Putative stem cell markers in cervical squamous cell carcinoma are correlated with poor clinical outcome. *BMC Cancer* 15, 785.
- 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.
- Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, J.-Y., Libermann, T.A., Jin, J., Harper, J.W., Munger, K., 2007. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *Journal of Virology* 81, 9737-9747.
- Husain, R.S.A., Ramakrishnan, V., 2015. Global Variation of Human Papillomavirus Genotypes and Selected Genes Involved in Cervical Malignancies. *Annals of Global Health* 81, 675-683.

- 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.
- Ikeda, K., Tate, G., Suzuki, T., Mitsuya, T., 2008. Coordinate expression of cytokeratin 8 and cytokeratin 17 immunohistochemical staining in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma: an immunohistochemical analysis and review of the literature. *Gynecologic Oncology* 108, 598-602.
- 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.
- Ivanova, N.B., Dimos, J.T., Schaniel, C., Hackney, J.A., Moore, K.A., Lemischka, I.R., 2002. A Stem Cell Molecular Signature. *Science* 298, 601-604.
- Ji, J., Wei, X., Wang, Y., 2014. Embryonic stem cell markers Sox-2 and OCT4 expression and their correlation with WNT signal pathway in cervical squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7, 2470-2476.
- Ji, J., Zheng, P.-S., 2010. Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis. *Human Pathology* 41, 1438-1447.
- Jung, E.-M., Choi, K.-C., Yu, F.H., Jeung, E.-B., 2010. Effects of 17 β -estradiol and xenoestrogens on mouse embryonic stem cells. *Toxicology in Vitro* 24, 1538-1545.
- Jung, J.-W., Park, S.-B., Lee, S.-J., Seo, M.-S., Trosko, J.E., Kang, K.-S., 2011. Metformin Represses Self-Renewal of the Human Breast Carcinoma Stem Cells via Inhibition of Estrogen Receptor-Mediated OCT4 Expression. *PLoS ONE* 6, e28068.
- Kim, B.W., Cho, H., Choi, C.H., Ylaja, K., Chung, J.-Y., Kim, J.-H., Hewitt, S.M., 2015. Clinical significance of OCT4 and SOX2 protein expression in cervical cancer. *BMC Cancer* 15, 1.
- Kosaka, N., Sakamoto, H., Terada, M., Ochiya, T., 2009. Pleiotropic function of FGF-4: Its role in development and stem cells. *Developmental Dynamics* 238, 265-276.
- Kurita, T., Cunha, G.R., Robboy, S.J., Mills, A.A., Medina, R.T., 2005. Differential expression of p63 isoforms in female reproductive organs. *Mechanisms of Development* 122, 1043-1055.
- 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.-O., Russo, A.A., Pavletich, N.P., 1998. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* 391, 859-865.
- Li, S.-W., Wu, X.-L., Dong, C.-L., Xie, X.-Y., Wu, J.-F., Zhang, X., 2015. The differential expression of OCT4 isoforms in cervical carcinoma. *PloS ONE* 10, e0118033.
- Liu, D., Zhou, P., Zhang, L., Wu, G., Zheng, Y., He, F., 2011. Differential expression of Oct4 in HPV-positive and HPV-negative cervical cancer cells is not regulated by DNA methyltransferase 3A. *Tumor Biology* 32, 941-950.
- Liu, S., Dontu, G., Wicha, M.S., 2005. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Research* 7, 86.
- Liu, X.-F., Yang, W.-T., Xu, R., Liu, J.-T., Zheng, P.-S., 2014. Cervical cancer cells with positive Sox2 expression exhibit the properties of cancer stem cells. *PLoS One* 9, e87092.
- 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.
- Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics* 38, 431-440.

- López, J., Ruíz, G., Organista-Nava, J., Gariglio, P., García-Carrancá, A., 2012. Human papillomavirus infections and cancer stem cells of tumors from the uterine cervix. *The Open Virology Journal* 6.
- Lüscher-Firzlaff, J.M., Westendorf, J.M., Zwicker, J., Burkhardt, H., Henriksson, M., Müller, R., Pirollet, 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.
- Martens, J., Arends, J., Van der Linden, P., De Boer, B., Helmerhorst, T., 2004. Cytokeratin 17 and p63 are Markers of the HPV Target Cell, the Cervical Stem Cell. *Anticancer Research* 24, 771-776.
- Marx, J., 2003. Mutant stem cells may seed cancer. *Science* 301, 1308.
- Massimi, P., Banks, L., 1997. Repression of p53 Transcriptional Activity by the HPV E7 Proteins. *Virology* 227, 255-259.
- 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.
- 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.
- McIntyre, M., Frattini, M., Grossman, S., Laimins, L., 1993. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-XX-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.
- Mendoza, J.A., Téllez, G., Luis, E., Muñoz, M., Vielma, S., Mosqueda, N., Pérez, S., Quintero, B., 2007. Virus y cáncer: el ejemplo de los papilomavirus humanos. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa-ULA* 1, 133-144.
- Merle, E., Rose, R.C., LeRoux, L., Moroianu, J., 1999. Nuclear import of HPV11 L1 capsid protein is mediated by karyopherin $\alpha 2\beta 1$ heterodimers. *Journal of Cellular Biochemistry* 74, 628-637.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S., 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-642.
- Modis, Y., Trus, B.L., Harrison, S.C., 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO Journal* 21, 4754-4762.
- 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.

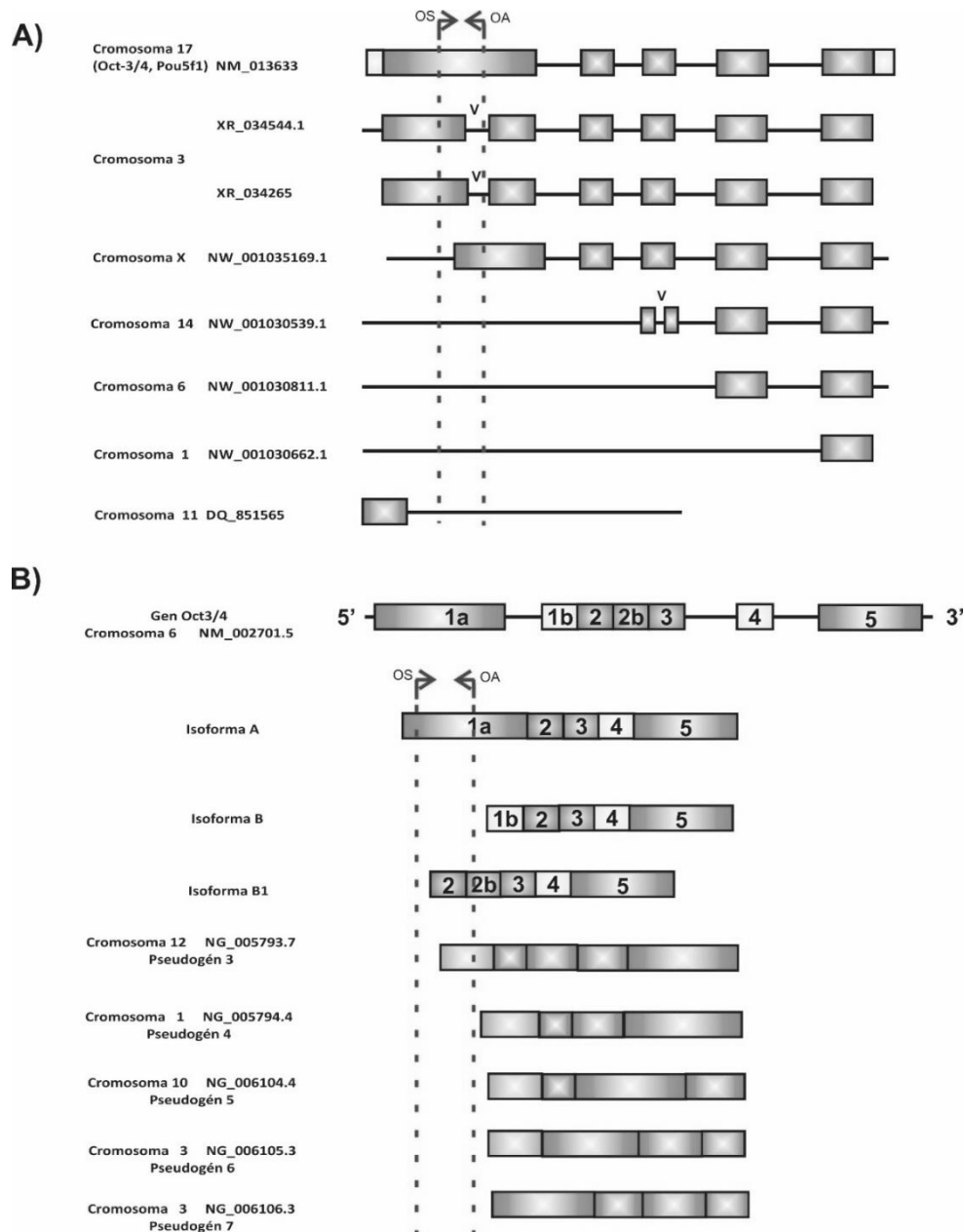
- Münger, K., Basile, J.R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S.L., Grace, M., Zacny, V.L., 2001. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20, 7888.
- Muñoz, N., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., Meijer, C.J., 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348, 518-527.
- Nelson, L.M., Rose, R.C., Moroianu, J., 2002. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *Journal of Biological Chemistry* 277, 23958-23964.
- Ng, H.-H., Surani, M.A., 2011. The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nature Cell Biology* 13, 490-496.
- 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., 2008. Direct association of the HPV16 E7 oncoprotein with cyclin A/CDK2 and cyclin E/CDK2 complexes. *Virology* 380, 21-25.
- 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.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., Smith, A., 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-391.
- Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S.A., 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* 1, 1559-1582.
- O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S.C., Surani, M.A., Jenuwein, T., 2001. The Polycomb-Group Gene *Ezh2* Is Required for Early Mouse Development. *Molecular and Cellular Biology* 21, 4330-4336.
- Ocadiz-Delgado, R., Castañeda-Saucedo, E., Indra, A.K., Hernandez-Pando, R., Flores-Guizar, P., Cruz-Colin, J.L., Recillas-Targa, F., Perez-Ishiwara, G., Covarrubias, L., Gariglio, P., 2012. RXR α deletion and E6E7 oncogene expression are sufficient to induce cervical malignant lesions in vivo. *Cancer Letters* 317, 226-236.
- Organista-Nava, J., Gómez-Gómez, Y., Gariglio, P., 2014. Embryonic stem cell-specific signature in cervical cancer. *Tumor Biology* 35, 1727-1738.
- Ovitt, C., Schöler, H., 1998. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Molecular Human Reproduction* 4, 1021-1031.
- Pan, G., Thomson, J.A., 2007. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research* 17, 42-49.
- Pan, G.J., Chang, Z.Y., Schöler, H.R., Duanqing, P., 2002. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Research* 12, 321-329.
- Pardal, R., Clarke, M.F., Morrison, S.J., 2003. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews Cancer* 3, 895-902.
- 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.
- Peh, W.L., Middleton, K., Christensen, N., Nicholls, P., Egawa, K., Sotlar, K., Brandsma, J., Percival, A., Lewis, J., Liu, W.J., 2002. Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *Journal of Virology* 76, 10401-10416.

- Pei, X.F., 1996. The human papillomavirus E6/E7 genes induce discordant changes in the expression of cell growth regulatory proteins. *Carcinogenesis* 17, 1395-1401.
- Peng, C., Li, N., Ng, Y.-K., Zhang, J., Meier, F., Theis, F.J., Merckenschlager, M., Chen, W., Wurst, W., Prakash, N., 2012. A unilateral negative feedback loop between miR-200 microRNAs and Sox2/E2F3 controls neural progenitor cell-cycle exit and differentiation. *The Journal of Neuroscience* 32, 13292-13308.
- Peralta-Zaragoza, O., Bermúdez-Morales, V., Gutiérrez-Xicotencatl, L., Alcocer-González, J., Recillas-Targa, F., Madrid-Marina, V., 2006. E6 and E7 Oncoproteins from human papillomavirus type 16 induce activation of human transforming growth factor β 1 promoter throughout Sp1 recognition sequence. *Viral Immunology* 19, 468-480.
- Pereira, L., Yi, F., Merrill, B.J., 2006. Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Molecular and Cellular Biology* 26, 7479-7491.
- Peters, W.M., 1986. Nature of "basal" and "reserve" cells in oviductal and cervical epithelium in man. *Journal of Clinical Pathology* 39, 306-312.
- Pett, M.R., Alazawi, W.O., Roberts, I., Downen, S., Smith, D.I., Stanley, M.A., Coleman, N., 2004. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Research* 64, 1359-1368.
- Phelps, W.C., Yee, C.L., Münger, K., Howley, P.M., 1988. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 53, 539-547.
- Ramalho-Santos, M., Yoon, S., Matsuzaki, Y., Mulligan, R.C., Melton, D.A., 2002. "Stemness": Transcriptional Profiling of Embryonic and Adult Stem Cells. *Science* 298, 597-600.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- 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.
- Rodda, D.J., Chew, J.-L., Lim, L.-H., Loh, Y.-H., Wang, B., Ng, H.-H., Robson, P., 2005. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *Journal of Biological Chemistry* 280, 24731-24737.
- Rong, Z., Li, L., Fei, F., Luo, L., Qu, Y., 2013. Combined treatment of glibenclamide and CoCl₂ decreases MMP9 expression and inhibits growth in highly metastatic breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 32, 1.
- Rosner, M.H., Vignano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirie, F., Rigby, P.W., Staudt, L.M., 1990. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345, 686-692.
- Ruesch, M.N., Stubenrauch, F., Laimins, L.A., 1998. Activation of papillomavirus late gene transcription and genome amplification upon differentiation in semisolid medium is coincident with expression of involucrin and transglutaminase but not keratin-10. *Journal of Virology* 72, 5016-5024.
- Sato, N., Sanjuan, I.M., Heke, M., Uchida, M., Naef, F., Brivanlou, A.H., 2003. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Developmental Biology* 260, 404-413.
- Schiffman, M., Castle, P.E., Jeronimo, J., Rodriguez, A.C., Wacholder, S., 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet* 370, 890-907.
- Schwartz, Y.B., Pirrotta, V., 2007. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nature Reviews Genetics* 8, 9-22.
- Schwartz, Y.B., Pirrotta, V., 2008. Polycomb complexes and epigenetic states. *Current Opinion in Cell Biology* 20, 266-273.

- Selvi, K., Badhe, B.A., Papa, D., Ganesh, R.N., 2013. Role of p16, CK17, p63, and Human Papillomavirus in Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Distinction From Its Mimics. *International Journal of Surgical Pathology* DOI: 10.1177/1066896913496147.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A., Brown, M., 2000. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103, 843-852.
- Sharov, A.A., Masui, S., Sharova, L.V., Piao, Y., Aiba, K., Matoba, R., Xin, L., Niwa, H., Ko, M.S., 2008. Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. *BMC Genomics* 9, 269.
- Shen, L., Huang, X., Xie, X., Su, J., Yuan, J., Chen, X., 2014. High expression of SOX2 and OCT4 indicates radiation resistance and an independent negative prognosis in cervical squamous cell carcinoma. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 499-509.
- Shenghui, H., Nakada, D., Morrison, S.J., 2009. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual Review of Cell and Developmental* 25, 377-406.
- Smedts, F., Ramaekers, F., Troyanovsky, S., Pruszczynski, M., Robben, H., Lane, B., Leigh, I., Plantema, F., Vooijs, P., 1992. Basal-cell keratins in cervical reserve cells and a comparison to their expression in cervical intraepithelial neoplasia. *The American Journal of Pathology* 140, 601.
- Stanley, M., Pett, M., Coleman, N., 2007. HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions* 35, 1456-1460.
- Sun, Y., Wang, Y., Fan, C., Gao, P., Wang, X., Wei, G., Wei, J., 2014. Estrogen promotes stemness and invasiveness of ER-positive breast cancer cells through Gli1 activation. *Molecular Cancer* 13, 1-16.
- Szotek, P.P., Pieretti-Vanmarcke, R., Masiakos, P.T., Dinulescu, D.M., Connolly, D., Foster, R., Dombkowski, D., Preffer, F., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K., 2006. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 11154-11159.
- 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.
- 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, 3629-3640.
- Ustav, M., Stenlund, A., 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *The EMBO Journal* 10, 449.
- Vallejo-Ruiz, V., Velázquez-Márquez, N., Sánchez-Alonso, P., Santos-López, G., Reyes-Leyva, J., 2015. La oncoproteína E7 del virus de papiloma humano y su papel en la transformación celular. *Revista Medica Instituto Mexicano Seguro Social* 53, S172-177.
- Velázquez-Márquez, N., Paredes-Tello, M.A., Pérez-Terrón, H., Santos-López, G., Reyes-Leyva, J., Vallejo-Ruiz, V., 2009. Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from a rural region of Puebla, Mexico. *International Journal of Infectious Diseases* 13, 690-695.
- Velázquez-Márquez, N., Reyes-Leyva, J., Vallejo-Ruiz, V., 2004. Papel de oncogenes del virus del papiloma humano en la inducción de cáncer cervicouterino. Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito hospedero. Puebla, México: Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, p277-292.

- 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.
- Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C., Muñoz, N., 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology* 189, 12-19.
- Wang, J., Sampath, A., Raychaudhuri, P., Bagchi, S., 2001. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene* 20.
- Wang, K., Zeng, J., Luo, L., Yang, J., Chen, J., Li, B., Shen, K., 2013. Identification of a cancer stem cell-like side population in the HeLa human cervical carcinoma cell line. *Oncology Letters* 6, 1673-1680.
- Wang, L., Guo, H., Lin, C., Yang, L., Wang, X., 2014. Enrichment and characterization of cancer stem-like cells from a cervical cancer cell line. *Molecular Medicine Reports* 9, 2117-2123.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., 2007. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324.
- Williams, J., 1991. Oral contraceptives and reproductive system cancer. Benefits and risks. *The Journal of Reproductive Medicine* 36, 247-252.
- Woodman, C.B.J., Collins, S.I., Young, L.S., 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Review Cancer* 7, 11-22.
- Yang, H.M., Do, H.J., Oh, J.H., Kim, J.H., Choi, S.Y., Cha, K.Y., Chung, H.M., Kim, J.H., 2005. Characterization of putative cis-regulatory elements that control the transcriptional activity of the human Oct4 promoter. *Journal of Cellular Biochemistry* 96, 821-830.
- Ye, F., Zhou, C., Cheng, Q., Shen, J., Chen, H., 2008. Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 8, 108-108.
- 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.
- Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J.W., Jansen-Dürr, P., 1996. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 13, 2323-2330.
- Zhang, S.-L., Wang, Y.-S., Zhou, T., Yu, X.-W., Wei, Z.-T., Li, Y.-L., 2012a. Isolation and characterization of cancer stem cells from cervical cancer HeLa cells. *Cytotechnology* 64, 477-484.
- Zhang, Y., Eades, G., Yao, Y., Li, Q., Zhou, Q., 2012b. Estrogen Receptor α Signaling Regulates Breast Tumor-initiating Cells by Down-regulating miR-140 Which Targets the Transcription Factor SOX2. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 41514-41522.
- Zur Hausen, H., 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer* 2, 342-350.

XI. ANEXOS



Anexo 1. Estrategia para la detección específica del transcrito de Oct3/4. La estructura del gen de Oct3/4 (parte superior) es alineada con las de los pseudogenes candidatos. Los exones son indicados en cajas en el transcrito de Oct3/4. Los oligonucleótidos de PCR son también indicados en el gen de Oct3/4. El gen de Oct3/4 se encuentra en los cromosomas 17 (ratón) y 6 (humano). Los pseudogenes de Oct3/4 en ratón (A) y humano (B) se encuentran en diferentes cromosomas, de acuerdo a la base de datos, y los números de acceso son indicados. Los oligonucleótidos amplifican un fragmento que podría ser exclusivamente el transcrito de Oct3/4 (NM_013633 y NM_002701.5) y excluye todos los pseudogenes conocidos. V: espacio, OS: Oligonucleótido Sentido, OA: Oligonucleótido Antisentido.

