



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

**PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE SONIC HEDGEHOG EN LAS
ETAPAS INICIALES DE LA CARCINOGENESIS INDUCIDAS POR LOS ONCOGENES
E6/E7 DEL PAPILOMA VIRUS HUMANO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Verónica Rojo León

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

Instituto de Biotecnología, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

Dr. Christopher David Wood

Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez

Facultad de Medicina, UNAM.

Ciudad Universitaria, CD. MX., Octubre

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

**PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE SONIC HEDGEHOG EN LAS
ETAPAS INICIALES DE LA CARCINOGENESIS INDUCIDAS POR LOS ONCOGENES
E6/E7 DEL PAPILOMA VIRUS HUMANO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Verónica Rojo León

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

Instituto de Biotecnología, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

Dr. Christopher David Wood

Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez

Facultad de Medicina, UNAM.

Ciudad Universitaria, CD. MX.

2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OFICIO FCIE/DAIP/399/2020
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **08 de junio de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **ROJO LEÓN VERÓNICA** con número de cuenta **301329239** con la tesis titulada: **"Participación de la vía de señalización de Sonic Hedgehog en las etapas iniciales de la carcinogénesis inducidas por los oncogenes E6/E7 del papiloma virus humano"**, realizada bajo la dirección del **DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES**:

Presidente:	DRA. MARÍA DE LOURDES GUTIÉRREZ XICOTENCATL
Vocal:	DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
Secretario:	DR. CHRISTOPHER DAVID WOOD
Suplente:	DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUÍZ
Suplente:	DR. JESÚS CHIMAL MONROY

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 30 de septiembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por abrir su espacio para mi formación académica y profesional. Su apoyo administrativo y académico fue fundamental para concluir mis estudios.

Quiero agradecer los apoyos económicos que recibí durante mis estudios de doctorado a través de la beca CONACYT de estudios de posgrado (359965) y la beca de Proyectos de Investigación PAPIIT (IA202317). Asimismo, agradecer los apoyos de investigación a través del financiamiento de los proyectos IN213416, IN214219, IA200915 y IA202317 de DGAPA/UNAM PAPIIT y el proyecto CONACyT CB239891 y CB131031 para realizar el proyecto de investigación.

Finalmente, agradecer a mi Tutor Principal, el Dr. Luis Covarrubias por aceptarme en su grupo de investigación, por su tiempo y dedicación para la conclusión del trabajo de investigación. A los miembros del Comité Tutor, al Dr. Marco Velasco y al Dr. Christopher Wood por su gran apoyo y sus consejos para el proyecto de tesis. A la Dra. Celina García quien ha apoyado mi desarrollo profesional y sobre todo el desarrollo de este trabajo.

Agradecimientos a título personal

A mi familia quienes son y serán la base de mi formación personal y profesional. A mi mamá, Benita Rojo por su comprensión, apoyo y cariño desbordante. Gracias por todo, te amo, mamá. A mis hermanos: Javier, Miguel y Fernanda quienes han transitado conmigo y les ha tocado vivir uno de los acontecimientos más adversos de mi vida y han estado ahí para apoyarme. Gracias, Fer por acompañarme y ahora siento un gran apoyo contigo. Miguel, gracias por todo tu esfuerzo económico y tu cariño incondicional. A mi abuelita, Manuela quien ha cuidado de mí y ahora toca devolverlo.

A mi tía Carmen, mi prima Maribel y mis sobrinos: Sebastián, Natalia y Mauricio, que me han enseñado que la familia es el principal apoyo. Gracias por las enormes horas de pláticas, convivios y apapachos en momentos de adversidad, y los grandes momentos de risas que los niños me han dado. A Tere Velasco, Lázaro Hernández, y sus hijos, quienes a la distancia he tenido apoyo y cariño, gracias por estar pendiente de mí y mi familia.

A todos mis compañeros de laboratorio -Covas- David, Daniel, Sergio, Ángel, Omar, Gilda, Raúl y Alberto, gracias por sus observaciones y comentarios al trabajo de tesis en los seminarios. A Marco y Alan su compañía en el laboratorio, por compartir la comida, risas, pláticas. Quiero agradecer especialmente a Celina García, quien, junto con el Dr. Luis, ha guiado todo el trabajo. Gracias por su apoyo para mi aprendizaje y conocimiento, y sobre todo tu amistad. A Concepción Valencia, quien me ha dado su apoyo técnico y amistad que sin duda fueron fundamentales para la conclusión de la tesis. A mis amigos: Javier Ramos, Dulce Arzate, Mishel Sánchez y David Rivera con quienes he pasado momentos inolvidables durante mi estancia en el Laboratorio y en el Instituto de Biotecnología. Con cada uno he compartido momentos que han dejado huella en mi forma de pensar.

A mis amigos Alma Valencia, Manuel Camacho, Narenthzy Díaz, Ileana Ávila, Bertha Zárate, Jovani Valdovinos, Sarahí Rodríguez, Rafael Figueroa, Edder Flores y Diana Riva. Gracias por su amistad y porque seguimos juntos a través de los años y están anclados a mi corazón. Manuel, por la buena convivencia y la amistad durante el tiempo que compartimos en Cuernavaca. Quiero mencionar especialmente a Alma y Nare, quienes me acompañaron en los momentos más difíciles, y que estuvieron ahí para salir adelante, su apoyo fue determinante; jamás olvidaré sus abrazos de esos momentos y el empuje que me dieron.

A mis queridas amigas Norma Sandoval y Eréndira Pérez, su fuerza, sus consejos y todas esas risas que hemos pasado juntas. Su compañía ha sido fundamental para mi desarrollo personal y profesional, las quiero mucho. A Lorenzo Islas y Edith Barbosa, quienes fueron el primer apoyo para tomar decisiones que cambiaron mi rumbo. A mi amigo, Gerardo Cedillo, con quien he compartido grandes momentos. Gracias por ayudar a relajarme, siempre sanaba todo, te quiero mucho.

Al Instituto de Biotecnología y su gran comunidad donde realicé mi trabajo de tesis, en especial al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada donde pasé muchas horas de uso de equipo.

Agradezco los comentarios y observaciones del jurado designado: Dra. Lourdes Gutiérrez, Dra. Vilma Maldonado, Dr. Christopher Wood, Dra. Concepción Gutiérrez y el Dr. Jesús Chimal, gracias por su tiempo para leer mi tesis.

Agradezco a la UNAM, por permitirme hacer uso de sus servicios e infraestructura y porque he tenido el privilegio de pertenecer a su comunidad. Especialmente a la Clínica de Salud Mental, quienes brindan un servicio integral y me ayudaron a recuperarme. Del mismo modo al personal del Posgrado en Ciencias Biológicas, ya que tuve todo el apoyo; agradezco su sensibilidad y empatía ante las situaciones adversas.

Dedicatoria

*A Benita Rojo;
por tu amor y pertenencia.*

*A Fer Ortíz;
"yo si cambie por ti..."*

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Epitelios	3
Epitelio cervical	4
Cáncer cérvico uterino o de cuello del útero	7
Incidencia y mortalidad	7
Factores de riesgo	9
Carcinogénesis del cáncer cervical.....	22
Regeneración y reparación de tejidos.....	24
Reparación de heridas y cáncer	28
Vía de señalización de Hedgehog (Hh): activación y función	31
Participación de Shh en el desarrollo embrionario	37
Participación de Shh en regeneración y renovación celular.....	37
Vía de señalización de Hedgehog y cáncer.....	39
Mecanismos de activación de la vía Hedgehoh en cáncer	40
Inhibidores de la vía de señalización de Shh	41
ANTECEDENTES	44
Modelos murinos para el estudio del cáncer cervical.....	44
Señalización de Hedgehog y cáncer cervical	48
Bioluminiscencia en organismos vivos.....	53
JUSTIFICACIÓN	55
HIPÓTESIS	56
OBJETIVO	56
METODOLOGÍA	57

Animales	57
Tratamientos	57
Cultivo de extremidades de embriones de ratón.....	58
Análisis del ciclo estral <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	59
Ensayo de regeneración	60
Imagen de bioluminiscencia <i>in vivo</i>	60
Immunodetección de Ki67	61
Immunodetección de BrdU	62
Hibridación <i>in situ</i>	62
Análisis estadístico	63
RESULTADOS.....	64
La vía de señalización de Hh se activa durante las etapas de crecimiento del epitelio cervical, proestro y esto, del ciclo estral	67
El estradiol y los oncogenes E6/E7 del HPV promueven la activación de la vía de Shh durante la carcinogénesis cervical.....	75
La inhibición de la vía de Shh disminuye el crecimiento en las etapas iniciales del cáncer cervical inducido por estradiol.	78
DISCUSIÓN	87
Participación de Shh en la regeneración de la oreja y la renovación del epitelio cervical.....	87
Participación de Shh en la renovación del epitelio cervical.....	88
Participación de Shh en la iniciación de la carcinogénesis cervical.....	90
Itraconazol como un inhibidor del crecimiento cervical	92
CONCLUSIONES	95
PERSPECTIVAS.....	96
REFERENCIAS.....	97
ANEXO 1.....	111
ANEXO 2.....	114

ABREVIATURAS

17 β E2	17 β -estradiol
AGF	Factor de crecimiento asociado a la angiopoyetina
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
AKT	Proteína cinasa B
AR	Ácido retinoico
CCB	Carcinoma de células basales
CDK2	Cinasa dependiente de ciclina 2
CK1 α	Caseína cinasa 1 alfa
CUL1	Cullina 1
CYC	Ciclopamina
Dhh	Desert hedgehog
DNMT1	ADN metiltransferasa I
E3 F-box	Ubiquitina ligasa E3 F-box
E6AP	proteína ubiquitin ligasa E3 asociada a E6
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
EMT	Por sus siglas en inglés, transición epitelio-mesénquima
ER α , ER β	Receptor de estrógeno alfa y beta
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
Gli	Oncogenes asociados a glioma
GRK2	Cinasa de receptor 2 acoplado a proteína G
GSK3	glucógeno sintasa cinasa 3 β
H&E	Hematoxilina-eosina
HPCD	2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
HR	Alto riesgo, del inglés 'Hight risk'
HPV	Virus del papiloma humano
Ihh	Indian hedgehog
IL1 β	Interleucina 1 beta

ISH	Hibridación <i>in situ</i>
ITC	Itraconazol
LCR	Región de control larga
LR	Bajo riesgo, del inglés Low risk
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MHC-I y II	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II
mTOR	Blanco de rapamicina
Myf5	Factor miogénico 5
MYOD1	Factor de diferenciación miogénica 1
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
ORF	Marco abierto de lectura,
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PKA	Proteína cinasa A dependiente de AMPc
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
Ptch1	Patched 1
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RB	Retinoblastoma
RE	Retículo endoplásmico
Shh	Sonic Hedgehog
SKP1	Proteína cinasa 1 asociado la fase S
Smo	Smoothened
SNC	Sistema nervioso central
Sufu	Supresor de Fused
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
TRADD	Proteína adaptadora asociada a TNFR
TRAIL	Ligando de inducción de apoptosis relacionado a TNF
URR	Región reguladora río arriba
VEGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
ZPA	Zona polarizante anterior

ZT	Zona de transformación
β TrCP	Complejo proteico con la proteína transducina

RESUMEN

La infección por el virus del papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés) de alto riesgo y la persistencia de estrógenos son dos factores que incrementan el riesgo para desarrollar cáncer cervical. La carcinogénesis cervical es un proceso de múltiples pasos durante la cual alteraciones en componentes de diversas vías de señalización pueden contribuir a la generación y crecimiento tumoral. La vía de Hedgehog (Hh) participa en la proliferación y la diferenciación celular durante la etapa embrionaria, y en la etapa adulta, en la renovación de células troncales, y la reparación y regeneración de tejidos. Esta vía también se ha observado activa en distintos tipos de cáncer, y en algunos casos se ha demostrado su participación en el desarrollo de la patología.

En el presente trabajo se empleó el modelo murino Tg(GliLuc);Tg(K6b-E6/E7) para evaluar la vía de Hh en el crecimiento normal del epitelio cervical, en el proceso de regeneración de la piel y en el crecimiento inducido por los oncogenes E6/E7 y el estradiol en el epitelio cervical. La actividad de vía de Hh fue determinada *in vivo* siguiendo los niveles del reportero bioluminiscente Gli-Luc durante el ciclo estral, la cual mostró ser superior durante las fases proestro-estro de mayor crecimiento, en comparación con la fase de diestro. Este mismo patrón fue observado en los ratones transgénicos que expresan los oncogenes E6/E7 y, notablemente, la actividad de la vía fue superior que en los ratones que solo llevan el gen reportero Gli-Luc. La administración de estradiol marcadamente incrementó la actividad del factor de transcripción Gli en el cérvix y en la piel tanto de ratones Tg(GliLuc) como Tg(GliLuc);Tg(K6b-E6/E7), correlacionando el incremento en la intensidad de bioluminiscencia con el crecimiento del tejido. El tratamiento con itraconazol, un fármaco que recientemente mostró inhibir la vía de Hh, en estadios tempranos de la carcinogénesis cervical redujo el crecimiento del epitelio y la proliferación asociada al crecimiento del epitelio cervical, pero no disminuyó la actividad de la vía. Por lo tanto, la vía de señalización de Hh contribuye al inicio de la carcinogénesis y el itraconazol es eficiente para disminuir el crecimiento, pero el mecanismo de inhibición involucra otras vías que participan en el crecimiento del cérvix.

ABSTRACT

Infection of high-risk human papilloma virus (HR-HPV) and estrogens are two factors that increase the risk of developing cervical cancer. The cervical carcinogenesis is a multi-step process during which alterations in components of various signaling pathways can contribute to generation and tumor growth. The Hedgehog (Hh) pathway participates in cell proliferation and cell differentiation during the embryonic stage, and in the adult stage, in stem cell renewal, and tissue repair and regeneration. This pathway has also been observed in different types of cancer, and in some cases, its participation in the development of pathology has been demonstrated.

In the present study was used the murine model Tg(GliLuc);Tg (K6b-E6/E7) to evaluate the Hh pathway in the normal growth of the cervical epithelium, in the process of skin regeneration and the growth induced by the E6/E7 oncogenes and estradiol in the cervical epithelium. Hh signaling activity was determined in live animals following the bioluminescent reporter levels (Gli-Luc) during the estrous cycle which showed to be higher in the cervical area during the proestrus-estrus, in comparison to the diestrus phase. The same pattern was observed in transgenic mice expressing the E6/E7 oncogenes, though with notably higher levels than mice that only carry the reporter gene GliLuc. Adding estradiol also markedly increased the activity of Gli transcription factor in the cervix and the skin in Tg(GliLuc) and Tg(GliLuc);Tg(K6b-E6/E7) mice, correlating the increase in bioluminescence intensity with tissue growth. Treatment with itraconazole, a putative novel Hh inhibitor, at an early stage of cervical carcinogenesis, it did reduce growth and cervical cell proliferation in mice but did not decrease Hh signaling. Therefore, Hh signaling likely contributes to cervical carcinogenesis and itraconazole is effective to reduce growth but by a mechanism involving additional signaling pathways.

INTRODUCCIÓN

Epitelios

En los vertebrados se considera que hay distintos tipos de tejidos como el epitelial, el muscular, el conjuntivo, el adiposo, el nervioso y otros. Cada tejido posee diversas características morfológicas que les permite realizar funciones altamente especializadas y en este trabajo nos enfocaremos al epitelio cervical¹.

De acuerdo con sus características morfológicas y funcionales, los epitelios pueden ser de revestimiento, glandulares o sensoriales. Parte de sus funciones están asociadas a formar una barrera entre el cuerpo y su medio ambiente, regular el intercambio de moléculas entre compartimentos, absorber y difundir sustancias, recepción sensorial, transporte, proteger las estructuras que recubre y otras funciones especializadas que le dan la característica a cada órgano que constituye¹. Los epitelios están formados por una capa o varias capas celulares con distinta morfología (células escamosas, cuboidales, columnares o poliédricas)¹.

Los epitelios simples, como el endotelio, mesotelio, epitelio de los túbulos renales y alveolar, se distinguen por ser de una sola capa y todas las células están unidas a la membrana basal y se extienden a la superficie del epitelio. Los epitelios estratificados tienen dos o más capas celulares a partir de la membrana basal y forman estratos o capas celulares¹ (**Figura 1**). En los epitelios estratificados se distinguen dos tipos, los epitelios estratificados no queratinizados y los epitelios estratificados queratinizados.

En los epitelios queratinizados, como la epidermis, durante el proceso de diferenciación celular, las células que van madurando pierden sus organelos de tal modo que en las capas más superficiales se observan células como láminas aplanadas (estrato córneo). Este proceso llamado queratinización diferencia a los epitelios no queratinizados donde las células superficiales no pierden sus núcleos. En la **Figura 1** se puede observar un esquema del epitelio simple vs el epitelio estratificado queratinizado y no queratinizado¹.

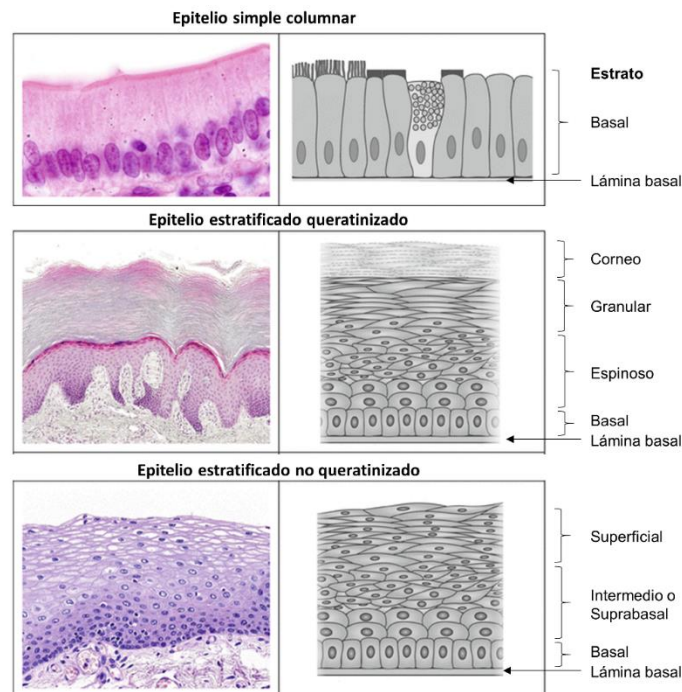


Figura 1. Epitelio simple y epitelio estratificado. Imagen izquierda se muestra imágenes de epitelio simple y estratificado teñido con hematoxilina-eosina (H&E). A la izquierda ilustraciones de los tipos de epitelio. Se indica el nombre del estrato o capa de cada tipo de epitelio. Imagen tomada y modificada de Rehfeld, A. 2017².

Epitelio cervical

El útero en los humanos es una estructura gruesa en forma de pera que se localiza en la línea media de la pelvis. Es un órgano complejo y esencial para la reproducción en mamíferos, así como para la salud de las mujeres. La función del útero está mediada por mecanismos hormonales, celulares y moleculares que regulan su desarrollo prenatal y postnatal. Particularmente, a lo largo de la vida reproductiva de una mujer sufre cambios cíclicos de crecimiento y diferenciación en respuesta al aumento y disminución de estímulos hormonales³.

Por su anatomía, el útero se divide en tres regiones: el **cuerpo**, la porción más ancha donde desembocan los oviductos o trompa de Falopio; el **fondo**, la base redondeada que se sitúa en la parte superior en los sitios de desembocadura de los oviductos en el cuerpo y el **cérvix**, la porción circular más inferior del útero que sale hacia la vagina⁴ (**Figura 2**).

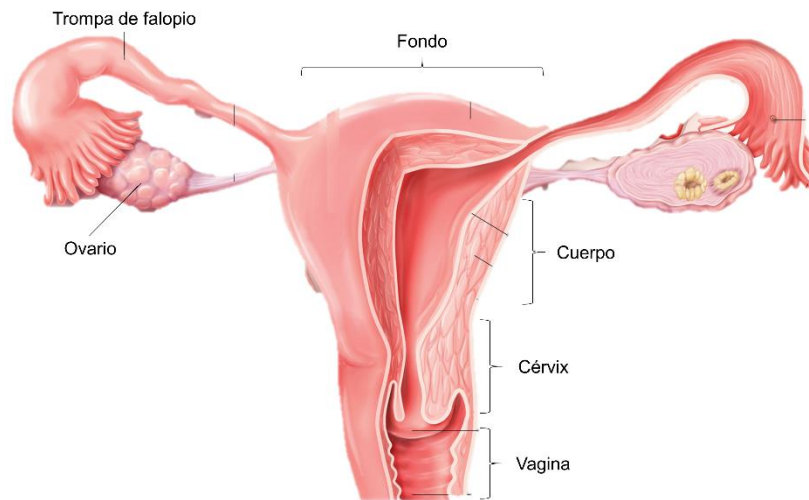


Figura 2. Aparato reproductor femenino. Se muestra la anatomía del útero compuesto por el fondo, el cuerpo y el cérvix. Imagen tomada y modificada de la Web⁵.

Histológicamente el cérvix está compuesto por 1) estroma, compuesto por fibras de colágena de tipo I y III, músculo liso que representa el 10-15% del estroma y fibras de elastina presentes en las paredes de los vasos sanguíneos; y 2) un epitelio columnaescamoso que está dividido en tres zonas:

El *exocérvix* está recubierto por un epitelio escamoso no queratinizado similar al epitelio vaginal. Este epitelio se divide en tres estratos: 1) El estrato basal/parabasal o capa germinal está constituido por una capa de células basales que presentan núcleos alargados y se disponen en forma perpendicular a la membrana basal. Las células parabasales constituyen las dos capas superiores y son células con mayor cantidad de citoplasma y más grandes que las basales. Por sus características, las células basales están encargadas del crecimiento y la regeneración epitelial ya que algunas pueden actuar como células troncales o de reserva⁶. 2) El estrato medio, espinoso o suprabasal, formado por células maduras que se caracterizan por presentar un aumento del tamaño del citoplasma, núcleos redondos con cromatina finamente granular. Las células de esta capa son llamadas intermedias en la citología exfoliativa y no se dividen. Ellas pueden tener glucógeno en su citoplasma y dar la imagen característica de una vacuola clara en el citoplasma⁶. 3) El estrato superficial es el compartimento más diferenciado del epitelio.

Las células presentan abundante citoplasma y un núcleo picnótico característico. La función de estas células es de protección y evitar el ingreso de microorganismos que causan de infecciones. Su descamación se debe a la escasez de desmosomas⁶ (**Figura 3A y 3C**).

Epitelio columnar del endocérvix o el canal cervical que conecta la vagina con el cuerpo uterino, está revestido con un epitelio columnar simple y contiene estructuras glandulares subyacentes. Los estudios tridimensionales han demostrado que estas "glándulas cervicales" no son glándulas verdaderas, sino profundas hendiduras del epitelio superficial en el estroma subyacente. En secciones transversales, las inflexiones complejas aparecen como glándulas aisladas. Las células columnares tienen núcleos basales redondos u ovales y citoplasma finamente granular que contiene abundante mucina. La actividad mitótica no se observa en las células endocervicales en circunstancias normales⁶ (**Figura 3A, 3B y 3D**).

Zona de transformación (ZT). Nombre que recibe el área de unión del epitelio escamoso con el epitelio columnar del cuerpo del útero. La presencia de glándulas endocervicales es un indicador de la posición de la ZT y su ubicación cambia con la edad; en etapas tempranas antes de la pubertad, el epitelio columnar, el canal cervical se dirige hacia el exocérvix; mientras que durante la pubertad el epitelio columnar se reemplaza por epitelio escamoso metaplásico por influencia de la estimulación hormonal. La unión escamocolumnar recién formada se denomina la unión escamosocolumnar nueva. El área entre la unión escamocolumnar original y la nueva se llama zona de transformación⁷. Ésta es el área donde se desarrollan aproximadamente el 90% de las lesiones preneoplásicas (**Figura 3A, 3C**).

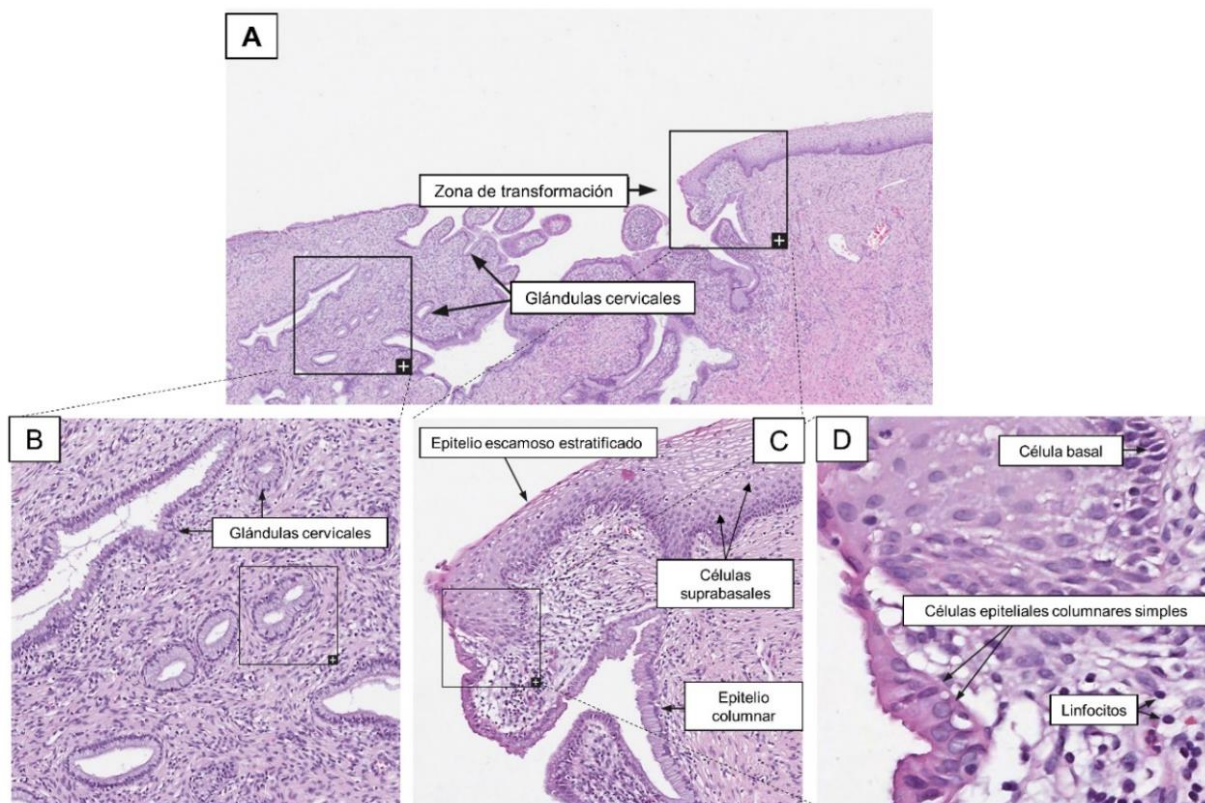


Figura 3. Tinción con H&E de un corte representativo de tejido cervical normal humano. **A.** Se indica la zona de transformación y las glándulas cervicales características del endocervix. **B.** Aumento de una región donde se muestran las glándulas cervicales (flechas negras). **C.** Se muestra el epitelio escamoso estratificado (exocervix) y sus las células suprabasales, así como el epitelio columnar (flechas negras). **D.** Aumento de la zona de transformación. En detalle se indica (flechas negras) las células basales del epitelio estratificado, las células epiteliales columnares simples y los linfocitos infiltrantes. Imágenes tomadas y modificadas de 'The Human Protein Atlas' Porcken, F. 2008⁸

Cáncer cérvico uterino o de cuello del útero

Incidencia y mortalidad

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo y en el 2015 ocasionó 8,8 millones de defunciones. Particularmente, el cáncer de cuello uterino es uno de los cánceres más prevenibles, sin embargo, todavía se reportan 530,000 nuevos casos por año en todo el mundo⁹, y casi la mitad de los casos se diagnostican en mujeres menores de 50 años, y más de dos tercios (370,000 casos) se diagnostican en países menos desarrollados. La mayoría del

cáncer cérvico uterino ocurre en el sureste asiático (principalmente en la India), América Latina y África⁹.

Considerando solo a las mujeres, los cinco tipos de cáncer más frecuentes son: mama (25.2 % del total), colorrectal (9.2%), de pulmón (8.7%), cérvico uterino (7.9%) y estómago (4.8%). En México, de acuerdo con las publicaciones de GLOBOCAN en el 2018, el cáncer cérvico uterino se encuentra en el quinto lugar de incidencia (7,869 casos) y mortalidad (4,121 casos)¹⁰. A pesar de las campañas para el diagnóstico temprano, el cáncer cérvico uterino sigue constituyendo un problema de salud pública, y una importante causa de defunciones de mujeres en edad reproductiva en nuestro país (Figura 4).

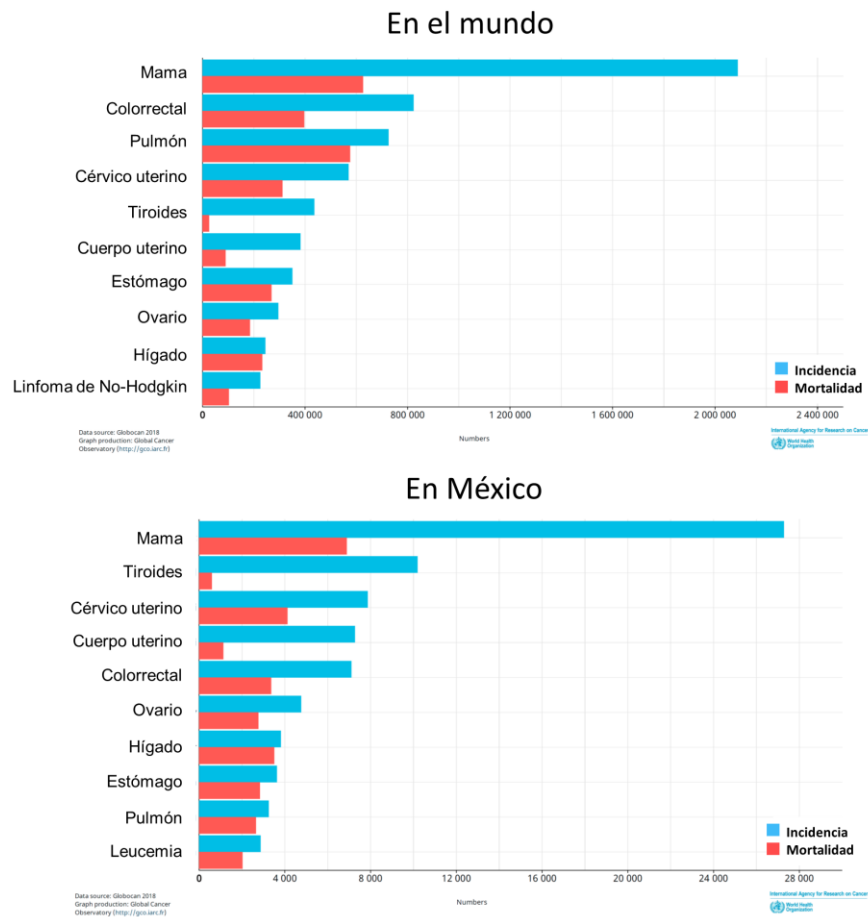


Figura 4. Incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres en el mundo y México. Imagen tomada y modificada de Ferlay, J. 2018¹⁰.

Factores de riesgo

En general, el cáncer se produce cuando se inicia la transformación de células normales en células cancerosas, en un proceso de varias etapas que suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno.

Particularmente, a nivel mundial, 570,000 casos por año en mujeres y 60,000 casos en hombres son atribuibles al HPV, que representan el 8.6% y 0.8% de todos los cánceres que ocurren en todo el mundo⁹, respectivamente. De acuerdo con estos datos, el HPV es el agente infeccioso con más casos asociados a cáncer en el mundo y es el principal agente etiológico asociado al cáncer cervical, el cual se relaciona con el 90% de los cánceres de este tipo¹¹. Sin embargo, el cáncer cervical tiene claramente un origen multifactorial manifestándose solo en una minoría de las mujeres que han sido infectadas por los HPV considerados de alto riesgo (HR- HPV, por sus siglas en inglés)¹². Por ello, además de la influencia asociada a la infección por el HPV, se ha descrito que distintos cofactores influyen en la progresión del cáncer cervical e incluyen:

Tipos y variantes virales: diversos estudios han mostrado que los tipos de HPV de alto riesgo u oncogénicos, la persistencia de la infección y ciertas variantes de estos tipos de virus están asociados con un mayor riesgo de neoplasia cervical. Estas variables se han asociado con capacidad que tienen las proteínas virales para interferir con puntos críticos de control del ciclo celular y así promover la proliferación y, ocasionalmente, la inmortalización de los queratinocitos^{12,13}.

Otros factores: existen factores genéticos (haplotipos HLA), como la inmunosupresión genética o inducida, factores hormonales endógenos, y comenzar la vida sexual a temprana edad¹³; así como el uso a largo plazo de anticonceptivos orales son cofactores entre las mujeres positivas para el HPV que incrementan el riesgo de desarrollar cáncer, así como coinfecciones con otros virus y tener historial con otras enfermedades de transmisión sexual como *Chlamydia trachomatis*^{13,14}.

Virus del papiloma humano (HPV)

Los papilomavirus son un grupo de virus no envueltos de doble cadena de ADN que pertenecen a la familia *Papillomaviridae*. Hasta el 2016 se habían identificado 205 tipos de papilomavirus humanos y están clasificados en 5 géneros: *alfa*, *beta*, *gamma*, *mu* y *nu papilomavirus*¹⁵. Los del género *alfa* se han clasificado en dos categorías: virus de alto riesgo (HR- HPV, tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) y virus de bajo riesgo (LR- HPV, tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81). Los virus de LR- HPV se han asociado a enfermedades del cuello del útero benignas como condilomas acuminados (verrugas genitales) mientras que los virus de HR-HPV son los causantes de displasias severas y cáncer cervical^{15,16}.

Los HPV son de ADN bicatenario de aproximadamente 8 kb y es mantenido en las células infectadas en forma episomal. Su ADN está dividido en tres regiones: una región de control larga (LCR) o región reguladora río abajo (URR), que contiene el origen de la replicación (Ori) y sitios promotores para la transcripción de genes; una región temprana (E, del inglés 'Early') que codifica la región para los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7; y una región tardía (L, del inglés 'Late') que codifica los genes L1 y L2¹⁷ (**Figura 5**).

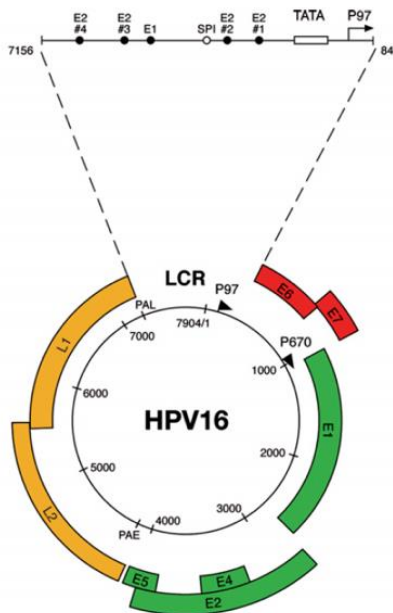


Figura 5. Esquema del genoma del HPV16 (7904 pb). Se muestran los promotores temprano (p97) y tardío (p670) marcados con flechas. Los ORF tempranos E1, E2, E4 y E5 (en verde) y E6 y E7 (en rojo) y los ORF (marco abierto de lectura, por sus siglas en inglés) tardíos, L1 y L2 (en amarillo). La región de control larga (LCR de 7156–7184) se amplía para permitir la visualización de los sitios de unión a E2 y el elemento TATA del promotor p97. Imagen tomada y modificada de Doorbar J. 2005¹⁷.

L1 y L2 son proteínas estructurales del virus; L1 es la principal proteína de la cápside viral icosaédrica (80%) mientras que L2 contribuye en menor proporción a la estructura de la cápside. Participan en el ensamble del virión y solo se expresan en las capas altamente diferenciadas del epitelio cervical¹⁸.

E1 es una ADN helicasa dependiente de ATP y es esencial para la replicación del episoma viral en el núcleo de las células infectadas. E1 es necesaria durante todo el ciclo de replicación viral. E1, primero, determina el aumento en el número de copias del episoma viral y mantiene un nivel constante de episomas después de la infección de los queratinocitos basales, que se van desplazando hacia arriba en el epitelio debido al proceso de diferenciación. Segundo, E1 promueve la amplificación del genoma viral durante la fase productiva del ciclo viral que tiene lugar en las capas epiteliales más diferenciadas¹⁹.

E2 es una de las principales proteínas reguladoras a nivel transcripcional de los HPV. Estructuralmente está compuesta por un dominio de transactivación en el extremo N-terminal y un dominio de unión a ADN en el C-terminal. La proteína E2 forma homodímeros que actúan como represores transcripcionales y, alternativamente, E2

puede formar un complejo con E1 y cooperar en la promoción de la replicación del genoma viral. En muestras clínicas de células infectadas con HPV de cáncer cervical de bajo o alto grado se ha mostrado que E2 se expresa en las capas intermedias o superiores del epitelio, pero no en las capas basales²⁰.

La proteína **E4** se sintetiza como una proteína de fusión que se denomina E1^E4 y es el resultado del empalme del ARNm localizado en el inicio del ORF de E1 y el ORF de E4; es sintetizada en la capa suprabasal y granular del epitelio infectado, y su expresión se correlaciona con la fase tardía del ciclo de vida del virus. E4 es exclusivamente citoplasmática y forma fibras de tipo amiloide asociados a queratinas del citoesqueleto lo cual favorece y facilita la formación de partículas, y posiblemente la liberación del HPV. Aunque todavía no se ha demostrado formalmente que E4 tenga un papel en la liberación y transmisión del virus sigue siendo una función probable para E4. Se ha propuesto que la proteína E4 puede servir como un biomarcador de infección de virus activa²¹.

E5 es una proteína transmembranal hidrofóbica y su localización celular es principalmente en el retículo endoplásmico (RE), envoltura nuclear y aparato de Golgi. Los HR-HPV codifican para una isoforma (E5 α) con alta actividad oncogénica, ya que es capaz de modular la homeostasis de los iones, producción de viriones y la penetración del genoma viral a la célula. Además, E5 aumenta la actividad transformante de E6 y E7 al regular la actividad de factores como el factor de crecimiento epidermal (EGF), Bcl-2, y Bax, Fas y calnexina²². Por tanto, E5 está involucrada en el control de la supervivencia celular, crecimiento y diferenciación. Su actividad procarcinogénica también incluye la inhibición de la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el ligando de Fas (FasL)²³. Interfiere con las funciones del sistema inmune al reducir la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II (MHC-I y II) en las células infectadas, disminuyendo así la presentación de antígenos virales y la supresión de la inflamación, lo que contribuye a la sobrevivencia de las células infectadas y transformadas²⁴.

E6 es una proteína de 151 aminoácidos de aproximadamente 18 kDa; tiene dos dominios de dedos de zinc y el segundo dominio tiene un motivo LXXLL requerido para mediar las interacciones con proteínas del hospedero²⁵. El blanco celular mejor caracterizado de E6 es la proteína ubiquitin ligasa E3 conocida como proteína asociada a E6 (E6AP) la cual se une al motivo LXXLL. En HR-HPV, E6 forma un complejo con E6AP que recluta y ubiquitina a la proteína supresora de tumores p53 y la etiqueta para su posterior degradación por el proteasoma²⁶. p53 previene la acumulación de mutaciones en la célula al permitir la reparación del daño a través del arresto del ciclo celular o inducir apoptosis; para ello, p53 activado induce la activación transcripcional de la proteína p21, la cual se une e inhibe al complejo ciclina E/cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) y ciclina D/CDK4 para arrestar el ciclo celular en fase G1. Por lo que, en las células infectadas por HPV, E6 que promueve la degradación de p53 provocando que la célula pierda uno de sus principales mecanismos para actuar en respuesta al daño al ADN, haciendo a la célula más susceptible a la transformación celular. Por otro lado, también ha sido descrito que p53 requiere acetilación mediada por p300 (una proteína acetiltransferasa de histonas) para ejercer efectos reguladores sobre genes blanco, y E6 del HPV secuestra a p300 para evitar la transactivación de p53, incluso sin la participación de E6AP^{26,27}.

Otras interacciones de E6 de importancia para HR-HPV es su unión a proteínas que poseen dominios PDZ ya que los virus de bajo riesgo no poseen este dominio. Los dominios PDZ son sitios de interacción proteína-proteína con ligandos que contienen los llamados motivos de unión a PDZ (PBM)²⁸. Se han descrito más de diez posibles sustratos de E6 que contienen estos dominios, y sus funciones van desde el control de la polaridad celular, el control de la unión entre células y la regulación de diversas vías de señalización celular. Los blancos de E6 identificados incluyen DLG1, Scribble, MAGI-1 (que participan en la polaridad celular), PSD95 (andamio de complejo de señalización), TIP2/GIPC (señalización de TGF β) y NHERF1 (señalización PI3K/AKT)^{29,30}. Particularmente la vía de fosfatidilinositol 3-cinasa/proteína cinasa B (PI3K/AKT) es una de las principales vías que participan en la supervivencia de las células cancerígenas, ya

que controlan procesos como proliferación celular, crecimiento celular, movilización celular y angiogénesis. Diversos estudios han mostrado que E6 activa la vía a través de la inactivación de la enzima fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) llevando al incremento de la fosforilación de AKT y la subsecuente activación de la proliferación celular^{27,31}.

Otras funciones de la proteína E6 incluye la activación de la telomerasa. En la infección por HPV, E6 induce la expresión de subunidad catalítica de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT)³². También, E6 tiene propiedades antiapoptóticas al unir y desestabilizar a la proteína proapoptótica Bak. Además, E6 interfiere con la señalización proapoptótica iniciada por TNF, el ligando de inducción de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL) y FasL³³. E6 puede unirse al receptor del TNF y esta unión evita la interacción del receptor con el dominio de muerte de la proteína adaptadora asociada a TNFR (TRADD); del mismo modo ocurre con la proteína asociada a Fas en su dominio de muerte (FADD), y la caspasa 8, los cuales son mediadores importantes río abajo de la vía de los receptores de muerte mencionados^{33,34}.

E7 es una proteína de 98 aminoácidos y está compuesta por tres dominios conocidos como regiones conservadas (CR 1, 2 y 3); CR2 posee el motivo LXCXE que tiene el sitio de unión a la proteína supresora de tumores Retinoblastoma (Rb). La función transformante de la proteína E7 es a través de la unión a pRb y los otros miembros relacionados p107 y p130^{26,27}. Rb controla la transición de la fase G1-S del ciclo celular regulando los factores de transcripción de la familia E2F que consta de 8 miembros que actúan como activadores o represores transcripcionales³⁴. Los miembros E2F1-E2F5 contienen dominios de unión al "pocket" de proteínas, pero E2F6-E2F8 no poseen estos dominios de unión a miembros de la familia de pRb y actúan independientemente. Los sitios de unión de E2F se encuentran en los promotores de varios genes que regulan distintos procesos celulares que regulan la progresión del ciclo celular^{26,34}. En condiciones normales, Rb se une a E2F para reprimir la expresión de los genes asociados a la replicación. En la etapa tardía de la fase G1, Rb es fosforilada por CDK favoreciendo su disociación con E2F y conduce a la expresión de genes específicos de la fase S como:

ciclina A, ciclina E y de síntesis de ADN³⁴. En células infectadas por HPV, E7 interactúa directamente con las proteínas E2F e interrumpe la interacción Rb-E2F y permite la expresión de los genes asociados a la replicación.

También se ha demostrado que E7 regula significativamente la actividad de Akt. Por un lado, la unión de E7 e inactivación de las proteínas de la familia pRb promueve la actividad de Akt en queratinocitos diferenciados que expresan E7 del HPV-16³⁵, asimismo, en otro ensayo se mostró que E7 de HPV-16 se une a las dos subunidades de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), por lo que E7 compite con Akt por la unión con PP2A lo que provoca la disminución de Akt defosforada³⁶. Estos y otros mecanismos donde participa tanto E6 y E7 en la transformación celular se resumen en la **Figura 6**.

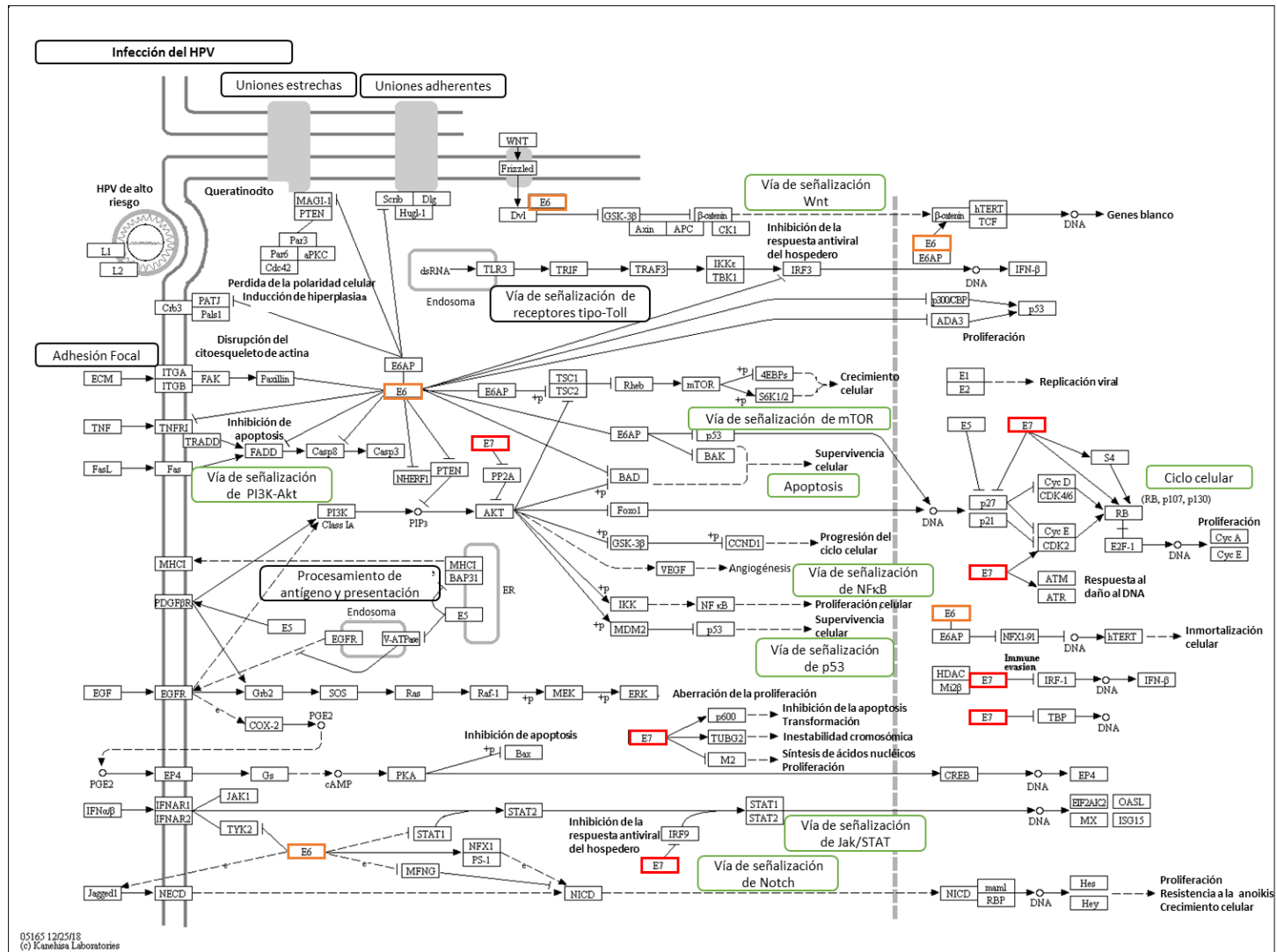


Figura 6. Esquema de las mecanismos y vías de señalización involucradas en el proceso de infección y transformación celular inducida por los de alto riesgo (HR-HPV). Se resaltan las funciones de las oncoproteínas E6 y E7. Imagen obtenida de 'KEGG PATHWAY Database' Kanehisa, M. 2000³⁷

Infección y ciclo de vida del HPV. El HPV es una de las infecciones de transmisión sexual más comunes; se transmite por contacto directo de piel con piel durante el sexo vaginal, anal u oral con una persona infectada¹⁵.

La infección y la reproducción vegetativa del virus es totalmente dependiente del proceso de diferenciación de los queratinocitos y la capacidad del HPV para iniciar un ciclo de vida productivo depende del sitio de la infección, así como del microambiente local^{15,38}. Particularmente, se ha reportado que la ZT cervical es más susceptible a la progresión del cáncer y puede estar relacionada con una mayor probabilidad de infección, específicamente durante la pubertad cuando las células metaplásicas están presentes en este sitio. Sin embargo, también se ha sugerido que células troncales tipo cuboidales, presentes en la unión escamosocolumnar, pueden ser propensas a la progresión del cáncer después de la infección por los HR-HPV ⁷ (**Figura 7**).

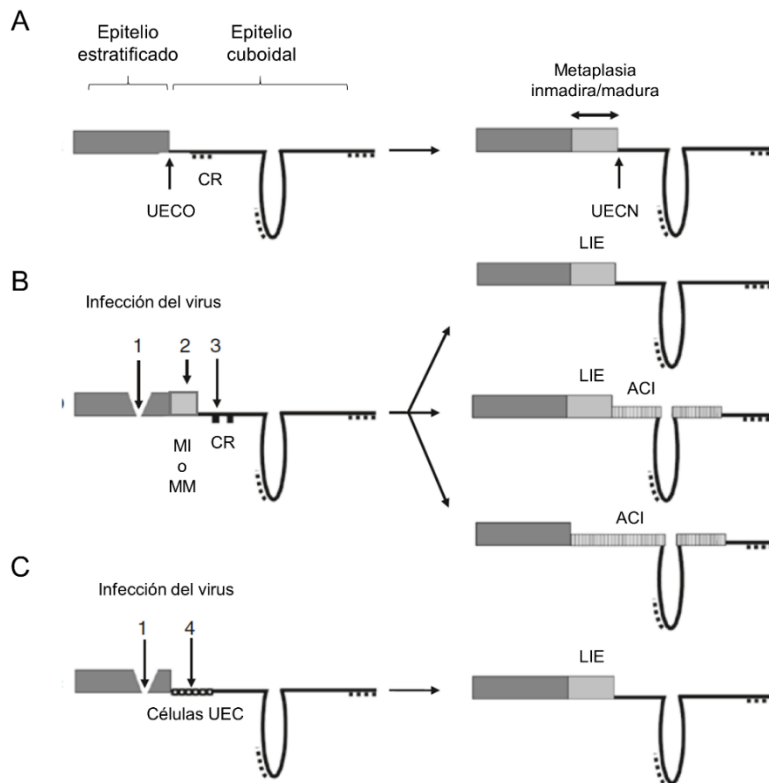


Figura 7. Esquema de células blanco de infección por HPV resultando en diferentes tipos de preneoplasias cervicales. **A.** localización topográfica de la unión escamosocolumnar original (UECO). Durante la pubertad, las células de reserva (CR) reemplazan el epitelio columnar por epitelio escamoso metaplásico (metaplasia inmadura y madura) y generan una unión escamosocolumnar nueva (UECN). **B, C.** La infección con HPV por microtrauma en el epitelio normal escamoso donde las células basales son infectadas (flecha 1) resulta en lesión intraepitelial escamosa (LIE) de bajo grado. En **B**, la infección de metaplasia inmadura o madura (flecha 2) y en el epitelio columnar en las células de reserva (flecha 3) resulta en LIE de alto grado, adenocarcinoma in situ (ACI) y en la LIE de alto grado o solo lesiones ACI dependiendo de la célula blanco. **C.** Infección específica en las células de la unión escamosocolumnar (en el epitelio columnar da origen a LIE de alto grado). Imagen tomada y modificada de Hopman, A. 2017⁷

Aunque existen zonas que son susceptibles a la infección, en general, el epitelio cervical intacto es resistente a infecciones virales. Sin embargo, se propone que hasta que ocurre la pérdida de su integridad, ya sea por un daño mecánico o químico, la entrada del HPV a las células troncales residentes de la capa basal del epitelio estratificado es posible. Se considera que, durante la reparación del epitelio cervical, el virus estaría en contacto con la lámina basal para su subsecuente entrada^{15,16}.

Dado que actualmente no existen ensayos de infectividad, se sabe poco sobre los pasos iniciales de la absorción del HPV. En su lugar, existen partículas similares al virus (VLP, por sus siglas en inglés) generadas por la síntesis de las proteínas de la cápside L1 y L2 que han permitido deducir el modo de interacción entre la superficie celular y la cápside viral³⁹. De acuerdo con estos modelos, se ha encontrado que los proteoglicanos de heparán sulfato, presentes en la matriz extracelular (ECM) y en la superficie de células epiteliales, se unen a la proteína de la cápside L1. Esta unión conduce a cambios conformacionales de la cápside a través de la escisión de la proteína L2 mediada por furina (una proteína convertasa)^{40,41}. Después de la proteólisis, la conformación de la cápside sufre otro cambio que conduce a la unión de la cápside a los receptores celulares, en particular a las integrinas $\alpha 6$ y $\alpha 6\beta 4$, la laminina y las integrinas de unión al colágeno (involucradas en la adhesión de los queratinocitos a la dermis y la diseminación de las células epiteliales durante la cicatrización de heridas). Posteriormente ocurre la internalización del virus en endosomas a través de la endocitosis mediada por clatrina o caveolina^{17,40,41}.

El HPV es incapaz de autoreplicarse, por lo que el ciclo del virus depende totalmente de la maquinaria de la célula hospedera. Para la entrada del genoma viral al núcleo se requiere de la proliferación celular, lo cual ocurre hasta que las células basales se dividen, ya sea por su proceso normal, o bien, en respuesta ante la lesión y la reparación de heridas^{7,42}. Se ha propuesto que la forma que ingresa el ADN viral al núcleo de la célula es a través de los poros nucleares mediado por carioferina y L2 del HPV, ya que esta proteína posee señales de importación nuclear. De manera alternativa, cuando se lleva a cabo la mitosis, ocurren varios cambios celulares como: el reordenamiento del citoesqueleto, cambian los perfiles de expresión génica y ocurre la desintegración de la envoltura nuclear. Si bien no está claro qué mecanismos facilitan la entrada del ADN al núcleo, también se considera que la desintegración de la envoltura nuclear ayuda al genoma del virus a acceder al genoma celular^{40,41}.

Subsecuente a la infección, en las células basales, las proteínas E1 y E2 forman un complejo E1-E2 requerido para el inicio de la replicación del ADN viral y la segregación del genoma. E2 al actuar como un factor de transcripción y regula el promotor temprano (p97 en HPV-16) del virus, controlando la expresión de los oncogenes E6 y E7^{16,17}. Sin embargo, la replicación no ocurre en estas células; cuando las células basales infectadas se dividen, entran en la capa parabasal, y comienza con su migración como células suprabasales para generar el epitelio estratificado^{16,17} (**Figura 8**). En este contexto, una función clave de las proteínas E6 y E7 de los HR-HPV no es promover la proliferación celular de las capas basales, más bien, para estimular la reentrada del ciclo celular en las células de las capas epiteliales intermedias o suprabasales, y permitir la amplificación del genoma¹⁸.

Finalmente, el ciclo reproductivo del HPV requiere que los genomas replicados sean empaquetados en partículas infecciosas; para ello se requiere del reclutamiento de las proteínas de la cápside, L1 y L2, que se acumulan en la fase tardía de la amplificación del genoma viral y el ensamble sucede en las capas superiores del epitelio donde se considera que E4 contribuye a la liberación de viriones⁴³, **Figura 8**.

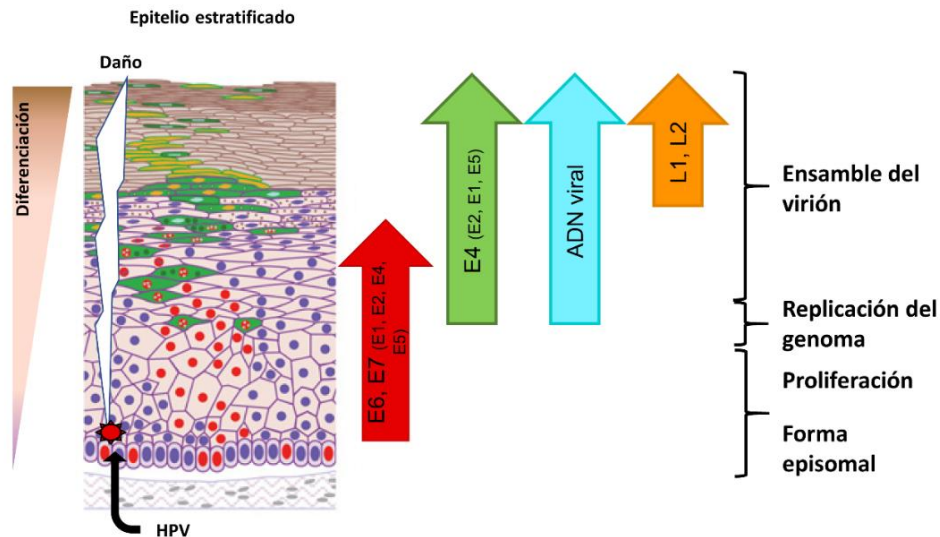


Figura 8. Ciclo de vida del virus del papiloma humano. Se resumen los eventos que ocurren después de la infección del virus en las células basales del epitelio cervical estratificado. Se indican las diferentes capas del epitelio y el grado de diferenciación (triángulo invertido). Las células infectadas (núcleos rojos) de la capa basal y suprabasal. Las flechas de colores indican en que región del epitelio participan las proteínas virales tempranas (E) y tardías (L). Imagen tomada y modificada de Doorbar, J. 2005¹⁷.

Estradiol

En las mujeres premenopáusicas, los estrógenos se sintetizan principalmente en el ovario, el cuerpo lúteo y la placenta, y en menor cantidad, en órganos como el hígado, el corazón, la piel y el cerebro. Fisiológicamente hay tres formas principales de estrógenos: estrona, estradiol y estriol. El estradiol es la principal hormona estrogénica de todo el proceso de biosíntesis y es el más potente durante el período premenopáusico en la vida de una mujer⁴⁴. Su función principal está en el control del comportamiento sexual y funciones reproductivas. Particularmente el cuello uterino es altamente sensible al estrógeno y durante el ciclo menstrual, las células epiteliales cervicales proliferan y se diferencian a medida que aumentan los niveles de estrógenos, lo que resulta en un epitelio hiperplásico sin cambios patológicos⁴⁵.

Principalmente la señalización y la actividad de los estrógenos son mediadas por mecanismos dependientes (acción genómica) del receptor de estrógeno (ER). Los ER son miembros de la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de

transcripción y modulan la transcripción de genes blanco y existen dos isoformas, el ER α y ER β ⁴⁶. Cada receptor tiene un patrón de distribución tejido-específica, mientras el ER α es expresado principalmente en el útero, epidídimo, hueso, mama, hígado, riñón, tejido adiposo blanco, células del estroma de la próstata, la teca y las células intersticiales de ovario; el ER β es expresado en el colon, testículos, médula ósea, endotelio vascular, pulmón, vejiga, células epiteliales de la próstata y en las células de la granulosa del ovario⁴⁷.

Si bien los estrógenos en el cuello uterino son necesarios para el cambio dinámico del epitelio cervical en condiciones normales, actualmente se ha reconocido la influencia del estrógeno como un cofactor que incrementa el riesgo de cáncer cervical en pacientes infectadas con HPV¹⁴. Específicamente, el uso por 5 años o más de anticonceptivos orales (estrógeno más un progestágeno) se considera un cofactor que incrementa 4 veces el riesgo de cáncer cervical en mujeres infectadas por el HPV¹⁴. Asimismo, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha considerado los anticonceptivos orales como carcinógenos humanos⁴⁸.

Aun cuando los estudios epidemiológicos han mostrado que el estrógeno incrementa el riesgo de cáncer, existen pocos estudios *in vitro* e *in vivo* que han demostrado que existe sinergia entre el estradiol y el HPV en el desarrollo del cáncer cervical. El estudio realizado por Kim y cols⁴⁹., mostró que el tratamiento con estradiol (a una concentración fisiológica de 0.1×10^{-6} M) incrementa la proliferación de células HeLa (de adenocarcinoma cervical) y CaSki (de carcinoma epidermoide cervical) en el 43% y 59%, respectivamente; mientras que las células epiteliales cervicales C33A, negativas para el HPV, el estradiol no tiene un efecto estimulante en la proliferación celular. Asimismo, los niveles de ARNm de las oncoproteínas E6 y E7 se incrementaron en presencia de estradiol⁴⁹. Este mismo efecto se ha observado al tratar estas mismas células con tamoxifeno, un agonista de los ER^{49,50}. Otros estudios empleando células SiHa (de carcinoma cervical escamoso) HPV16 positivas, también han mostrado un incremento de la proliferación y expresión de los genes E6 y E7 del HPV⁵⁰.

También se ha propuesto que un número de factores de transcripción celulares incluyendo el factor nuclear 1 (NF1), la proteína activadora-1 (AP-1), la proteína estimulante-1 (SP1), el represor transcripcional yin-yan1 (YY1) y el factor de transcripción específico de queratinocitos1 (KRF-1) se unen y participan en la regulación positiva o negativa de la actividad de la LCR del HPV. Particularmente AP-1 es un heterodímero que está compuesto por las proteínas c-Fos, c-Jun, y estradiol estimula la transcripción de *c-fos* y *c-jun* en células infectadas por HPV, lo que ha sugerido que AP1 participa en la proliferación celular inducida por estrógeno⁵¹. Además, se ha descrito que AP-1 es un activador de la URR y controla positivamente la expresión de los genes E6 y E7⁵².

Otros estudios *in vivo*, como el desarrollo de cáncer cervical en ratones transgénicos K14-E6/E7, han permitido demostrar que el estradiol exógeno (17 β -estradiol, 17 β E2) contribuye al desarrollo del carcinoma cervical. Asimismo, en ratones transgénicos nulos para el ER α , cuando son tratados con 17 β E2, no desarrollaron las características de la enfermedad progresiva como hiperplasia cervical y la metaplasia escamosa atípica, que conduzca al cáncer cervical (Ver descripción en antecedentes)⁵³.

Carcinogénesis del cáncer cervical

El proceso carcinogénico en el tejido cérvico uterino cursa, como otros cánceres de origen epitelial, por un sobre crecimiento del epitelio (hiperplasia) seguido de alteraciones morfológicas (displasias) que pueden progresar hasta catalogarse como carcinomas *in situ*. Como se mencionó anteriormente, tras la infección con HR-HPV, predominantemente genotipo 16 y 18, la transformación premaligna de células ocurre principalmente en la unión escamosocolumnar. Estos cambios premalignos o la displasia de las células escamosas en el epitelio cervical se conocen como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y describen la presencia de células precancerosas y anormales en la superficie de un cuello uterino o su canal, que al progresar, dan lugar principalmente al carcinoma de células escamosas cervicales o en menor frecuencia al adenocarcinoma cervical⁷.

Histológicamente, las NIC se clasifican según la gravedad en: NIC I, NIC II y NIC III. Las NIC I, también conocidas como lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL, por su siglas en inglés y bajo el sistema Bethesda de clasificación de células displásicas cervicales), se caracterizan por presentar pocas anormalidades citológicas, mayor actividad mitótica y displasias leves en el tercio inferior del epitelio^{7,13,54}. Además, típicamente muestran evidencia de infección viral productiva con la presencia de coilocitos ya que son una característica citológica distintiva de las LSIL. Los coilocitos son células escamosas maduras con alteraciones nucleares y citoplasmáticas reconocibles; se caracterizan por la presencia de un halo claro perinuclear, hiper cromasia, doble núcleo y agrandamiento nuclear^{55,56}. A pesar de que los coilocitos son causados por HPV oncogénicos y no oncogénicos, la manifestación notable de coilocitos y atipia de células cervicales representa una infección por HPV productiva y persistente lo cual es primordial para la transformación del epitelio cervical^{7,55}.

Cuando la mujer infectada es diagnosticada con NIC I, ésta puede resolver la infección a través de su sistema inmunitario¹³. Sin embargo, en casos donde la infección no es eliminada, el virus puede persistir y estimular continuamente la proliferación celular, lo cual promueve la pérdida de la capacidad de reparación de ADN (p.ej. mediada por p53 como resultado de la expresión E6) y puede acumular mutaciones puntuales en el genoma celular que eventualmente pueden conducir al cáncer⁵⁷. Por lo anterior, la NIC I puede progresar a una NIC II o III, también conocidas como lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL, por las siglas en inglés). Se denomina NIC II o displasia moderada cuando dos tercios del epitelio es afectado y NIC III o displasia severa cuando más de dos tercios del grosor del epitelio es afectado y comúnmente son positivos a los virus oncogénicos. Ambas lesiones de alto grado son las precursoras del cáncer cervical invasivo y se caracterizan microscópicamente por proliferación de células escamosas con un grado de diferenciación menor que las observadas en LSIL. Dichas células tienen núcleos hiper cromáticos con un contorno irregular y rara vez se observan nucleolos. Las mitosis son más frecuentes y se pueden observar en la parte más externa⁷.

Si bien los estudios epidemiológicos muestran que el HPV es un agente causante del cáncer cervical, es importante mencionar que la infección por HPV por sí sola probablemente no sea suficiente para provocar cáncer, ya que la infección por HPV de alto riesgo es común en mujeres con citología cervical normal y la mayoría de estas mujeres infectadas nunca desarrollarán cáncer cervical¹³. Considerando lo anterior, y como ya se ha expuesto anteriormente, existen otros factores que participan y están asociados a cambios en las vías de señalización que controlan diversos procesos celulares que participan en el surgimiento y mantenimiento de un fenotipo maligno.

Regeneración y reparación de tejidos

Las células que forman los tejidos y órganos del cuerpo constantemente mueren y son reemplazadas por células nuevas. Con la finalidad de mantener la homeostasis tisular, el organismo posee diversos mecanismos de reemplazamiento celular para conservar un balance, especialmente relevante ante un daño o lesión^{58,59}. En mamíferos, un tejido dañado puede repararse asimismo por un proceso que por lo general deja una cicatriz. En contraste, en organismos con alta capacidad regenerativa como los anfibios, estos pueden regenerar partes dañadas sin dejar cicatriz, y en casos extremos, recuperar la forma, la función y el tamaño original^{58,59}.

En general, se pueden distinguir dos formas de regeneración: la regeneración fisiológica que describe el reemplazamiento regular para mantener la homeostasis de células y tejidos (como ocurre en la renovación del revestimiento intestinal, la generación de nuevas neuronas en el cerebro y el mantenimiento de piel, el pelo y los huesos), o la regeneración reparativa que es inducida en respuesta a un daño o lesión⁵⁹. Durante la regeneración reparativa en los vertebrados se han distinguido dos mecanismos que conducen a la regeneración. Se dice que la regeneración es epimórfica cuando se induce la proliferación celular para formar una estructura llamada blastema; un blastema es una masa celular heterogénea de células indiferenciadas y proliferantes que se forma transitoriamente en el sitio de la lesión y sufre morfogénesis para dar lugar al tejido faltante. Por otro lado, la regeneración que implica la remodelación de células

preexistentes en el sitio de la herida para restaurar el patrón normal se le llama morfálaxis⁵⁹.

En mamíferos la capacidad de regeneración es limitada comparada con otras especies; sin embargo, aún con la capacidad regenerativa limitada, parte de los mecanismos moleculares y celulares como: la muerte celular, la diferenciación de células vecinas del sitio dañado, la transdiferenciación, la desdiferenciación, la activación de células troncales que darán origen a nuevas células se han conservado en la evolución y existen modelos experimentales, en ratones o conejos, que han permitido estudiar este proceso^{59,60}.

Uno de los primeros estudios de regeneración en mamíferos consistió en perforar orejas de conejo. Para ello, en 1980 Williams-Boyce⁶¹ empleó conejos de Nueva Zelanda de ambos sexos de un rango de edad de 2 semanas a 3 años. A los conejos se les realizaron perforaciones en un rango de 5-10 mm de diámetro dependiendo de la edad. De las 52 orejas analizadas (26 conejos) 19 orejas se cerraron completamente al día 49 de los 70 que duró el experimento. Uno de los resultados interesantes que se muestra en este estudio es que las hembras cierran más rápido que los machos, observado el inicio del cerrado a los 35 días y a los 42 días, respectivamente. Sin embargo, la frecuencia de regeneración en los machos es mayor (75 % de las orejas regeneradas) que en las hembras (20%). Este hallazgo llevó a considerar que la testosterona en los machos tiene un efecto en la regeneración. Para ello, un grupo de hembras se ovariectomizaron y se les trató con testosterona o con aceite de maíz empleado como control. Los resultados mostraron que las hembras de ambos grupos les toma el mismo tiempo (42 días) para regenerar el tejido perdido; mientras que al 88% de las hembras que se ovariectomizaron y se les trató con testosterona cerraron las heridas, solo el 50% de las hembras control regeneraron. Los resultados de este estudio muestran una clara influencia de las hormonas⁶¹, como la testosterona y el estradiol.

Otro modelo de reparación de heridas y regeneración que se ha estudiado es el ratón MRL (del inglés, Murphy Roths Large). Inicialmente este ratón se describió por Clark

y cols.⁶², y en su estudio mostró que los ratones de 6 semanas de edad a los que se les realizó una perforación en la piel de la oreja de 2 mm de diámetro reducen en un 85 % el diámetro de la herida en 15 días, y al llegar a los 25 días, cierran completamente la herida con respecto a la cepa C57BL/6 que solo reducen al 30% la herida y permanece así los días posteriores. Durante este tiempo, la examinación histológica de la piel de ambas cepas mostró marcadas diferencias en el grado de angiogénesis, proliferación celular, formación de tejido conjuntivo, migración de fibroblastos, y la presencia de glándulas sebáceas, folículos pilosos y formación de cartílago en la zona de crecimiento del tejido nuevo. Estas últimas características solo se observaron en la cepa MRL. Lo anterior representa un tipo de regeneración epimórfica ya que a los dos días de la herida se observó la formación de un nuevo epitelio estratificado y se observan células cornificadas y tejido hiperplástico que forma una estructura similar al blastema ⁶².

Otros investigadores han repetido el modelo de daño inducido en las orejas de ratones de la cepa MRL con resultados muy similares. Además de la oreja, también se ha evaluado la capacidad de regeneración de otros tejidos en este ratón y en la **Tabla 1** se resumen algunos de los experimentos que se han realizado⁶³.

Tabla 1. Ejemplos de regeneración y reparación de heridas en el ratón MRL61.

Regeneración	Características
Córneas quemadas con álcali	El modelo de la herida tiene una infiltración celular inflamatoria robusta, cicatrización extensa, erosión epitelial continua, ulceración, edema estromal y neovascularización que resulta en la pérdida de transparencia causada por tejido cicatrizado no remodelado. Los ratones MRL son capaces de remodelar completamente la fibrosis, el ojo recupera su capacidad funcional completa sin ninguna pérdida de transparencia corneal.
Amputaciones de dígitos neonatales	Los dígitos del MRL se recuperan más rápido que las cepas de ratones C57BL/6 a los 7, 14 y 21 días después de la amputación. En el día 28 en los ratones MRL volvió a crecer total o parcialmente la uña con más frecuencia que la cepa de control. Al igual que en las heridas de la oreja, se observó reepitelizaron rápidamente sobre el sitio de la herida, lo cual no sucedió en las cepas control.
Trasplantes de piel	Los injertos de piel de la cepa B10.BR en ratones MRL se caracterizaron por tener menos colágena, inflamación, infiltración de células del sistema inmunitario en toda el área de la herida y menos apoptosis; pero más neovascularización, mayor expresión de ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos alfa (VEGF- α) y reclutamiento de células troncales locales lo que favoreció la aceptación del injerto de piel.
Curación de herida/formación de cicatriz	
Curación de heridas en la piel	Las heridas realizadas en la piel dorsal de 4 mm en ratones MRL, ninguno de los ratones logró la rápida reepitelización o la formación de la estructura tipo blastema, en su lugar resultó en fibrosis y formación de cicatriz.

En otro estudio de regeneración empleando el ratón MRL y el ratón nulo para el gen *p21* (*Cdkn1^{atmi/Tyj/J p21}^{-/-}*) realizado por Bedelbaeva y cols⁶⁴., mostraron que las células sanas provenientes de cepas de ratones MLR, el 64.1% de las células están en la fase G2/M del ciclo celular, a diferencia de las células de ratones que no regeneran que están en la fase G0/G1, lo que sugiere que la capacidad regenerativa está asociada a mecanismos que controlan el ciclo celular. Para demostrar esto, en el modelo de regeneración inducido por lesión en las orejas de ratones MRL se mostró que en los primeros días (0.5-10 días) posteriores a la lesión se incrementa el nivel de la proteína p53 en comparación con la cepa B6129SF2/J WT que no regenera. Asociado a ello, en células sanas de ratones MRL la proteína p21 no se expresa, e incluso no se induce en respuesta al daño al ADN provocado por radiación. Para confirmar la asociación entre la ausencia de p21 y la regeneración, en el ratón *p21*^{-/-} se realizó la herida en las orejas

siguiendo modelo del ratón MRL y se comparó el proceso de regeneración entre ambos ratones. Los resultados mostraron que el proceso de regeneración es similar en ambos durante el periodo de 6-7 semanas, observando en el tejido regenerado del ratón p21^{-/-} una epidermis y dermis normal, y presencia de cartílago. En conjunto, estas observaciones confirman que la ausencia de p21, que detiene la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular y es regulada por p53, favorece la capacidad regenerativa ya que prepondera a mantener a las células en la fase G2/M, como también se ha observado en especies con alta capacidad regenerativa.

Reparación de heridas y cáncer

La reparación de un tejido ante un daño es un proceso que involucra el crecimiento de células mediante un proceso altamente controlado, por lo que defectos en la regulación de este proceso pueden iniciar un proceso de carcinogénesis. La asociación entre la reparación y el cáncer fue inicialmente propuesta por Rudolf Virchow en 1863, quien postuló que la inflamación crónica y las lesiones son una condición previa para la tumorigénesis⁶⁵. Además, hay evidencias clínicas que muestran que algunas infecciones crónicas están asociadas con el riesgo a desarrollar cáncer y, de acuerdo a la IARC, se han declarado 11 agentes infecciosos considerados como carcinógenos humanos e incluyen a: *Helicobacter pylori*, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, el HPV (virus de alto riesgo), y otros⁶⁶⁻⁶⁸.

Por tanto, hacer una comparación entre el proceso de reparación de heridas y el inicio y progresión del cáncer para evidenciar los mecanismos en común, así como las diferencias ayuda a entender su participación en ambos procesos. Por ello, a continuación, se describirán, brevemente, las etapas descritas durante la reparación de heridas y su similitud con el cáncer.

La reparación de heridas en la piel es uno de los procesos mejor caracterizados y para su estudio se han descrito tres fases: 1) La **inflamación** se produce inmediatamente después de daño tisular para prevenir pérdidas de sangre y fluidos. Para ello se inicia la cascada de la coagulación para formar un coágulo de fibrina que proporciona la

arquitectura básica de matriz para iniciar el reclutamiento de células inflamatorias que estarán encargadas de eliminar el tejido muerto y prevenir la infección. En el sitio de la herida, las plaquetas liberan factores de crecimiento, citocinas y proteinasas que son requeridas para la siguiente fase^{60,67}. 2) **Formación de tejido nuevo**, esta se produce 2-10 días después de la lesión. Se caracteriza por la proliferación celular y la migración de diferentes tipos celulares para cubrir la superficie de la herida, y la restauración de la red vascular. Durante esta etapa se produce la hiperproliferación de queratinocitos para la formación de una epidermis nueva, un proceso llamado reepitelización. El nuevo tejido formado en el sitio de la herida es llamado tejido de granulación caracterizado por la alta densidad de fibroblastos, granulocitos, macrófagos, capilares y redes de colágena poco organizados^{60,67}. 3) **Remodelación**, esta fase comienza 2-3 semanas después de la lesión y durante esta etapa todos los procesos activados anteriormente se detienen. Dentro del tejido de granulación, los fibroblastos son atraídos a la herida desde la dermis, y producen factores de crecimiento como el EGF y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que regulan la reepitelización. También secretan proteinasas que degradan la matriz inicial de fibrina y producen nuevas proteínas que formarán la ECM. Luego de diferenciarse a miofibroblastos, estos depositan grandes cantidades de fibronectina y colágena tipo I y tipo III, lo que permite la remodelación del tejido conjuntivo; así el tejido de granulación representa parte importante de la cicatriz y la mayor parte de las células endoteliales, macrófagos y fibroblastos experimentan apoptosis o salen de la herida, dejando la ECM compuesta predominantemente de colágena de tipo I. Este tejido cicatrizado se caracteriza por la pérdida de la estabilidad mecánica y elasticidad, carencia de folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas⁶⁷.

Se ha observado que los mecanismos celulares y moleculares que ocurren durante las fases descritas para la reparación de heridas son comúnmente activados de manera desregulada durante el inicio y el desarrollo de un cáncer. Por ejemplo, la inflamación es un proceso que se resuelve una vez que la reepitelización termina⁶⁷. Sin embargo, en el contexto del cáncer, los factores liberados en el sitio de la herida (factores crecimiento, citocinas y quimiocinas), la exposición a irritantes químicos o la inflamación crónica,

directa o indirectamente, inducen la proliferación celular, reclutan células inflamatorias que, a su vez, aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno que conducen al daño oxidativo del ADN, reducen su reparación e incrementan la probabilidad de inducir mutaciones en el ADN^{67,69}. Por ello, la persistencia de estos factores y el desbalance de los mecanismos necesarios para resolver la respuesta inflamatoria propician cambios en las células epiteliales y del estroma que pueden conducir al inicio de la carcinogénesis^{69,70}.

Otro de los mecanismos principales para la formación de tejido nuevo es la proliferación celular y la restauración de la red vascular. En los carcinomas, el mantenimiento de la señalización proliferativa de las células transformadas y la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) son características principales que permiten a las células tumorales sobrevivir⁷⁰. Para ello, las células tumorales alteran las señales que regulan la progresión a través del ciclo celular. Generalmente, estas señales provienen de factores de crecimiento que se unen a los receptores de la superficie celular y se transducen a través de vías de señalización intracelulares. Dentro de estas vías se incluyen: la vía del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3-K), la vía del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la vía de Wnt/ β -catenina, Hedgehog, entre otras^{66,67,70}.

En cuanto a la angiogénesis, ésta es regulada por factores de crecimiento, moléculas de ECM y proteinasas, y su importancia se ha demostrado en el proceso de regeneración, ya que, como se esperaría, la formación de un tejido nuevo se requiere del suministro de nutrientes y oxígeno, p. ej., en un modelo de ratón que expresa el gen que codifica al factor de crecimiento asociado a la angiopoyetina (AGF), un agente proangiogénico, bajo el control del promotor de la K14, AGF favorece la regeneración en la oreja del ratón⁷¹. Sin embargo, durante la progresión del tumor, la señal proangiogénica se activa y permanece encendida para mantener y extender el crecimiento neoplásico. Dentro de las señales que más contribuyen a la angiogénesis a favor del crecimiento del tumor se encuentra el factor de crecimiento de fibroblastos A (VEGFA), cuyos niveles se

incrementan en respuesta a hipoxia, por un mecanismo mediado por la activación del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) y el FGF2^{67,70}.

La cicatrización de un tejido está estrechamente relacionada con la remodelación de la ECM que contribuye a formar una cicatriz y terminar con el proceso de reparación. En diversos carcinomas se han observado distintas proporciones de fibroblastos y miofibroblastos asociados al cáncer. Se conoce que los miofibroblastos reclutados favorecen los fenotipos tumorales al promover la proliferación de células cancerígenas, la angiogénesis, la invasión y la metástasis ya que secretan una variedad de componentes de la ECM asociados a la remodelación tisular^{67,70}. De acuerdo con lo anterior, es evidente la asociación que existe entre el proceso de reparación del daño y la carcinogénesis. En este sentido, el estudio de las vías de señalización y las moléculas que participan en ambos procesos son factores clave para poder inducir o controlar el crecimiento tisular en condiciones patológicas.

Vía de señalización de Hedgehog (Hh): activación y función

Las células normales funcionan bajo el control (regulación positiva y negativa) de su entorno y el cáncer es considerada una enfermedad de células cuyo crecimiento y función está desregulada⁷⁰. Las células se comunican a través de vías de transducción de señales que finalmente conducen a la activación o represión de ciertos procesos celulares.

En cierto sentido, la proliferación celular y la diferenciación terminal están reguladas por distintas vías de señalización y el cáncer puede ser el resultado de la combinación de alteraciones de vías que controlan el crecimiento tisular^{66,72,73}. Al final, estas alteraciones conducen a que las células pierdan su confinamiento original e invaden e interrumpen los tejidos circundantes, favoreciendo su expansión.

La vía de señalización de Hh está conservada evolutivamente y tiene una función crítica en el desarrollo embrionario y la homeostasis de diferentes órganos durante la vida adulta. Participa en la determinación, la especificación, la proliferación y muerte celular; así como la renovación y activación de células troncales y su diferenciación^{74,75}. Por ello, su estudio ha tomado importancia en el conocimiento del desarrollo embrionario, la regeneración y renovación celular, así como en el desarrollo del cáncer.

El gen *hh* se identificó por primera vez en *Drosophila melanogaster* y solo da a lugar a la proteína Hh. La proteína Hh es un morfógeno que una vez secretada puede extenderse a corta y larga distancia provocando distintos efectos. A diferencia de *D. melanogaster*, en vertebrados, la familia de proteínas Hh está constituida por 3 miembros: Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) y Desert hedgehog (Dhh) que son codificados por distintos genes y secretados en diferentes tejidos en distintas etapas del desarrollo. La expresión de Dhh está limitada a las gónadas incluidas las células de sertoli de los testículos y las células de la granulosa de los ovarios. Por su parte, Ihh es un importante regulador en el crecimiento óseo, ya que se expresa en los condrocitos pre-hipertróficos en las placas de crecimiento de los huesos, y también en el endodermo primitivo y el intestino⁷⁵. De ellos, Shh es el miembro de la familia que está más ampliamente distribuido desde etapas tempranas del desarrollo, durante la organogénesis y en diversos tejidos adultos.

Procesamiento y sistema de secreción de las proteínas Hh

Una vez sintetizada la proteína Hh precursora (45 kDa) se transloca al lumen del RE en donde se escinde autoproteolíticamente para generar dos fragmentos: el extremo C-terminal (Hh-C) de 25 kDa que se transloca fuera del RE y se degrada mediante el proteasoma, y el fragmento activo N-terminal (Hh-N) de 19 kDa que entra a la vía secretora y se une covalentemente a una molécula de colesterol (en el extremo C-terminal) y un grupo palmitoil en la cisteína que está inmediata al péptido señal (del extremo N-terminal)⁷⁴. Estas modificaciones lipídicas son importantes para la secreción de la forma madura de la proteína y su actividad.

Por un lado, el colesterol facilita la asociación de Hh-N a la membrana plasmática. Así, una vez en la superficie externa de la membrana, el fragmento Hh-N modificado lipídicamente puede asociarse con la bicapa lipídica como monómero hasta que es liberado al espacio extracelular por un mecanismo donde participa Dispatched, una proteína de 12 pases transmembranales de la familia de proteínas transportadoras, o bien, Hh-N puede autoasociarse para formar multímeros solubles que se liberan de la membrana. Alternativamente, Hh-N puede ser liberado en la superficie en forma de exovesículas^{76,77}. Mientras que el grupo palmitoil se une a la cavidad hidrofóbica del dominio extracelular de Ptch, lo cual estabiliza el complejo ligando-receptor⁷⁸.

Transducción de la señal

El sistema de recepción de los ligandos Hh está constituido por dos proteínas transmembranales llamadas Patched (en vertebrados existen dos proteínas, Ptch1 y Ptch2), como receptor del ligando Hh, y Smoothened (Smo), como transductor de la señal. Patch es una proteína de 12 pases transmembranales, mientras que Smo es una proteína de 7 pases transmembranales con un alto grado de similitud a la familia de receptores acoplados a proteínas G^{74,75}.

En ausencia de ligando, Ptch bloquea la actividad de Smo y lo mantiene en una conformación inactiva previniendo su entrada al cilio primario, un organelo flagelar inmóvil presente en la mayoría de las células^{77,79} (**Figura 9**). Aunque el mecanismo por el cual Ptch inhibe a Smo aún es desconocido, se ha sugerido que Ptch no interactúa físicamente con Smo, sino que regula el transporte, síntesis y/o acceso a una o varias moléculas que afectan la actividad de Smo, como colesterol y sus derivados oxidados (oxiesteroles)^{80,81}⁸². La ausencia de Smo en el cilio primario, favorece que los factores de transcripción llamados oncogenes asociados a glioma (Gli-2 y 3) interactúen con el Supresor de Fused (Sufu), un regulador negativo de la vía de Hh que los secuestra en el citoplasma y esto permite su fosforilación secuencial por la proteína cinasa A dependiente de AMPc (PKA), caseína cinasa 1 alfa (CK1 α), y después por la glucógeno sintasa cinasa 3 β (GSK3)^{83,84}. Así, los motivos fosforilados son reconocidos por la proteína F-box BTRCP que forma un

complejo proteico con la proteína transducina (β TrCP), la proteína cinasa 1 asociada a la fase S (SKP1), la proteína cullina 1 (CUL1) y la ubiquitina ligasa E3 F-box (SCF); ésta última cataliza la ubiquitinación del extremo C-terminal de los factores Gli1 y 2, para su posterior procesamiento y degradación. La actividad de factores Gli2 y 3 depende del procesamiento proteolítico, es decir, éstos pueden actuar como activadores transcripcionales (GliA) cuando existe la forma completa de la proteína o como represores transcripcionales (GliR), forma truncada. Así el extremo N-terminal resultante del procesamiento de Gli mantiene el dominio de unión al ADN que se traslada al núcleo y se une a la secuencia consenso 5'-GACCACCCA-3' para reprimir la transcripción de genes blanco^{83,84} **(Figura 9)**.

En mamíferos existen tres proteínas Gli, Gli1,2 y 3; los tres son miembros de la familia de Gli-Kruppel y tienen cinco dominios de unión a ADN tipo dedos de zinc (ZNF). Los dominios ZNF4 y ZNF5 específicamente unen a 9 pb de una secuencia consenso 5'-GACCACCCA-3' localizada dentro de los promotores de genes blanco de Gli. Particularmente, los factores Gli2 y 3 son factores bifuncionales que pueden actuar como GliA o GliR. Sin embargo, cada miembro actúa de forma distinta, mientras Gli2 actúa preferentemente como GliA, Gli3 actúa como GliR. El tercer factor, Gli1, carece del dominio inhibitorio y actúa exclusivamente como activador amplificando la respuesta de Gli2^{84,85}.

Cuando ocurre la unión del ligando al receptor (Hh-Ptch) se induce la endocitosis de Hh-Ptch para su degradación y Smo es fosforilado por la CK1 y la cinasa de receptor 2 acoplado a proteína G (GRK2) y lo mueve a la membrana del cilio primario donde asume una conformación activa. En el cilio primario, Smo activo libera la supresión mediada por Sufu a los factores Gli2 y 3, y así la forma completa de Gli se transloca al núcleo e induce la expresión de genes blanco⁸⁶ **(Figura 9 y Tabla 2)**.

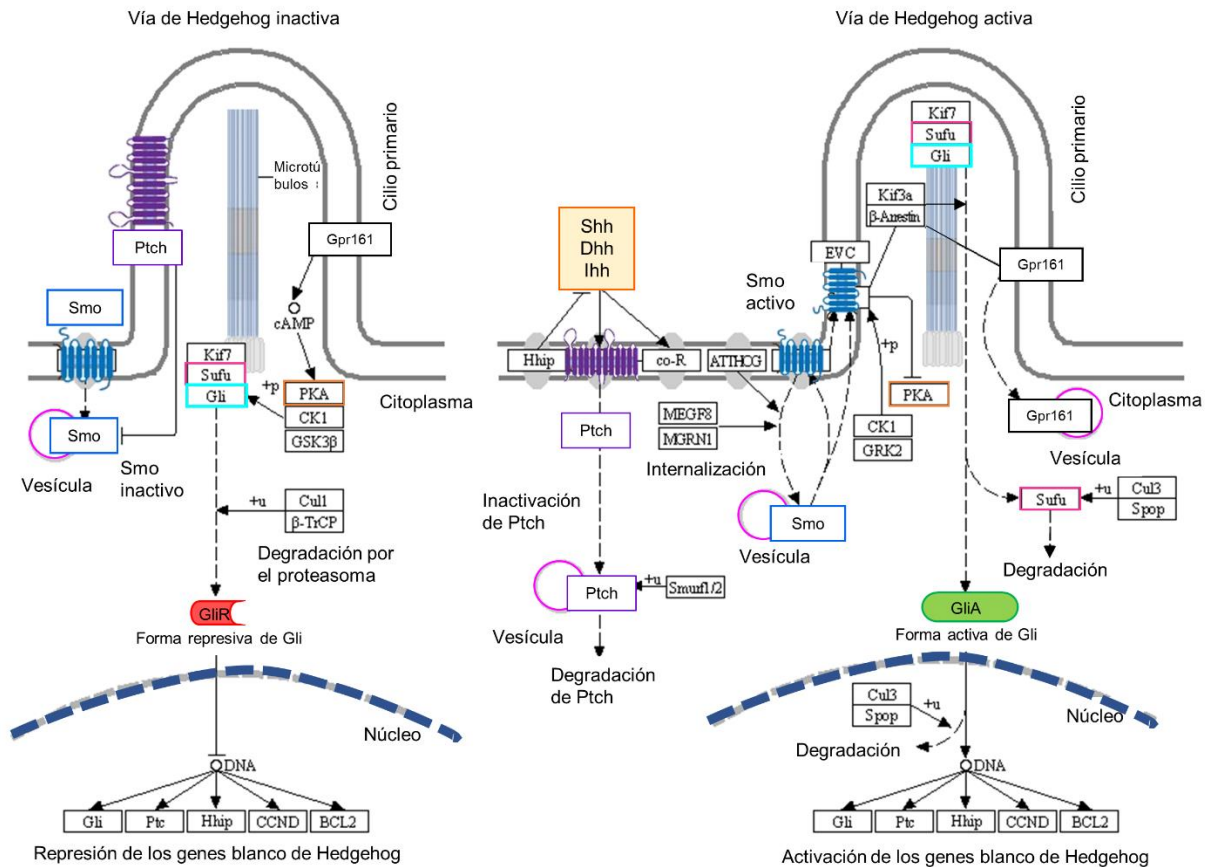


Figura 9. Activación de la vía de señalización de Hedgehog (Hh). La señalización de la Hh está asociada con el tráfico de proteínas en el cilio primario. **En ausencia de ligando**, cuando la vía está inactiva, Ptch se localiza en la base del cilio primario e inhibe la acumulación de Smo en el cilio inactivándolo. Los factores Gli1 y Gli3, en su forma completa (cuadro cian), son secuestrados por Sufu en citoplasma y fosforilados por PKA. CK1 y GSK3 β . GPR161 localizado en la base del cilio activa a la PKA incremento la concentración de AMPc y promueve la fosforilación de Gli2 y Gli3 para ser degradados por el proteasoma y dar a sus formas represoras (GliR). **En presencia de ligando**, Shh, Dhh o Ihh se une a Ptch1 e interacciona con otras proteínas de superficie celular, como Hhip1 (proteína que compite con Ptch por la unión con el ligando), y los coreceptores (Co-R): CDO/BOC y Gas1, para inducir la internalización de Ptch, provocando que Ptch y GPR161 sean desplazadas del cilio. Así, Smo se traslada al cilio en forma de complejo con la proteína EVC para transducir la respuesta de Hh. Smo activado libera de la represión mediada por Sufu a los factores Gli2 y Gli3 dentro del cilio (manteniendo su forma completa) para después ser translocados al núcleo e inducir la expresión de genes blanco de la vía. El movimiento de las proteínas Gli2 y Gli3 dentro del cilio se produce por la kinesina Kif7. Hhip1: proteína de interacción hedgehog; ATTHOG o MOMO; modulador de Smo; PKA: proteína cinasa A; CK1: caseína cinasa 1; EVC: Proteína del síndrome de Ellis-van Creveld, GSK3 β : glucógeno sintasa cinasa 3 β ; GPR161: receptor acoplado a proteínas G; Sufu: Supresor de Fused; GRK2: receptor 2 acoplado a proteína G; β TrCP: proteína transducina; Cul1: cullina 1. +p: adición de un grupo fosfato; +u: ubiquitinación. Imagen obtenida de 'KEGG PATHWAY Database' Kanehisa, M. 2000³⁷

Tabla 2. Genes activados por la vía de Shh-Gli1 y su función⁸⁷⁻⁸⁹

Gen	Proteína	Función
<i>BMP4</i>	Proteína morfogénica de hueso 4	Induce la formación de cartílago y hueso. Actúa en la inducción del mesodermo, desarrollo de los dientes, la formación de las extremidades y la reparación de fracturas.
<i>FGF4</i>	Factor de crecimiento de fibroblastos 4	Participa en la regulación del desarrollo embrionario, la proliferación y la diferenciación celular. Es indispensable para el desarrollo de las extremidades y de la válvula cardíaca durante la embriogénesis
<i>VEGF-A</i>	Factor de crecimiento endotelial vascular A	Factor activo en la angiogénesis, vasculogénesis y el crecer celular endotelial. Induce la proliferación de células endote promueve la migración celular e induce la permeabilización de los sanguíneos.
<i>MYCN</i>	N-myc protooncogen	Regula positivamente la transcripción de NCYM en células de neuroblastoma. Su amplificación se asocia con una variedad de tumores humanos, más frecuentemente neuroblastoma, donde el nivel de amplificación aumenta de acuerdo con la progresión del tumor.
<i>Ciclina D1</i>	Ciclina D1	Las ciclinas D promueven la progresión del ciclo en la fase G1 mediante la inactivación funcional de la proteína del gen del retinoblastoma (pRB), por fosforilación directa del sustrato. Su sobreexpresión se ha asociado al desarrollo de un gran número de tumores.
<i>GLI1</i>	Oncogén asociado a glioma 1	Actúa como un activador transcripcional. Media la señalización de SHH y por lo tanto la proliferación celular y la diferenciación.
<i>PTCH1</i>	Proteína patched homóloga 1	Actúa como un receptor para Shh, se asocia con la proteína smoothed (Smo) para la transducción de señal.
<i>MYOD1</i>	Proteínas determinación de mioblastos 1	Actúa como un activador transcripcional que promueve la transcripción de genes específicos de músculo e induce la diferenciación de fibroblastos a mioblastos.
<i>PAX</i>	Proteína caja pareada	Actúa como un activador transcripcional durante el desarrollo del cerebro y la organogénesis. Las mutaciones que conllevan a la pérdida y ganancia de la función causan síndromes hereditarios y la formación de tumores, respectivamente.
<i>BCL2</i>	Regulador de la apoptosis Bcl2	Regula la muerte celular mediante el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Inhibe la actividad de las caspasas mediante la prevención de la liberación de citocromo C de la mitocondria y/o mediante la unión al factor de apoptosis de activación (Apaf-1).

Participación de Shh en el desarrollo embrionario

Las alteraciones genéticas en la señalización de Shh han demostrado que es fundamental para el desarrollo embrionario del ratón; p. ej., los embriones mutantes carentes del gen de *Shh* (*Shh*^{-/-}) no sobreviven al nacimiento y muestran defectos en el desarrollo, incluyendo la malformación del sistema nervioso central (SNC), anomalías graves en el sistema esquelético, defectos en el desarrollo intestinal y pulmonar, lo que finalmente conduce a que los ratones no se desarrollen a término⁹⁰⁻⁹².

Shh induce diferentes destinos celulares para el control de la diferenciación celular en algunos tejidos durante la etapa embrionaria, lo cual en parte depende de su gradiente de concentración y tiempo de acción⁹³. En este sentido, en el desarrollo de la médula espinal, Shh actúa como un morfógeno clásico. Inicialmente Shh es sintetizada y secretada por la notocorda e induce la formación de la placa del piso del tubo neural; en la placa del piso, Shh es secretado y se difunde generando un gradiente a lo largo del eje dorso-ventral del tubo neural (mayor concentración en la región ventral y menor en la dorsal) provocando que las células precursoras neurales expresen distintos factores transcripcionales que especifican a interneuronas ventrales (V0-3) y motoneuronas^{94,95}.

Además de la función de Shh dependiente de la concentración, Shh también funciona como un morfógeno temporal para el establecimiento de la polaridad del brote de la extremidad. Se ha demostrado que la exposición breve a Shh especifica el patrón de dígitos, mientras que una exposición más prolongada es necesaria para el posterior crecimiento y expansión. En este caso, la duración de la exposición a Shh parece ser más relevante que el efecto del gradiente de concentración, ya que el tiempo de exposición dirige la identidad anteroposterior de la extremidad⁹⁶.

Participación de Shh en regeneración y renovación celular

Como ya se mencionó la regeneración es un fenómeno biológico que consiste en la restauración o el reemplazo de partes de un tejido u órgano en asociación al recambio natural o cuando éstos se han dañado⁹⁷. Se ha considerado que las vías de señalización

que participan en la regulación del desarrollo embrionario son reactivadas después de una lesión para inducir la regeneración de los tejidos^{66,72,73} y la vía de Shh ha sido implicada en el mantenimiento de las células troncales y progenitoras en tejidos adultos. Por lo anterior, esta vía de señalización se considera crítica para la regeneración de diferentes tejidos⁷².

En órganos como la piel que tienen una tasa elevada de autorenovación, la señalización de Shh regula las células troncales del folículo piloso en el adulto^{75,98}. En el folículo piloso, las células troncales del bulge residen en la región inferior del bulge del folículo; estas células proliferan y se diferencian en distintos linajes celulares y son responsables de la regeneración del ciclo del pelo. Durante fase del ciclo del pelo de expansión, anagen, Shh se expresa en la matriz folicular y actúa como un mitógeno que impulsa la regeneración⁹⁹ esto se debe a que las células que expresan a *Gli1* en el folículo durante la fase de reposo o telogen, tienen la capacidad de generar múltiples linajes celulares que contribuyen a la autorrenovación del folículo y la reparación de heridas¹⁰⁰.

Se ha descrito en ratones adultos que el bloqueo de la vía de Shh con anticuerpos anti-Shh boquea la progresión de la fase anagen y el crecimiento del pelo. Lo anterior indica que Shh es necesario para la función regenerativa de las células troncales del bulge. Por el contrario, la administración exógena de Shh provoca la inducción de la fase anagen de folículos pilosos y estimula el crecimiento del pelo¹⁰¹.

En otros tejidos, se ha reportado que Shh es altamente expresado por las células parietales para inducir la proliferación de células de la mucosa gástrica y mantener la mucosa gástrica¹⁰². En un estudio realizado por Tanaka y cols.¹⁰³, se evaluó la relación entre la velocidad de curación de la úlcera gástrica y los niveles de expresión de los RNAm de Shh e interleucina 1 beta (IL1 β). Los pacientes que se sometieron a una disección endoscópica de la submucosa, seguido del tratamiento con inhibidores de la bomba de protones, tuvieron un incremento en el nivel de expresión de Shh en la mucosa que rodea las úlceras, lo cual se correlacionó con la regeneración de la mucosa gástrica.

Otro ejemplo de regeneración es el músculo esquelético, ya que es uno de los pocos tejidos de mamíferos en el adulto capaz de regenerar después de una lesión. Lo anterior se debe a la presencia de las células satélite, una población de células troncales en el músculo¹⁰⁴. Estas células se mantienen en su mayoría inactivas bajo condiciones normales, pero en respuesta a una lesión, éstas pueden dar lugar a células capaces de reconstituir las miofibras del músculo. Durante la embriogénesis, la señalización de Shh tiene un papel importante en la inducción directa de factores miogénicos como MYOD1 (diferenciación miogénica 1) y Myf5 (factor miogénico 5), que son esenciales para la formación del músculo esquelético. En el adulto, Shh promueve en las células satélite su supervivencia y su proliferación, así, después de la lesión isquémica, Shh promueve la angiogénesis y aumenta el número de células satélite en la zona afectada para inducir la regeneración. Por el contrario, en animales lesionados la inhibición de Smo mediante el tratamiento con ciclopamina (CYC) resulta en fibrosis muscular y aumento de la inflamación¹⁰⁵.

Por lo anterior, después de una lesión, la función de Shh es esencial en la activación de las células troncales residentes del tejido dañado para iniciar el proceso de reparación, mediante la promoción de la supervivencia, la proliferación, migración, angiogénesis y la diferenciación celular.

Vía de señalización de Hedgehog y cáncer

Por su función, que involucra el control de la proliferación celular, supervivencia, diferenciación celular, angiogénesis, migración celular, y cambios de adhesión, la vía de Hh se ha asociado a contribuir a la iniciación, el crecimiento y el mantenimiento de células cancerosas^{70,106}.

La asociación de la activación de la vía de Shh con el cáncer se estableció inicialmente por la identificación de mutaciones que afectan al receptor Ptch como el causante de síndrome de Gorlin. Este síndrome está asociado con el incremento en la incidencia de carcinoma de células basales (CCB) y meduloblastoma^{107,108}. La participación de la vía de Hh en la carcinogénesis se ha confirmado en modelos animales

que sobre expresan los componentes de la vía como Shh y Gli, o bien, cuando constitutivamente se activa Smo o existe una mutación en Ptch¹⁰⁹⁻¹¹²; asimismo se ha demostrado su participación en distintos tipos de cáncer de origen humano como el de piel, cerebro, pulmón, próstata, mama y de origen hematopoyético¹¹³⁻¹¹⁷.

De acuerdo con su función en la vía de señalización de Hh, se puede considerar que Smo, Shh y Gli1/2 se comportan como oncogenes cuando mutaciones en ellos conducen a una ganancia de función, mientras que el papel de Ptch en la carcinogénesis corresponde al de un supresor tumoral, pues mutaciones que conducen a su pérdida de función muestran fenotipos cancerosos.

Mecanismos de activación de la vía Hedgehog en cáncer

De acuerdo con el contexto de activación de la vía de Hh se han propuesto cuatro mecanismos de activación en cáncer:

Tipo I. Activación independiente de ligando. Este mecanismo está asociado con la activación constitutiva de la vía de Shh en ausencia de ligando. En este caso las mutaciones afectan reguladores negativos de la vía como Ptch o Sufu, o las mutaciones conducen a la activación de Smo y Gli1 sin intervención del ligando⁸⁷. Estos fenómenos se han observado CCB y en ciertos meduloblastomas^{107,108}.

Tipo II. Vía de activación dependiente de ligando, autocrina. La desregulación de la vía que regula la liberación autocrina de Shh resulta en células tumorales que producen y secretan los ligandos Hh⁸⁷, como se ha observado en carcinoma de pulmón de células pequeñas, cáncer gastrointestinal y cáncer de próstata¹¹⁸⁻¹²⁰.

Tipo IIIa. Vía de activación dependiente de ligando, paracrina. La liberación de los ligandos Hh por parte de las células tumorales activa la vía de la señalización de Shh en células estromales y como consecuencia, estas últimas liberan moléculas (como factores de crecimiento y/o proangiogénicos) que favorecen un microambiente donde las células tumorales puedan progresar⁸⁷. Este mecanismo se ha observado en cáncer de páncreas¹²¹.

Tipo IIIb. Vía de activación dependiente de ligando, paracrina inverso. Este mecanismo surge como una respuesta paracrina dependiente de ligando en el que la vía de Shh de las células tumorales es activada por ligandos Hh secretados por las células del estroma⁸⁷, como se ha observado en linfoma maligno¹²².

Con respecto a los dos últimos mecanismos, se ha considerado que Shh producido y liberado al ambiente tumoral, por parte de las células tumorales o del estroma, o ambas, funciona para mantener las células troncales en estado proliferativo.

Inhibidores de la vía de señalización de Shh

Diversos estudios han demostrado la participación de la vía de señalización en el inicio y progresión de diversos tumores¹¹³⁻¹¹⁷, por ello el estudio de la vía ha tomado relevancia para bloquear el efecto de dos de sus efectores que están río abajo de Shh: el receptor Smo y los factores de transcripción Gli.

Antagonistas de Smo

Smo es un transductor de la señal Hh y por ello se ha convertido en un objetivo importante para el diseño de fármacos contra el cáncer. El conocimiento del funcionamiento de los inhibidores de Smo ha facilitado el diseño de nuevos y mejores antagonistas; estos antagonistas han sido dirigidos a inhibir dos procesos fundamentales para la activación de Smo y son: el tráfico de Smo hacia al cilio primario y el paso de activación que permite a Smo acceder a la maquinaria de señalización río abajo de Smo¹²³. De acuerdo con estos procesos se han identificado y diseñado fármacos inhibidores de Smo.

La **ciclopamina** (CYC) es un alcaloide aislado de *V. californicum* que induce ciclopía en embriones de vertebrados y ha mostrado ser un inhibidor de la vía de señalización de Hh. CYC se une al dominio extracelular rico en cisteínas (CRD) de Smo y evita el cambio de conformación necesario para su activación, pero induce la acumulación de Smo en los cilios¹²³⁻¹²⁵. Una amplia cantidad de estudios han mostrado que la CYC inhibe el crecimiento y la proliferación de células tumorales^{116,124,126,127}, así

como de distintos tumores (melanoma, colon, pancreático y de próstata) en modelos de ratón. Sin embargo, a pesar de que en los estudios se utilizaron distintos regímenes de dosificación y vías de administración, que incluyen inyección intraperitoneal (IP) y subcutánea, por sonda oral e infusión por bomba microosmótica, la CYC nunca alcanzó su potencial terapéutico, ya que causó efectos secundarios potentes, incluyendo pérdida de peso, deshidratación y muerte¹²⁸. Por ello, se han desarrollado nuevos derivados de la CYC para contender los problemas de solubilidad y estabilidad, los cuales mostraron ser prometedores.

El **vismodegib** o erivedge es el primer fármaco derivado de CYC creado por Roche/Genentech/Curis que se une a Smo para inhibir la vía de Shh y en el 2012 se aprobó por la Administración de alimentos y medicamentos (por sus siglas en inglés, FDA) como el primer medicamento para tratar el CCB⁸⁴. Sin embargo, otras empresas farmacéuticas han desarrollado otros antagonistas de Smo de uso clínico como: el sonidegib y el glasdegib, los cuales, al igual que el vismodegib han mejorado los problemas de estabilidad química, la solubilidad, la potencia, la selectividad, la biodisponibilidad, que tiene la CYC¹²⁹ y han demostrado su eficiencia terapéutica en distintos tipos de cáncer. Particularmente los estudios preclínicos para evaluar la eficacia del vismodegib como un agente antitumoral se ha demostrado que tiene eficacia en meduloblastoma, carcinoma hepatocelular, cáncer colorectal y pancreático. En uno de los primeros estudios clínicos¹³⁰ con 104 pacientes con CCB metastásico y localmente avanzado, el vismodegib mostró una eficacia parcial en 45% de los pacientes con CCB metastásico; mientras que en los pacientes con CCB avanzado el 21% respondieron competente al tratamiento (ausencia total de células tumorales en las biopsias tomadas). Sin embargo, se han reportado casos donde los pacientes, previamente tratados con vismodegib, presentaron resistencia al tratamiento como resultado de las mutaciones en Smo. Asimismo, otros fármacos como Sonidegib también se han reportado tumores resistentes al fármaco⁸⁴.

El **Itraconazol** (ITC) es un fármaco aprobado por la FDA por su actividad antimicótica que inhibe la síntesis de ergosterol al interactuar con la 14- α -desmetilasa (una enzima del citocromo P450 que es necesaria para la conversión del lanosterol a ergosterol). En el 2010 Kim y cols.,¹³¹ demostraron que el ITC impide la acumulación de Smo a la membrana del cilio primario, movimiento indispensable para la activación de Smo. En este mismo estudio, se reportó que el ITC suprime el crecimiento de células de meduloblastoma en el modelo de ratón *Ptch*^{+/-};*p53*^{-/-}. Posterior a este reporte han surgido diferentes estudios clínicos donde se ha demostrado la eficacia del ITC ante las células tumorales. En 19/29 pacientes con CCB, el ITC mostró una reducción de la proliferación celular en un 45% y una reducción del área del tumor en un 24%¹³². En cáncer de próstata el 33% y 68% de los pacientes tratados con dosis bajas (200mg/día) o con dosis altas (600 mg/día) de ITC, respectivamente, disminuyeron la expresión de Gli1 y esta se correlacionó con supervivencia de los pacientes libres de progresión de la enfermedad¹³³. Un efecto favorable del ITC también se observó en células tumorales de glioblastoma ya que inhibe su proliferación mediante la inducción de autofagia a través de la inhibición de la vía Akt1-mTOR¹³⁴. Estos y otros reportes han confirmado la eficacia del ITC para el tratamiento de células tumorales.

Inhibidores de Gli

Ya que los factores de transcripción Gli son los efectores finales de la vía de Hh, se han desarrollado otras moléculas dirigidas a Gli para contener con el crecimiento tumoral y resistencia terapéutica de los inhibidores de Smo. Los inhibidores **GANT58** y **GANT61**, son compuestos que bloquean a Gli1 y Gli2 al unirse específicamente al sitio de unión de la proteína Gli con el ADN¹³⁵. Particularmente GANT61 es más específico al unirse a Gli1 y Gli2 y más eficiente al disminuir la proliferación celular en un modelo de xenotrasplante con células de cáncer de próstata que GANT58. Sin embargo, hasta ahora no se han realizado estudios clínicos con GANT61¹²⁷.

ANTECEDENTES

Modelos murinos para el estudio del cáncer cervical

Los modelos animales son una herramienta importante para el estudio de distintas patologías que afectan al humano ya que permiten simular características de la enfermedad y estudiar los mecanismos que intervienen en un organismo completo. Para cáncer cervical existen pocos modelos donde se han podido representar los estadios de la enfermedad e involucran el uso de ratones transgénicos. El ratón K14-HPV-16, que expresa el genoma viral completo del HPV-16, fue el primer ratón generado para estudio del cáncer cervical¹³⁶. Posteriormente, se generaron los ratones que solo expresan el oncogén E6 (K14-E6) o el que solo expresa el oncogén E7 (K14-E7) y el ratón K14-E6/E7 que se generó por la cruce de los dos anteriores y expresa ambos oncogenes. En todos ellos se empleó el promotor de la citoqueratina 14 (K14) para dirigir la expresión de genes virales^{137,138}. Cabe mencionar que el ratón K14-HPV16 inicialmente se generó en el fondo genético de las cepas C57BL/6 o BALB/c y en los estudios posteriores los ratones transgénicos fueron en fondo genético FVB/N la cual es más susceptible a la carcinogénesis epidérmica¹³⁹.

La caracterización de estos ratones inició con el ratón K14-HPV16 el cual desarrolla diferentes grados de hiperplasia y/o displasia en varios sitios: en las orejas, en región facial y papilomas anales. Particularmente en la epidermis de la oreja, la hiperplasia leve progresa a hiperplasia extensa, seguida de displasia que se observa a los 5 meses de edad¹³⁶. Histológicamente en la piel de las orejas se observa aumento en el tamaño de las células individuales, las capas celulares se incrementaron entre tres y cuatro veces. Además, la evaluación de las células en proliferación de la capa suprabasal (BrdU⁺) se incrementa en un 25-35% en ratones de 5 meses de edad, comparada con los ratones de 1.5 meses¹³⁶. Posteriormente, con el estudio realizado por Elson y cols.,¹⁴⁰ empleando el ratón FVB/N K14-HPV16 se demostró el efecto de la dosis de 17βE2 (0.25, 0.10mg/60 días o 0.05mg/60 días) en la localización de los carcinomas en diferentes partes del tracto

genital, apareciendo más tumores en la zona de transformación (ZT) con dosis de 0,05 mg/60 días de 17 β E2 que en la vagina, pared vaginal y exocérvix.

Más tarde, en el 2003 en el estudio realizado por Riley y cols.,¹³⁷ se evaluó la contribución de E6 y E7 en la progresión de las neoplasias generadas en los diferentes modelos (K14-HPV16, K14-E6, K14-E7 y K14-E6/E7). En todos los ratones se implantaron tabletas subdérmicas de 0.05 mg de 17 β E2/60 días de liberación, y en el 83% de los ratones K14-HPV16 se observó desarrollo de carcinoma en el tracto genital, mientras que en los ratones K14-E6/E7 el porcentaje se incrementó al 95% y se mantuvo en el 80% de los ratones K14-E7. Histológicamente los K14-E7, K14-E6/E7 y los K14-HPV-16 tuvieron lesiones similares a NIC III y las regiones más sensibles al desarrollo fue el cérvix y vagina. Sin embargo, los ratones que expresaron solo E6 no desarrollaron carcinoma invasivo. Lo anterior demuestra que la expresión de E7, junto con el cofactor estradiol, es suficiente para inducir proliferación, hiperplasia y progresión neoplásica.

En los modelos estudiados se ha demostrado que la participación de los oncogenes del HPV y la cooperación del estradiol son importantes para inducir el cáncer cervical. Ya que el efecto del estradiol puede ser mediado por mecanismos dependientes o independientes del receptor de estrógeno. Chung y col¹⁴¹ usaron el ratón K14-E7 y el ratón nulo para receptor ER α (ER α ^{-/-}) para demostrar que el ER α es necesario para producir la carcinogénesis cervical, ya que los ratones transgénicos K14-E7/ER α ^{-/-} no desarrollaron algún grado de displasia. Además, empleando otra estrategia experimental donde solo se eliminó la expresión del ER α del estroma (pero no en el epitelio cervical) se confirmó que el ER α presente en células del estroma es necesario para la carcinogénesis cervical⁵³. Sin embargo, en ratones K14-E6/E7 donde se indujo cáncer cervical con 17 β E2 durante 6 meses, aunque el tratamiento por 1 mes con raloxifeno (un modulador selectivo de los receptores de estrógeno, que en el cérvix actúa como un antagonista) redujo la incidencia y la severidad del cáncer, el tratamiento no eliminó completamente las células neoplásicas ya que las células tumorales resurgen en 7/10 ratones luego de 3 meses sin el tratamiento con 17 β E2 y raloxifeno. Tomando en cuenta lo anterior, en otro experimento 6/8 ratones K14-E6/E7 tratados con 17 β E2 (6 meses) y

posterior con raloxifeno (4 mes) no presentan cáncer, por lo que el tratamiento continuo con raloxifeno previene el resurgimiento de las células neoplásicas¹⁴².

Por lo anterior, los ratones transgénicos K14-E6/E7 han proporcionado una herramienta experimental que ha permitido estudiar la participación de los oncogenes en la patología del cáncer cervical y han permitido observar la participación del estradiol para inducir el cáncer, así como el receptor nuclear ER α . Sin embargo, aún no se ha evaluado si el efecto del estradiol y los oncogenes activan otras vías de señalización que contribuyan al desarrollo del cáncer, lo cual abre una posibilidad de estudio.

Si bien la carcinogénesis en el cérvix se ha estudiado en modelos transgénicos de ratón que expresan los oncogenes E6/E7 en las capas basales del epitelio, donde se encuentran las células troncales, los oncogenes E6 y E7 en el epitelio infectado por HPV de pacientes se expresan en las capas suprabasales. Por tanto, estos modelos transgénicos, aunque inician un proceso carcinogénico en el cérvix, los mecanismos pueden diferir de lo que ocurre normalmente en las pacientes infectadas con HPV.

En nuestro grupo de laboratorio estudios previos realizados por Escalante-Alcande¹⁴³ y cols., Valencia C. y cols.,¹⁴⁴ han empleado el modelo de ratón transgénico Tg(K6b-E6/E7) que expresa los genes tempranos E6 y E7 del HPV-16 bajo el promotor del gen de la citoqueratina bovina 6kb (K6b) para estudiar la regeneración. Este ratón se generó considerando que la K6b: *i*) es expresada constitutivamente en las capas suprabasales de epitelios como la cavidad oral (lengua y paladar), esófago y el tracto genital femenino (exocérnix y vagina) y en la vaina exterior de la raíz del folículo piloso; *ii*) es inducida en la epidermis interfolicular bajo condiciones de hiperproliferación, como el proceso de reparación de heridas, soriasis y procesos tumorales, así como bajo tratamientos que promueven la hiperplasia epidérmica como el tratamiento con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) y ácido retinoico (RA)¹⁴⁵ y *iii*) por que el LCR del HPV coincide con los sitios de expresión de la K6b¹⁴⁶.

Reportes previos del grupo de trabajo han mostrado que las hembras jóvenes del ratón Tg(K6b-E6/E7) de la cepa CD1 y FVB/N de 7 semanas de edad, tienen una capacidad regenerativa aumentada comparada con los ratones silvestres y con los machos, como se observa en la formación de nuevos folículos pilosos y la reparación del daño en la oreja, lo cual está asociado al efecto de los oncogenes E6 y E7^{143,144}. Esta respuesta se evaluó después de inducir el reinicio del ciclo de crecimiento del pelo inducido por depilación y la herida realizada por una perforación en la oreja. Particularmente en las heridas realizadas en las orejas, los oncogenes E6 y E7 promovieron su regeneración (formación de nueva epidermis, folículos y cartílago)^{147,148} al incrementar la proliferación de precursores celulares y migración de células epidérmicas, así como favorecer la reepitelización, la cual ocurre más rápido que en los ratones silvestres; siendo este proceso uno de los factores que determina el éxito de la regeneración^{147,148}. De forma importante, la expresión de los oncogenes E6 y E7 del HPV-16 en estos ratones no causaron alguna anomalía visible en condiciones normales¹⁴⁴.

Con el objetivo de explorar el efecto del 17 β E2 para iniciar un proceso carcinogénico en el cérvix en el modelo Tg(K6b-E6/E7), se realizó recientemente el estudio por García C. y cols.¹⁴⁹ en el cual se demostró que no solo las hembras jóvenes de 6 semanas de edad regeneran, sino también las hembras adultas de 3 meses de edad de la cepa CD1 y FVB/N Tg(K6b-E6/E7) tienen la capacidad regenerativa aumentada. En este mismo estudio la ovariectomización o tratamiento con raloxifeno, que limitan la concentración de estradiol endógeno, disminuyó el cerrado eficiente de las perforaciones en las orejas. Lo anterior demuestra la importancia del estradiol y los oncogenes en la regeneración de la oreja.

Otra característica interesante observada en las hembras Tg(K6b-E6/E7) es que tienen la frecuencia de fases de crecimiento incrementada durante el ciclo estral (cantidad de proestros seguido de un estro [PE] que ocurren durante 19 días) comparada con los ratones silvestres. Además, se observó un incremento de las células en proliferación (Ki67⁺) durante la etapa proestro en las células suprabasales del epitelio cervical, las cuales están ausentes en los ratones silvestres. Bajo el tratamiento con 17 β E2 (0.5 mg/90

días) durante 50 días, en ratones silvestres y en los Tg(K6b-E6/E7), el número de células Ki67⁺ en el epitelio cervical se incrementó de un 28% a un 44%, cuando el tratamiento se prolongó por más de 1.5 meses. Sin embargo, cuando los ratones recibieron tratamiento con raloxifeno, el número de células Ki67⁺ disminuyó. Asociado a lo anterior, cuando se prolongó el tratamiento con 17βE2 durante 90 días, se observaron más frecuente hiperplasias, displasias e islas epiteliales que comúnmente se describen como carcinomas *in situ* en Tg(K6b-E6/E7) a diferencia de los ratones silvestres donde solo se observó engrosamiento del epitelio cervical¹⁴⁵.

El estudio del ratón Tg(K6b-E6/E7) en el contexto del cáncer y la regeneración ha permitido determinar la participación de las células que reingresan al ciclo celular en las capas suprabasales por efecto de los oncogenes E6 y E7 de HPV-16 y proponerlas como una fuente de origen del cáncer cérvico uterino ya que, como ocurre en el proceso de la regeneración, las células postmitóticas contribuyen al proceso de reparación por un mecanismo de desdiferenciación en células progenitoras¹⁵⁰. Lo anterior está sustentado en la similitud entre el proceso de regeneración, altamente regulado, y la carcinogénesis donde se pierde el control de distintos procesos como: la diferenciación, la desdiferenciación, la proliferación celular, la angiogénesis, las remodelación de tejido, y otros, que están mediados por vías de señalización altamente conservadas como la vía de Wnt/β-catenina, la vía de Hedgehog, la vía de Jagged/Notch, la del FGF y la vía del TGF-β^{151,152}.

Señalización de Hedgehog y cáncer cervical

La desregulación de la vía de señalización de Hh ha sido implicada en diferentes tipos de cáncer, incluyendo a los de origen epitelial como: el CCB, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de próstata^{113–117}. No obstante, en cáncer cervical existen pocos estudios que se han asociado a la vía de Hh.

La participación de la vía de Hh se estudió por primera vez por Xuan y cols.¹⁵³, en su reporte emplearon inmunohistoquímica para demostrar que la presencia de diferentes componentes de la vía de Hh (SHH, IHH, PTCH, SMO, Gli-1, Gli-2 y Gli-3) se incrementa (determinada por la intensidad de tinción de cada componente) conforme la enfermedad progresa de lesiones precursoras (NIC I-III) a carcinoma de células escamosas en tejidos procedentes de 106 pacientes. En tejido normal, SHH está localizado en las células basales del epitelio estratificado, mientras que IHH no se detectó. En este punto, es importante mencionar que se desconoce en la etapa del ciclo menstrual que se encontraba el cérvix obtenido. En cuanto a PTCH y SMO, PTCH se detectó en el tejido normal con baja intensidad de tinción, a diferencia de SMO que no se identificó por medio de IHQ. Para los factores GLI1 y GLI2, solo se observó la presencia de GLI2, y en menor abundancia la de GLI3, pero no la de GLI1 en el tejido normal. En conjunto estas observaciones sugieren que la progresión del cáncer cervical puede estar asociada al incremento en la actividad de la vía.

En otro estudio empleando biopsias de pacientes con carcinoma cervical avanzado, y muestras de tejido cervical normal, se compararon los niveles de expresión mediante RT-PCR de *SHH*, *IHH*, *PTCH1*, *PTCH2*, *SMO* y *GLI1* en el tejido normal y mostró que la mayoría de los tumores tienen niveles normales de *PTCH1/PTCH2* y *SMO*, mientras que para *SHH*, *IHH* y *GLI1* se observó un incremento en la expresión en todas las muestras¹⁵⁴.

Otro estudio donde se analizaron las alteraciones por delección y metilación del promotor, y por mutación y expresión del gen del receptor de *PTCH1*, durante el desarrollo del cáncer cervical en pacientes que resultaron positivas para los tipos HPV-16 o HPV-18, mostró que la frecuencia de delecciones en *PTCH1* fue del 11.5% de pacientes con algún grado de NIC, mientras que en las pacientes con cáncer cervical la frecuencia aumento al 46%. En cuanto a la frecuencia de metilación de la región distal del promotor de *PTCH1*, éste aumento al 31% en muestras con NIC I y al 58% en NIC III, lo cual sugiere que la metilación de la región distal del promotor de *PTCH1* es un evento que se inicia desde estadios tempranos del cáncer. Asimismo, la presencia (en la membrana y citoplasma) de moderada a alta de la proteína en el tejido normal adyacente

a la NIC I se incrementa gradualmente conforme al proceso de diferenciación: de la capa basal/parabasal hacia la capa suprabasal. A diferencia, en áreas displásicas de muestras con NIC, la localización en el citoplasma de PTCH1 fue baja en el 50% de las muestras, mientras que en las células terminalmente diferenciadas la presencia aumenta a moderada en el 70% de los casos. Para las muestras con cáncer cervical, la presencia de PTCH1 es reducida en el citoplasma en el 55% de las muestras¹⁵⁵.

Los estudios hasta ahora descritos muestran una asociación positiva entre incremento de expresión de los componentes de la vía y la progresión del cáncer cervical. Sin embargo, en el trabajo realizado por Vishnoi y cols.¹⁵⁶ se estudió la interacción de los oncogenes del HPV y la activación de la vía Hh. Empleando la línea celular de queratinocitos inmortalizados HaCaT y las líneas celulares de cáncer cervical humanas C33a (negativas para el HPV), SiHa (HPV-16), HeLa (HPV-18) y CaSki (HPV-16), demostraron que todas las líneas de cáncer cervical presentan las proteínas SHH, IHH, PTCH, SMO y SUFU; siendo los ligandos SHH e IHH los más abundantes comparado con la línea HaCaT. El tratamiento con CYC de manera dosis dependiente disminuye la viabilidad celular y, aumenta la cantidad de SMO y el ARNm de *GLI1* en las líneas C33a, SiHa y HeLa, siendo estas dos últimas las líneas más sensibles al tratamiento con CYC que la C33a. Debido a la susceptibilidad observada en las líneas SiHa y HeLa, éstas se trataron con 20 µM de CYC por 24h y mostraron una disminución de la expresión de la proteína E6, pero no de E7. De acuerdo con los autores, el silenciamiento de la expresión de E6 empleando pequeños ARN de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés) en células SiHa conduce a una disminución del nivel de transcripción *GLI1*, aunque, esto no ocurre cuando se silencia E7. Una observación importante en este punto es que HPV-16 expresa E6 y E7 de un solo ARNm policistrónico, lo que sugiere que la interferencia de dicho proceso transcripcional para E6 o E7 puede dar lugar a la disminución de ambas proteínas virales, E6 y E7. Sin embargo, el estudio no especifica la estrategia experimental empleada para lograr el silenciamiento de cada una de las oncoproteínas sin afectar la expresión de la otra. Pese a ello, el efecto de la inhibición de la vía de Hh

muestra claramente que las células derivadas de cáncer cervical son sensibles al tratamiento con CYC, por lo que la vía de Hh se vuelve un blanco terapéutico.

Los estudios anteriormente descritos y otros que se han realizado en torno a la asociación entre el cáncer cervical y la vía de señalización de Hh se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Estudios que muestra una asociación entre el cáncer cervical y la vía de señalización de Hh

Expresión de componentes de la vía	Biomolécula	Material biológico	Nivel de expresión	Observaciones	Ref.
SHH E IHH, PTCH Y SMO, GLI1, GLI2 y GLI3	Proteína	Tejido NIC I-III y carcinoma escamoso	Aumento en la expresión de los componentes de la vía conforme aumenta la progresión del tumor	La vía de señalización puede estar asociada a la carcinogénesis de cáncer cervical.	153
SHH, PTCH y GLI1	RNA <i>m</i> y proteína	Tejido NIC y cáncer cervical	La frecuencia de mePTCH y su delección en tejido normal es menor que en NIC I –III	Alteraciones PATCH se asocian con mal pronóstico en pacientes	155
SHH E IHH, PTCH y SMO	Proteína RNA <i>m</i>	Líneas celulares: C33a, SiHa, HeLa y CaSki	Aumento en la expresión componentes de la vía comparada con la línea	La CYC disminuye la expresión de SMO, GLI1 y E6	156
SHH, PTCH, SMO y GLI1	Proteína	Tejido	La expresión de SHH es superior en tumores pobremente diferenciados que en moderadamente diferenciados. Niveles de expresión de PTCH1 se correlacionan con el grado patológico del tumor, pero no la expresión de SMO. La expresión de GLI1 es baja en tumores moderadamente diferenciados que en los pobremente diferenciados.	La sobreexpresión de FOXM1 (un factor de transcripción asociado a la regulación de la progresión del ciclo celular, diferenciación, metástasis, invasión y angiogénesis) se asocia con la activación de GLI1 y SMO, y la progresión del cáncer cervical	157
SHH PTCH, GLI1, GLI2 y GLI3	RNA <i>m</i> y proteína	SiHa, HeLa y CaSki	Presencia de los componentes de la vía en todas las líneas.	SOX18, un gen asociado a la angiogénesis tumoral y linfangiogénesis, es regulado por GLI1 y 2 y su sobreexpresión promueve la migración y la invasividad de las células.	158

Nota: las letras mayúsculas se emplearon para referirse a las proteínas y en letra cursiva a los genes de humanos

Bioluminiscencia en organismos vivos

La detección de la bioluminiscencia se ha desarrollado en las últimas décadas como una herramienta para estudiar procesos biológicos *in vivo*. Se basa en la detección de luz visible producida durante la oxidación de un sustrato (Luciferina) cuando una enzima (luciferasa) es expresada como un reportero¹⁵⁹. Esta herramienta permite el análisis en tiempo real de diversos procesos como: monitorear vías de señalización, para estudiar interacciones hospedero-patógeno en modelos de infección, para estudiar crecimiento, metástasis de células tumorales, así como determinar y seguir la eficacia terapéutica en modelos tumorales de ratón^{159,160}.

El reportero más empleado en estos estudios es la luciferasa FLuc obtenida de la luciérnaga de Norte América (*Photinus pyralis*). Esta luciferasa emite fotones a una longitud de onda de 562 nm y requiere la administración del sustrato (D-Luciferina), la presencia de ATP, oxígeno y magnesio para su funcionamiento. Existen otras luciferasas como la RLuc (*Renilla reniformis*) que solo requieren el sustrato (coelenterazina) y la presencia de oxígeno, o bien, la luciferasa bacteriana (Lux) que funciona de manera autónoma y no requiere de la administración de un sustrato para emitir fotones¹⁵⁹.

Dado que la bioluminiscencia es empleada para monitorear vías de señalización; en este trabajo se usó el ratón Tg(Gli-Luc) para seguir la vía de señalización de Hh. El ratón Tg(Gli-Luc) se generó por inyección pronuclear con un transgén que contiene ocho sitios de unión al factor de transcripción Gli (5'-GAAGTGGGA-3') fusionados al promotor basal δ -cristalino y al gen de la luciferasa Fluc descrito previamente por Sasaki y cols¹⁶¹. Posteriormente, el estudio descrito por Curran y cols.¹⁶², mostró que el ratón Tg(Gli-Luc) presenta una señal robusta en embriones de 17.5 días post-coito (dpc, E17.5) en el cerebro y, particularmente, el tratamiento con Shh exógeno en fibroblastos de embriones de ratón de E13.5 activa la vía. Por otro lado, en ratones de 1, 7 y 14 días post natales (P7, P14) y en adultos jóvenes de 5 semanas de edad, la vía de Hh se muestra activada

en la piel y las extremidades, aunque la señal va disminuyendo conforme se incrementa su edad. A pesar de que se observa baja señal Gli-Luc después de 11 semanas de edad, en la piel, en órganos disecados como cerebro, hígado, pulmón, corazón y bazo se detectó una señal alta Gli-Luc. Asimismo, los antagonistas como la CYC (50 mg/kg) y el HhAntag (100 mg/kg) empleados en este estudio reducen significativamente la bioluminiscencia en ratones de P10-P14.

Dado que este ratón Tg(Gli-Luc) permite monitorear la respuesta de agonistas y antagonistas, y realizar determinaciones cualitativas y cuantitativas de procesos biológicos *in vivo* de la vía de Hh mediante la imagen de bioluminiscencia, su uso en el presente trabajo constituye una herramienta importante para determinar la actividad de la vía de Hh y la efectividad de antagonistas en un modelo de estudio de crecimiento del epitelio cervical *in vivo*.

JUSTIFICACIÓN

En el 2018, el cáncer cérvico uterino ocupó en México el tercer lugar entre los tumores malignos en la población femenina, con una incidencia del 11 % y una mortalidad del 5.8%. La infección por el HPV está asociada con el desarrollo del cáncer; sin embargo, la carcinogénesis del cáncer cervical es un proceso de múltiples pasos que involucra otros factores que contribuyen a la transformación maligna. Actualmente está bien reconocido la influencia de altos niveles de estrógeno como un cofactor para el inicio de la carcinogénesis cervical. Por otro lado, los mecanismos celulares y moleculares que participan en la regulación del crecimiento durante la embriogénesis, y que participan también durante el proceso de reparación y regeneración de tejidos, frecuentemente se encuentran alterados y están asociados con el proceso la tumorigénesis, o bien, en el mantenimiento del fenotipo maligno del cáncer cervical.

Se desconoce la participación de la vía de Shh durante las etapas normales de crecimiento del cérvix, y se conoce poco sobre su contribución en las etapas iniciales del cáncer cervical en modelos *in vivo*; asimismo, si existe una asociación entre esta vía con los oncogenes E6/E7 del HPV y el estradiol en cáncer cervical, por lo que el empleo de modelos animales como los ratones Tg(K6b-E6/E7) y el ratón Tg(Gli-Luc) permiten estudiar el proceso de regeneración de la herida realizada en la oreja, así como la fase inicial de la carcinogénesis cervical inducida por oncogenes E6/E7 del HPV-16 y el estradiol exógeno.

HIPÓTESIS

Los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano y la vía de señalización de Sonic Hedgehog contribuyen a la regeneración de la piel, la renovación del epitelio cervical y en las fases iniciales de la carcinogénesis cervical.

OBJETIVO

Determinar si la activación de la vía de señalización de Sonic Hedgehog participa en la regeneración de la oreja y el cérvix, así como en las etapas iniciales de la carcinogénesis inducida por estradiol en cooperación con los oncogenes E6 y E7.

Objetivos particulares

1. Determinar si durante el proceso regenerativo en la oreja promovido por los oncogenes E6 y E7 se activa la vía de Sonic Hedgehog.
2. Determinar si durante el crecimiento del epitelio cervical a lo largo del ciclo estral se activa la vía de Sonic Hedgehog en presencia o ausencia de los oncogenes E6 y E7.
3. Evaluar si la actividad de Sonic Hedgehog en el cérvix en presencia o ausencia de estradiol y su efecto en las fases iniciales de la carcinogénesis.

METODOLOGÍA

Animales

Se utilizaron ratones transgénicos de la cepa FVB/N Tg(K6b-E6/E7)-M8 y ratones Tg(Gli-Luc). El ratón Tg(K6b-E6/E7) fue generado por Escalante y cols¹⁴³. y expresa los oncogenes E6 y E7 del HPV-16 bajo el promotor de la citoqueratina K6b, mientras que el ratón Tg(Gli-Luc) fue generado por Sasaki y cols¹⁶¹. y donado por Dr. Tom Curran¹⁶². El ratón Tg(Gli-Luc) contiene un transgén compuesto por un promotor artificial que contiene 8 veces el elemento consenso de unión a Gli fusionados al promotor basal δ -cristalino y al gen de la luciferasa Fluc. El ratón Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7), heterocigoto para ambos transgenes, fue derivado de la cruce del ratón Tg(K6b-E6/E7) heterocigoto con el ratón Tg(Gli-Luc) homocigoto. Los ratones Tg(Gli-Luc) fueron genotipificados amplificando el fragmento que incluye la región promotora y el gen de la luciferasa mediante PCR usando los siguientes oligonucleótidos: 5'CGGGCGCGGTCCGGTAAAGT3' (sentido) y 5'AACAACAACGGCGGCGGGAAGT3' (anti sentido). Para el ratón Tg(K6b-E6/E7) se emplearon los siguientes oligonucleótidos: 5'CTCATCGATTACCTGCAGGATCAGCCATG3' (sentido) y 5'CTCGGATCGATACCCAG-CTGTAATCATGCATG3' (antisentido) que amplifican un fragmento del oncogén E7. Todos los ratones, así como los protocolos empleados, fueron mantenidos, tratados y seguidos de acuerdo con el protocolo aprobado por el comité de bioética del Instituto de Biotecnología.

Tratamientos

Se emplearon hembras Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(bK6-E6/E7) de 6 semanas de edad que se les implantó vía subcutánea una tableta de 0.05 mg de acetato de 17 β -estradiol (17 β E2 de Innovative Research of America, USA) de 90 días de liberación. Los ratones se trataron durante 50 o 90 días, se dio seguimiento a la actividad de la luciferasa y se adquirieron las imágenes de bioluminiscencia para su posterior análisis (ver

adelante). Para el tratamiento con 17 β E2 e inhibidores de la vía de la vía Hh, las hembras se trataron con: a) 75 mg/kg de itraconazol (ITC de Sporanox Janssen-Cilag, Belgium) o una solución vehículo que contiene 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD de Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) al 10% (w/v) que se administraron vía intragástrica (con una sonda intragástrica) durante 15 días (una vez por día), 35 días posteriores al tratamiento con 17 β E2. b) 10 mg/kg de ciclopamina (CYC de Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) que se administraron vía intragástrica durante 4 días (una vez por día) o su solución vehículo: buffer de citratos/fosfatos 0.1 M pH3 e HPCD al 10%. Ver preparación en Anexo 1.

Para evaluar el efecto del ITC en piel dorsal y en la herida de la oreja, las hembras Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(bK6-E6/E7) de 6 semanas se les administró el ITC dos veces por día por 9 días y los ratones se mantuvieron vivos hasta completar los 28 días.

Para evaluar el efecto de la CYC en el crecimiento del cérvix, durante la fase de proestro, a hembras Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(bK6-E6/E7) de 12 de edad se les administró una dosis inicial de 20 mg/kg y una segunda de 30 mg/kg 12 h posteriores durante 24h. Para determinar la proliferación celular, estos ratones se inyectaron una vez con 50 μ g/g de bromodesoxiuridina (BrdU) 2 h antes del sacrificio y posteriormente se realizó la disección del cérvix.

Cultivo de extremidades de embriones de ratón

El efecto de la CYC, ITC y un agonista de Smo (SAG) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, TX) también se evaluó en las extremidades de embriones de ratón de E10.5 (10.5 días postcoital). Las extremidades se colocaron en una placa de 12 pozos sobre una membrana de 0.22 micras Durapore GVPP (Millipore, Darmstadt, Alemania) la cual les permitió flotar sobre el medio DMEM, únicamente se colocó una gota de medio sobre las extremidades. Se colocaron 3 extremidades en cada condición de tratamiento con CYC 50 μ M, ITC 1 μ M y SAG 200nM, y como vehículo se usó dimetilsulfóxido (DMSO).

Las extremidades se mantuvieron en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C y se dio seguimiento de la bioluminiscencia a las 0, 4 y 8h posteriores al tratamiento. Para ello se adicionó medio DMEM con 100nM de D-Luciferina 15 min antes de cada captura de imagen. El experimento se realizó por triplicado y las condiciones de adquisición se describen más adelante.

Análisis del ciclo estral *in vivo* y *ex vivo*

La fase del ciclo estral se determinó realizando un análisis citológico de un frotis vaginal y mediante un análisis histológico del epitelio cervical. Para el análisis del frotis se realizó una tinción con hematoxilina-eosina (H&E) y se clasificaron de acuerdo con la composición celular característica para cada fase. Una vez determinada la fase del ciclo, se capturó la imagen de bioluminiscencia de las hembras, en la región ventral donde se localiza el cérvix (a esta determinación la denominamos *in vivo*). Luego de 4 semanas de análisis *in vivo*, las hembras se sacrificaron y se realizó la disección del cérvix, útero, vejiga y vulva, y de cada uno estos tejidos se adquirió la imagen de bioluminiscencia; a este análisis le llamamos *ex vivo*.

Para el análisis histológico del epitelio cervical se realizaron secciones histológicas longitudinales que comprenden el endocérvix, exocérvix y la zona de transformación de un grosor de 10 µm. Las muestras se clasificaron de acuerdo con las características histológicas de cada etapa del ciclo estral. Los mismos cortes histológicos se realizaron para las hembras que recibieron tratamiento con 17βE2 o en combinación con ITC o CYC. Todas las secciones histológicas se tiñeron con H&E o se congelaron a -80°C para realizar la inmunodetección de Ki67, BrdU o hibridación *in situ* (ver descripción más adelante).

Para el análisis del cérvix en cultivo de corta duración, el cérvix se disecó y se cortó longitudinalmente para obtener dos fragmentos del mismo cérvix. Los fragmentos se sumergieron en medio Williams conteniendo DMSO como vehículo o 50 μ M de CYC o 10 μ M de ITC y se cultivaron hasta por 24 h en un ambiente humidificado con 5% de CO₂ a 37°C.

Ensayo de regeneración

Se emplearon hembras Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(bK6-E6/E7) de 12 semanas de edad las cuales se anestesiaron con avertina (400 mg/kg) y se les realizó una perforación de 2 mm de diámetro en el centro de ambas orejas con el punzón 'Harris micro punch' (Fisher Scientific, Hampton, USA). La perforación siempre se realizó en la fase de diestro. La actividad de la luciferasa *in vivo*, (ver más adelante) se siguió durante los días 0, 1, 4, 7, 14, 21 y 28 después de realizar la perforación. El diámetro de la herida se midió 28 días después de realizar la perforación y el porcentaje de regeneración en las orejas se clasificó en 4 categorías: diámetro de 0-0.6 mm, >91%; 0.7-1.2 mm, 61-90%; 1.3-1.7 mm, 30-60% y 1.8-2 mm, <30% de regeneración.

Imagen de bioluminiscencia *in vivo*

Los ratones, independiente de su tratamiento previo, se inyectaron vía intraperitoneal (IP) con 150 mg/kg de D-luciferina (Gold Biotechnology, St. Louis, MO EUA) y la imagen de bioluminiscencia se capturó 5 min después de la inyección con una cámara CCD instalada en el equipo 'In-vivo Xtreme' (Bruker, Billerica, Massachusetts) con los siguientes parámetros: 12 cm² de campo de visión (7.5 cm² para el caso de cérvix disecado y las extremidades), un 'binning factor' de 4, apertura 1 de f/stop, filtro abierto y un tiempo de adquisición de 3 min.

Para cuantificar la señal de bioluminiscencia se definió una región circular manualmente como área de interés al alrededor de la perforación en la oreja, en el área abdominal correspondiente a la región del aparato reproductor femenino, o el cérvix disecado (*ex vivo*). La intensidad de la señal, correspondiente a la actividad de Gli, se expresó como la suma total del flujo de fotones (p/s/mm²). Las imágenes se procesaron y la emisión de fotones se cuantificó con el 'Software Molecular Imaging' (Bruker, Billerica, Massachusetts).

Immunodetección de Ki67

Las secciones de tejido cervical, previamente almacenadas a -80°C, se descongelaron y se cortaron longitudinalmente utilizando el criostato Lica CM1850 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania) y se obtuvieron secciones de 10µm. Las secciones se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% y después de 3 lavados con TBS, se trataron con una solución de permeabilización conteniendo Triton X-100 al 0.1% y H₂O₂ al 0.3% en TBS a temperatura ambiente (TA) durante 15 min. Después, las secciones se incubaron con HCl 1N durante 20 min y se neutralizaron con buffer de boratos 0.1M durante 10 min. Posteriormente, se recuperó el antígeno empleando 'ImmunoDNA Retriever Citrate' (Bio SB, CA, USA) y se incubó a 60°C por 30 min. Para el bloqueo de uniones inespecíficas, las secciones se incubaron con suero de cabra al 10%, Triton X-100 al 0.1% en TBS durante 30 min y después se incubaron con el anticuerpo anti-Ki67 a una dilución de 1:50 (ThermoFisher Scientific, Pittsburgh EUA) hecho en conejo a 4°C durante toda la noche. Se realizaron tres lavados con TBS y las secciones se incubaron con el anticuerpo anti-conejo marcado con el fluoróforo Alexa 488 a una dilución de 1:500. Finalmente, las secciones se contratiñeron con DAPI a una dilución de 1:5000 y se montaron con 'ProLon Gold' (ThermoFisher Scientific). Las imágenes se adquirieron con un microscopio invertido Zeiss Apotome Axio Observer Z1.

Immunodetección de BrdU

Las secciones de tejido cervical, previamente almacenadas a -80°C , se descongelaron, se cortaron longitudinalmente utilizando el criostato Leica CM1850 y se obtuvieron secciones de $10\mu\text{m}$. Las secciones se fijaron con PFA al 4% y después de 3 lavados con TBS se trataron con una solución de permeabilización conteniendo Triton X-100 al 1% y H_2O_2 al 0.3% en TBS a TA durante 15 min. Después, las secciones se incubaron con HCl 2N en TBS durante 20 min a 37°C , se lavaron con TBS por 5 min y se neutralizaron con buffer de boratos 0.1M durante 10 min a TA. Los tejidos se trataron con tripsina al 0.001% durante 5 min a 37°C , luego se lavaron con H_2O destilada por 1 min y posteriormente se recuperó el antígeno empleando 'ImmunoDNA Retriever Citrate' (Bio SB, CA, USA) que se incubó 25 min a 65°C . Para el bloqueo de uniones inespecíficas, las secciones se incubaron con suero de conejo al 10%, Triton X-100 al 0.1% en TBS durante 1 h y después se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-BrdU a una dilución de 1:50 (BD BioSciences, California EUA) hecho en ratón a 4°C durante 1 h a TA y después toda la noche. Se realizaron tres lavados con TBS y las secciones se incubaron con el anticuerpo anti-ratón marcado con el fluoróforo Alexa 488 a una dilución de 1:1000. Finalmente, las secciones se contratiñeron con DAPI a una dilución de 1:5000 durante 15 min y se montaron con 'ProLon Gold' (ThermoFisher Scientific). Las imágenes se adquirieron con un microscopio invertido Zeiss Apotome Axio Observer Z1.

Hibridación *in situ*

Las sondas sentido y antisentido para las secuencias de ratón de *Shh*, *Gli1* y *Gli3* se obtuvieron por transcripción *in vitro* T3 y T7 usando el kit 'DIG RNA labeling' de Roche (Mannheim, Alemania). Los tejidos fueron inmediatamente congelados a -80°C y posteriormente se cortaron con el criostato marca Leica CM1850 a un grosor de $10\mu\text{m}$ y se fijaron con PFA al 4% en PBS-DEPC por 10 min, después de lavar con PBS-DEPC, las secciones se trataron con solución de acetilación (Trietanolamina.Cl 0.1M, HCl 0.06 M y anhídrido acético al 0.25%) para facilitar la penetración de la sonda y se incubó a TA

durante 10 min. Posteriormente, se incubaron con la solución de hibridación (formamida al 50%, SSC 5X, tARN de levadura 500 µg/mL y solución de Denhardt 1X) a 42°C por 1h. Luego, las sondas se incubaron a una concentración de 1 µg/mL con el tejido a 42°C durante toda la noche. Después de lavar las secciones con: SSC 0.1X a 48°C una vez, SSC 0.1X dos veces a 37°C y SSC 2X una vez a TA (10 min cada lavado), las secciones se incubaron con solución de bloqueo del 'kit Dig DNA Labeling' (Borhringer, Alemania) a TA durante 1h y posteriormente con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina 1 h a TA. Para el revelado se empleó NBT/BCIP (Nitro-Azul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato). Un color purpura fue indicativo de señal positiva. Las sondas sentido, se emplearon como control negativo en todas las hibridaciones; con el protocolo implementado, no generaron señal positiva. Las imágenes se adquirieron en un microscopio óptico Olympus BX51.

Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron con la media aritmética \pm EE (error estándar). La prueba de Fisher se empleó para el análisis de los datos de regeneración en la oreja perforada. Para el análisis de los datos de intensidad de bioluminiscencia durante la regeneración de la oreja los días 0, 4 y 7, se aplicó la Prueba de t no pareada. La prueba Mann Whitney se aplicó para datos que no tuvieron una distribución normal como: los resultados entre el grupo de cérvix en la etapa de diestro y proestro, tanto *in vivo* como *ex vivo* en ambas ratonas Gli-Luc y Gli-Luc;Tg(K6b-E6/E7) y la cuantificación de los las células Ki67⁺. En todas las pruebas aplicadas se consideró un nivel de significancia <0.05. El análisis estadístico se realizó empleando el 'software Graph Pad Prism' versión 6 (La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS

La vía de señalización de Hh se activa durante la regeneración de la oreja.

En la piel la proliferación celular se induce después de causar un daño¹⁶³. Este efecto es particularmente evidente después de realizar perforaciones en la oreja, y la evaluación del cerrado de ellas permite estimar el crecimiento del tejido de manera sencilla^{144,149}. Previamente, nuestro grupo de investigación ha mostrado que el estradiol y los oncogenes E6/E7 mejoran marcadamente la eficiencia del cerrado de las perforaciones¹⁴⁹, por lo que es posible correlacionar este efecto en el crecimiento tisular con la actividad de Hh. Por ello, y para determinar si durante el proceso regenerativo en la oreja participa la activación de la vía de Hh en presencia de los oncogenes E6 y E7 decidimos monitorear, *in vivo*, la activación transcripcional de Gli (común cuando se activa la vía de Hh) a través de la actividad de la luciferasa en ratones Tg(Gli-Luc). Para ello empleamos ratones homocigotos para el transgén Gli-Luc que se cruzaron con los ratones heterocigotos de la línea transgénica Tg(K6b-E6/E7) y así producir ratones transgénicos Tg(Gli-Luc) heterocigotos y los dobles transgénicos Tg(GliLuc);Tg(K6b-E6/E7) (**Figura 10A**).

Como mencionamos anteriormente, en estudios previos se ha observado que el cerrado de la oreja en ratones Tg(K6b-E6/E7) ocurre en 28 días por lo que, siguiendo el mismo esquema de inducción de la regeneración (**Figura 10B**), se determinó la actividad de Gli en las orejas perforadas de ratonas Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) a lo largo de 28 días (**Figura 10C**). En concordancia con la activación de la vía de Hh y en asociación al crecimiento del tejido, la actividad de Gli se incrementó en las fases iniciales del cerrado (de 1 a 7 días) y paulatinamente fue disminuyendo hasta el momento en que el crecimiento fue mínimo (a los 28 días) (**Figura 10D**). Si bien la actividad de Gli, no fue marcadamente mayor durante la regeneración de las orejas de los ratones Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7), sí alcanzó su máximo días antes (día 4 vs día 7) que la determinada en las orejas en regeneración de los ratones Tg(Gli-Luc) (**Figura 10C y 10D**), lo cual fue

en coincidencia con la mayor eficiencia de cerrado observada en estos ratones (**Figura 10E y 10F**). Estos hallazgos sugieren que la vía de Hh se activa en respuesta al crecimiento inducido por un daño y en el proceso de regeneración en las orejas inducida por la presencia los oncogenes E6/E7.

La vía de señalización de Hh se activa durante las etapas de crecimiento del epitelio cervical, proestro y esto, del ciclo estral

El ciclo estral es un proceso dinámico con amplia variabilidad en la duración de sus fases ¹⁶⁴. El estradiol es un importante regulador del ciclo estral y se encuentra elevado en las etapas de mayor crecimiento de proestro y esto (PE)¹⁶⁵. Además de ser un regulador natural del ciclo, estudios realizados por otros grupos de investigación y el nuestro, han mostrado que esta hormona influye positivamente sobre el crecimiento epitelial, tanto de la epidermis como del epitelio cervical ^{138,139}. Particularmente los estudios realizados por nuestro grupo, han demostrado que, en presencia de los oncogenes E6/E7, el 17 β E2 altera la duración de las fases del ciclo incrementando significativamente el número de ciclos¹⁴⁹.

Para realizar el diagnóstico de la activación de la vía de Hh durante el ciclo estral tanto en la piel como en el cérvix, se determinó la etapa del ciclo con base en la composición celular de un lavado vaginal (**Figura 11A**) y se dio seguimiento *in vivo* durante 28 días (**Figura 11B**). Se puede observar que la bioluminiscencia debida a la actividad de Gli en todo el cuerpo de las ratonas fue más elevada en las fases de crecimiento (proestro y esto, PE) en comparación con las fases de degeneración/reposo (metaestro y diestro) en ambos grupos de ratonas, siendo notablemente mayor en aquellas que expresan los oncogenes E6/E7 (**Figura 11B y 10C**). Este incremento en la actividad de Gli, además de ser evidente en la piel, también ocurrió en el área correspondiente al aparato reproductor de las hembras, (**Figura 11B**, vista ventral).

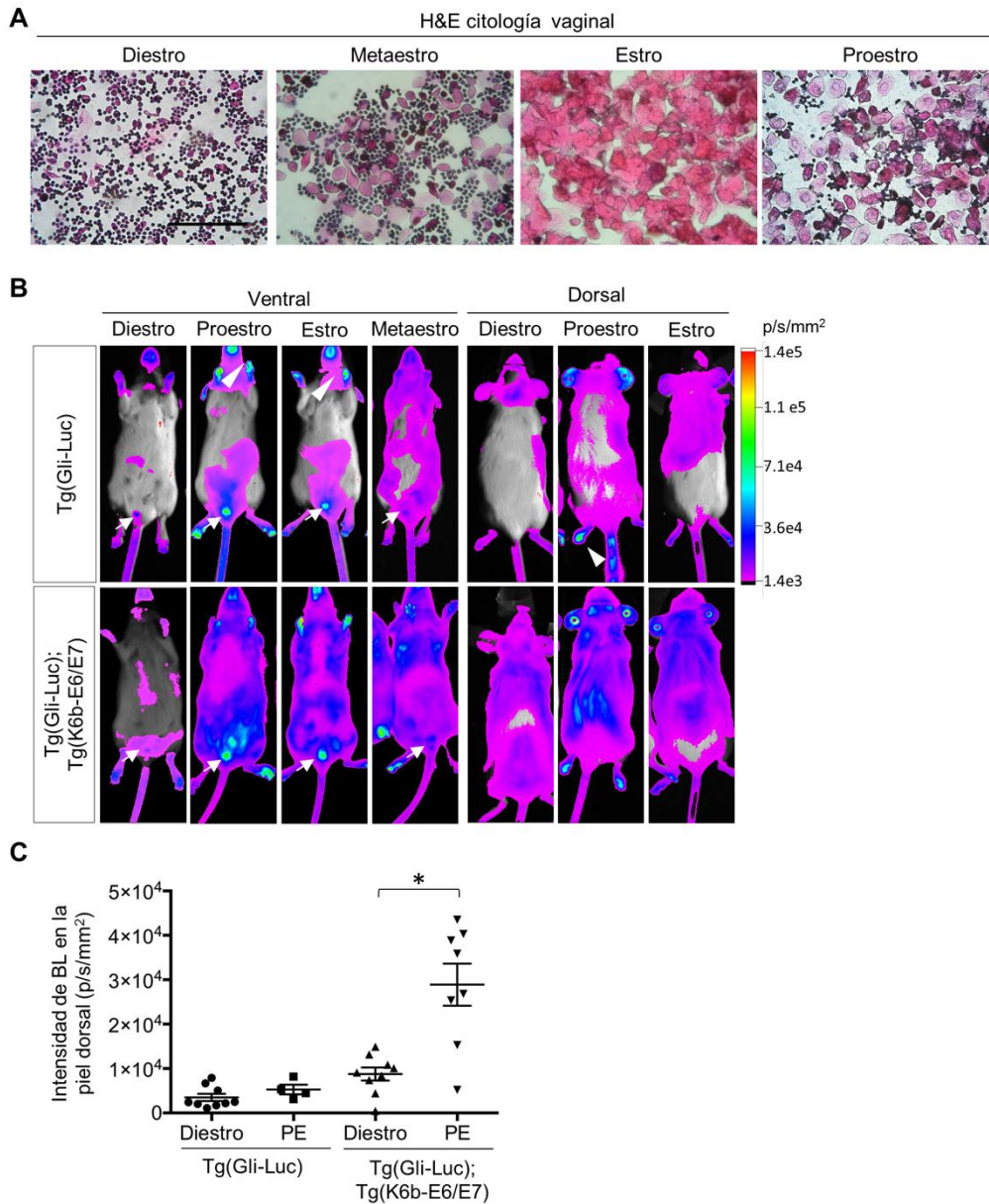


Figura 11. Activación de la vía de Hedgehog durante el ciclo estral en la piel. A. Imagen representativa de la tinción con H&E del lavado vaginal de las diferentes etapas del ciclo estral en hembras Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). **B.** Empalme de fotografía e imagen de bioluminiscencia (BL) de hembras de ambos genotipos en diferentes etapas del ciclo estral, vista ventral y dorsal. Las flechas indican áreas de mayor intensidad de BL y actividad de Gli. **C.** Cuantificación de la BL en piel dorsal en etapa de diestro vs las etapas proestro y estro (PE) de ratonas Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). Media \pm EE, *p = 0.0007. Barra de calibración=100 micras.

Para determinar qué tejido del área del aparato reproductor produce la mayor parte de la actividad de Gli observada *in vivo*, las hembras se sacrificaron pasando 28 días y se disecó el útero, cérvix, vejiga y vulva. Interesantemente, el cérvix fue la región con mayor actividad en la etapa de estro, (**Figura 12A**). Dado que el análisis global de todas las muestras disecadas se consideró que la activación de la vía ocurre en el cérvix, y que la determinación del ciclo estral fue mediante la citología vaginal, cada etapa del ciclo se verificó mediante el análisis histológico del epitelio cervical, (**Figura 12B**). Las etapas del ciclo estral de mayor grosor del epitelio cervical estratificado, como se puede observar en la **Figura 12B**, corresponden al proestro y estro, mientras que las etapas de reposo como diestro muestran un epitelio delgado, o bien, como en el caso del metaestro que presenta infiltración de leucocitos. Si bien, normalmente en la etapa de diestro de las hembras Tg(Gli-Luc) encontramos un epitelio delgado, es importante destacar que en las hembras que expresan los oncogenes E6/E7 este epitelio se encontraba más engrosado en esta etapa. En cuanto a la actividad de Gli observada en cada una de las etapas, es evidente que tanto *in vivo* como *ex vivo* (**Figura 12B, C**) en el cérvix de las ratonas Tg(Gli-Luc) en estro y proestro se muestra claramente una mayor actividad de Gli que en el diestro, y esta diferencia es aún mayor en las muestras de los ratones que expresan los oncogenes E6/E7 (**Figura 12B y 12C**).

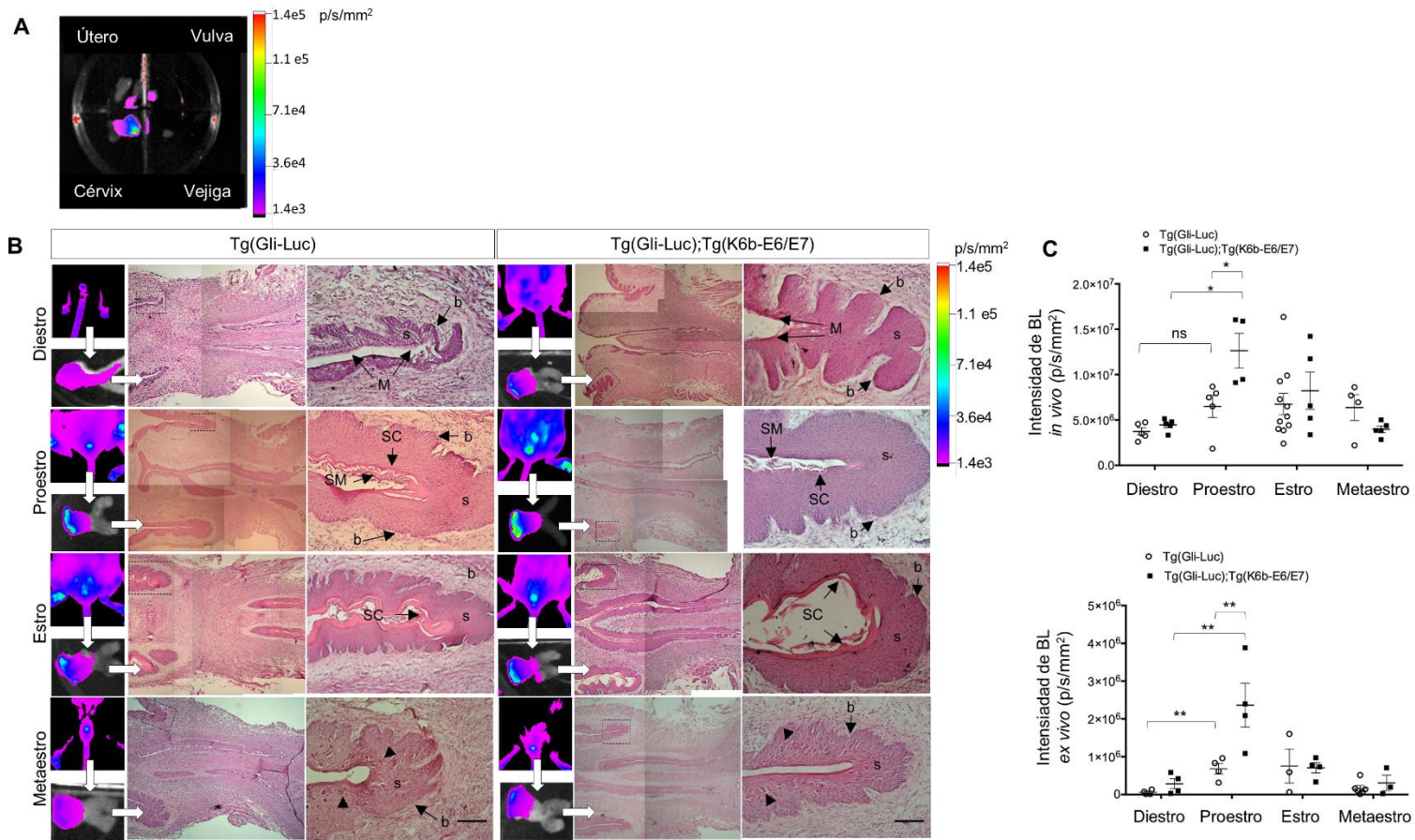


Figura 12. Activación de la vía de Hh en el cérvix durante el ciclo estral. A. Imagen de bioluminiscencia (BL) obtenida del útero, vulva, cérvix y vejiga disecado de ratones Tg(Gli-Luc). **B.** Imagen de BL *in vitro* e *in vivo* y tinción con H&E del tejido cérvico uterino. Muestra las características histológicas del epitelio cervical en las etapas del ciclo estral de ratonas Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). b: capa basal; s: capa suprabasal; SM: estrato mucinoso; SC: estrato corneo; M: mucificación; cabeza de flecha: células polimorfonucleares en la etapa metaestro. **C.** Cuantificación de la actividad de Gli en el área cervical *in vivo* y *ex vivo*. Media \pm EE, ns: no significativo; * $p=0.0286$ y ** $p=0.0159$. Los símbolos geométricos indican el número de individuos analizados por cada etapa del ciclo. Barra de calibración=100 micras.

Para demostrar que tanto el ligando Shh como el factor de transcripción Gli1, que es responsivo a la actividad de la vía, están presentes en el epitelio cervical, realizamos una hibridación *in situ* (ISH, por sus siglas en inglés) para el ARNm de *Shh* y *Gli1* observando que la expresión de ambos no está restringida a la capa basal del epitelio cervical durante la etapa de crecimiento, y su distribución es en gradiente hacia las capas suprabasales, (**Figura 13A**). Esta distribución se observó de manera independiente a la presencia de E6/E7.

Dado los resultados observados *in vivo*, donde se mostró que la actividad de Gli se correlaciona con el crecimiento del epitelio cervical, se empleó CYC, tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro*, el cérvix en la etapa de proestro se cultivó durante 24 h con CYC. Al monitorear el progreso de la inhibición de la actividad de la vía, cada 4 h, se observó que después de las 8 h de cultivo el tejido se vuelve lábil y progresivamente en éste se va perdiendo la actividad de Gli, independientemente de la presencia del inhibidor. Por ello, se muestra la evaluación a las 8 h que resultó suficiente para demostrar el efecto inhibitorio de la CYC en el cérvix disecado (**Figura 13B**) y por tanto la activación de la vía de Shh en el cérvix.

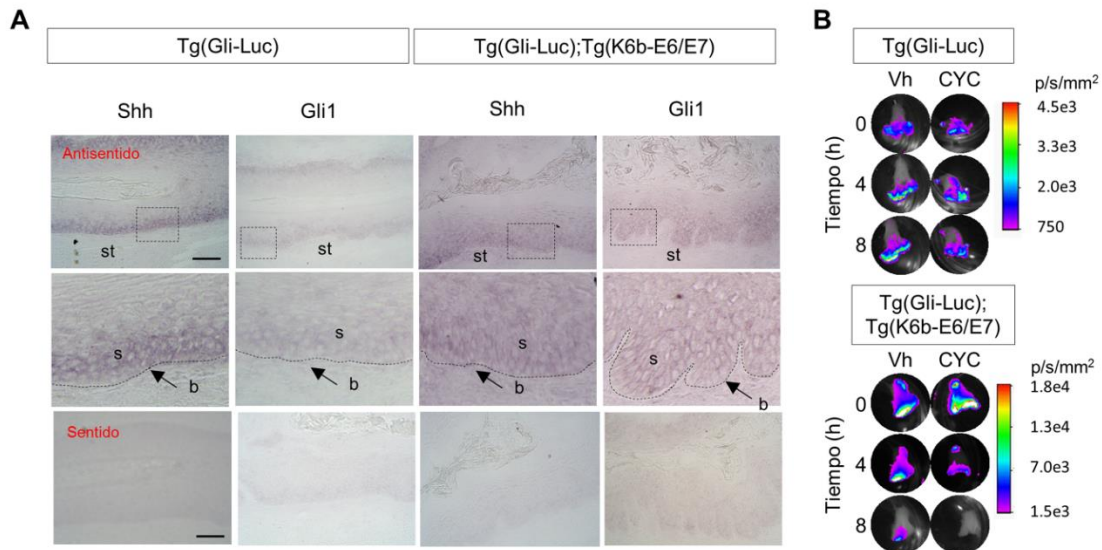


Figura 13. Expresión del ligando Shh y el factor de transcripción Gli1 en el epitelio cervical. A. Hibridación *in situ* de la expresión del mRNA de *Shh* y *Gli1* en el epitelio cervical de ratones Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). b: capa basal; s: capa suprabasal; st: estroma. Resultado positivo (color púrpura) de la sonda antisentido, se muestran las imágenes de la sonda sentido como control negativo de la ISH. **B.** Efecto del tratamiento con ciclopamina (CYC) en el cérvix disectado durante 8 h de cultivo. Imagen de BL representativa de 3 cérvix disecados de cada genotipo. Barra de calibración=100 micras.

Sin embargo *in vivo*, el tratamiento de ratones con dos dosis de CYC durante 24 h durante la etapa de mayor crecimiento (proestro) no disminuyó la intensidad de bioluminiscencia en el cérvix de ratones Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7), (**Figura 14A y 14B**). No obstante, se observó un cambio en la distribución de expresión de ARNm de *Gli1* por ISH con respecto a los ratones tratados con el vehículo; observando que el dominio de expresión en el epitelio era menor con el inhibidor comparado con el vehículo, es decir, la señal detectada por ISH se restringió más a la capa basal y disminuyó en la capa suprabasal (**Figura 14A**).

Para determinar si la inhibición de la vía de Shh con CYC tiene un efecto en la proliferación en las células del epitelio cervical, se evaluó la marca debida a la incorporación de BrdU y la detección la proteína Ki67 en el tejido. Se observó que la incorporación de BrdU y la detección de células Ki67⁺ basales/parabasales resultó menor en los ratones tratados con CYC que el grupo control en todas las regiones del epitelio cervical evaluadas: exocérnix, endocérnix y zona de transformación en presencia o ausencia de los oncogenes E6 y E7 (**Figura 14C**). También se observó que el número de células suprabasales BrdU⁺ y Ki67⁺, presentes únicamente en el ratón Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7), disminuyen en presencia de CYC (**Figura 14D**). Por lo tanto, estos datos indican que la vía de Hh se activa durante el recambio natural del cérvix, probablemente mediada por Shh y su inhibición disminuye el número de células proliferantes, como ocurre en otros epitelios como la piel. Además, la presencia de los oncogenes E6/E7 del HPV en el epitelio cervical favorecen la proliferación de células suprabasales, ausentes en los ratones silvestres, e incrementan la actividad de Gli.

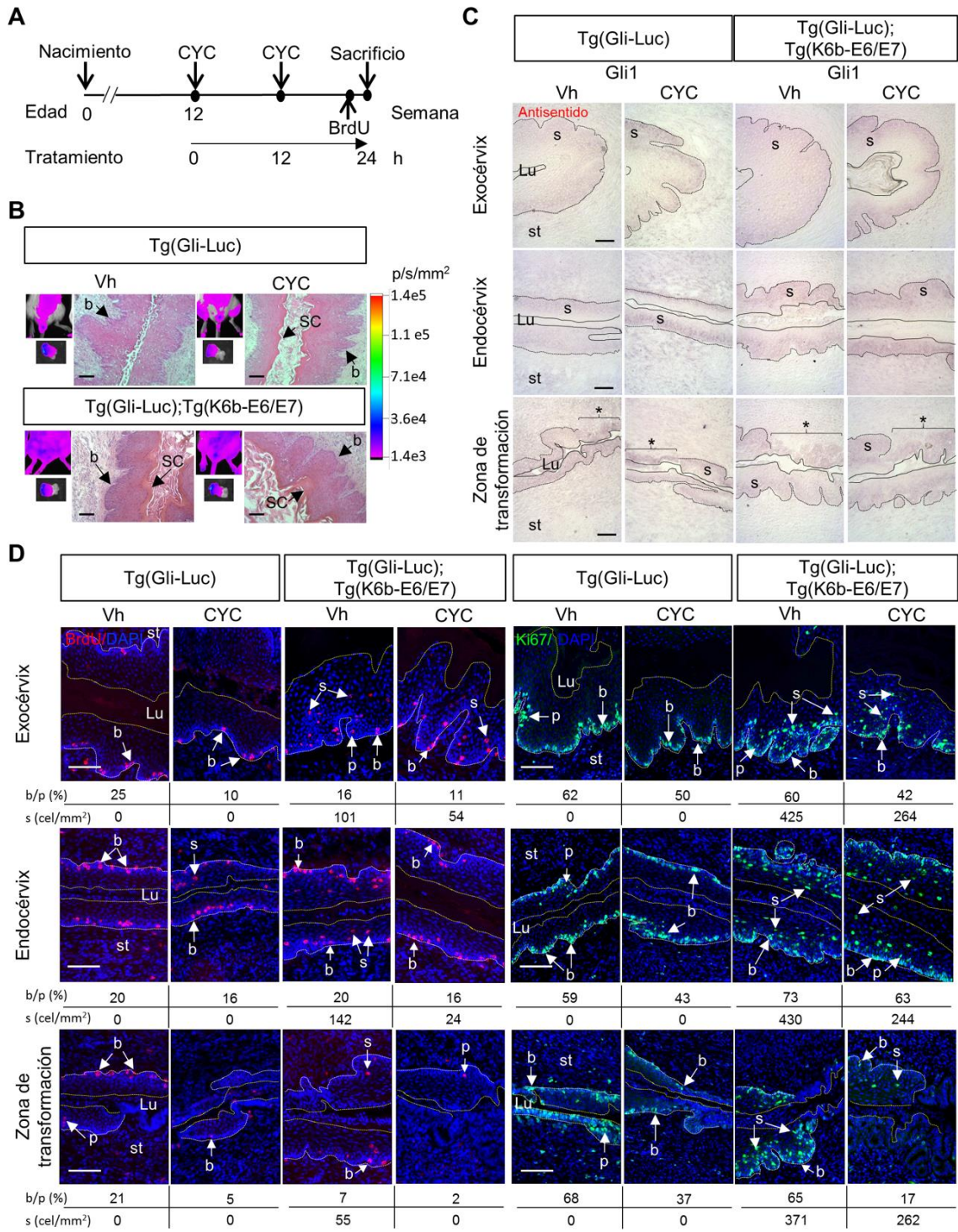


Figura 14. Inhibición de la vía de Hedgehog y proliferación en el epitelio cervical. **A.** Esquema del diseño experimental de tratamiento con ciclopamina (CYC) durante 24 h. **B.** Imagen de bioluminiscencia (BL) en el área del cérvix *in vivo* e *in vitro*, y tinción con H&E de secciones del epitelio cervical de hembras Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). SC: estrato corneo; b: capa basal. **C.** Expresión del ARNm de *Shh* y *Gli1* en exocérvix, endocérvix y zona de transformación de ratones Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). **D.** Inmunotinción y cuantificación de células en proliferación Ki67⁺ y BrdU⁺ en exocérvix, endocérvix y zona de transformación, posterior al tratamiento con CYC. b/p (%): % de células basales/parabasales; s (cel/mm²): células suprabasales/área; s: capa suprabasal; b: capa basal; st: estroma; Lu: lumen; p: pasabasal; (*) muestra el epitelio cuboidal. Barra de calibración=100 micras.

El estradiol y los oncogenes E6/E7 del HPV promueven la activación de la vía de Shh durante la carcinogénesis cervical

Se ha establecido que el estradiol es un determinante clave en la evolución del cáncer cérvico uterino¹⁴. En el modelo murino de cáncer cervical Tg(K6b-E6/E7), el efecto del 17 β E2 en la carcinogénesis se debe a un incremento en el número de ciclos (definido por la frecuencia secuencial de las fases proestro seguido de un estro durante 19 días), y a un efecto directo en la proliferación de las células del epitelio, especialmente las localizadas en las capas suprabasales¹⁴⁹. Además, la presencia persistente de niveles altos de estradiol parece ser suficiente para que se promueva la carcinogénesis cervical cuando los oncogenes E6/E7 se expresan en el epitelio cervical. Con la finalidad de determinar si el estradiol puede activar la vía de Hh y así contribuir a la carcinogénesis cervical, se evaluó la actividad de Gli en ratones Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) a lo largo de un tratamiento con 17 β E2 durante 90 días (**Figura 15A**). Se observó que ambos grupos de ratones incrementaron la actividad de Gli en asociación al tratamiento hormonal, alcanzando el pico máximo en el caso de las hembras Tg(Gli-Luc) al día 21, mientras que en las Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) éste se presentó hasta el día 35 (**Figura 15B y 15C**). De acuerdo con el seguimiento de las hembras, en ambos casos el descenso inició después del día 35 pero el basal se alcanzó al día 63, mostrando un descenso del 50% de la actividad de Gli para los ratones Tg(Gli-Luc) y del 40% para los ratones Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) siendo significativo únicamente para los ratones Tg(Gli-luc) (**Figura 15C**). Sin embargo, un análisis histológico de estas muestras claramente revela un

crecimiento aumentado en el epitelio cervical de las hembras tratadas con 17 β E2. Este crecimiento se caracterizó por: *i*) un mayor número de ondulaciones en el epitelio estratificado, *ii*) en las hembras que expresan los oncogenes E6 y E7, el cérvix es entre 16-36 % más grande que las ratonas Tg(Gli-Luc) y, *iii*) en los Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) son visibles células tipo coilocitos, células binucleadas y evidentes displasias (**Figura 15D**). Los resultados mostrados sugieren que la vía de señalización de Hh contribuye al crecimiento del epitelio cervical en respuesta al estradiol y a la presencia de E6 y E7, pero de acuerdo con lo observado por el reportero Gli-Luc, esta respuesta solo ocurre al inicio del crecimiento. Aunque, es notorio observar que la presencia de los oncogenes mantiene la vía encendida más tiempo, eventualmente en ambos genotipos la actividad de Gli disminuye.

Se sabe que los oncogenes E6 y E7 inducen en las células suprabasales la reentrada al ciclo celular y promueven su proliferación¹⁶. Sin embargo, se desconoce si la vía de señalización de Shh está alterada en consecuencia al estímulo inducido por el tratamiento prolongado con 17 β E2 en el cérvix. Cuando los niveles endógenos de estradiol son altos, durante el estro, la distribución de los ARNm de *Shh* y *Gli1* correspondió a las capas basales y se extendió en forma de gradiente hacia las células suprabasales (**Figura 13A**). Sin embargo, en presencia prolongada de estradiol exógeno, inesperadamente la expresión de *Shh* y *Gli1* se alteró extendiendo su expresión más hacia las capas suprabasales (4-7 capas celulares) y disminuyendo en las capas basales de ratones Tg(Gli-Luc) (**Figura 15E**). Este mismo patrón se observó en los ratones que expresan E6/E7. La redistribución de *Shh* y *Gli1*, y la presencia de Gli3, puede estar asociada a la reducción de la señal Gli-Luc observada después de 90 días de tratamiento con 17 β E2, además de la posibilidad de interacción de E6 y E7 con componentes de la vía que promuevan la proliferación de las células de la capa suprabasal (ver discusión).

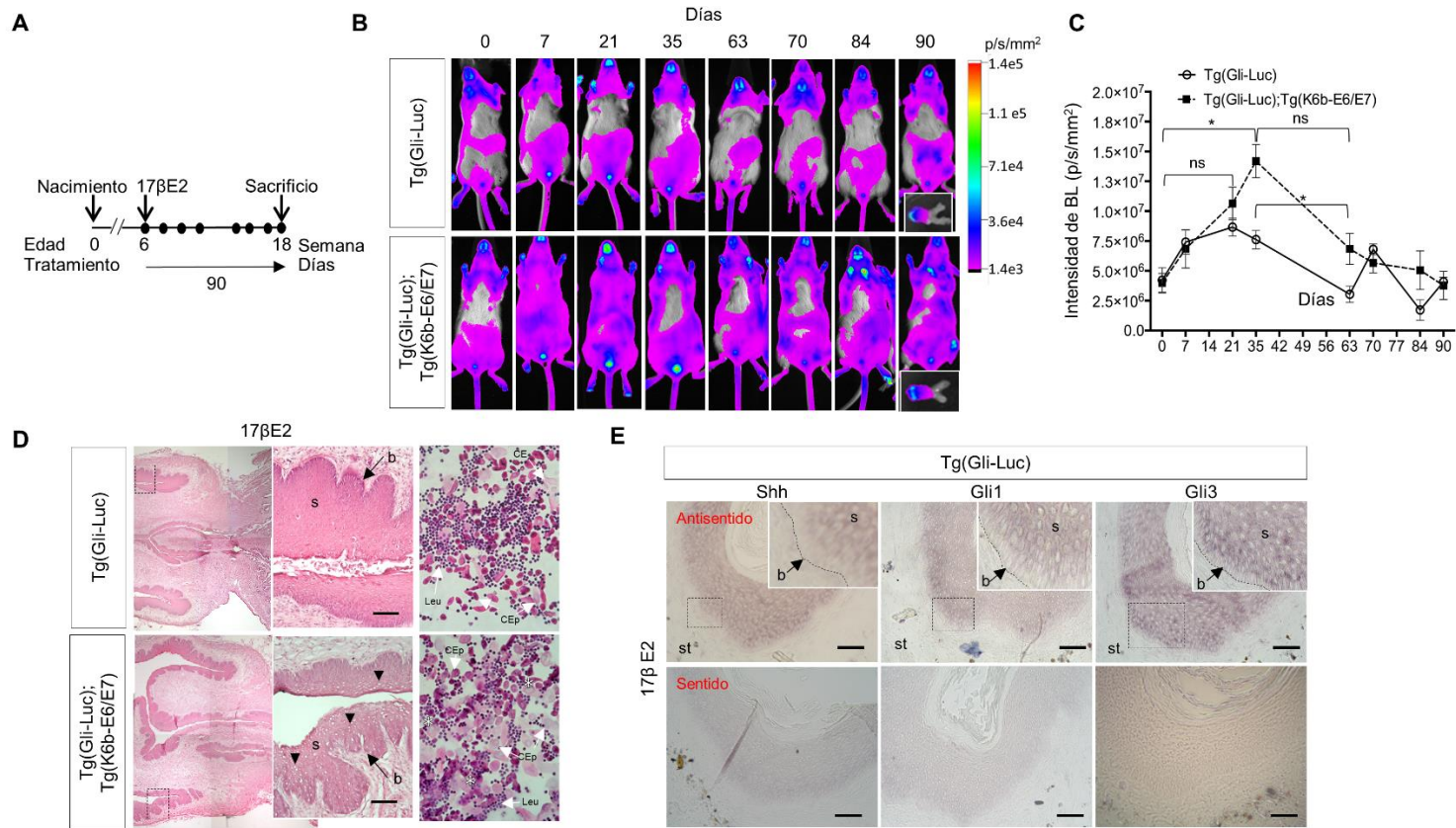


Figura 15. Efecto del estradiol en la activación de la vía de Hedgehog en el epitelio cervical. A. Esquema del diseño experimental del tratamiento con 17- β -estradiol (17 β E2) durante 90 días en hembras Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). **B.** Imagen representativa de bioluminiscencia (BL) durante los 90 días de tratamiento con 17 β E2. **C.** Cuantificación de la actividad de Gli a lo largo del tratamiento con 17 β E2. **D.** Tinción con H&E de secciones del cérvix, exocérnix (región aumentada del recuadro punteado) y citología vaginal (panel izquierdo) al término del tratamiento con 17 β E2. b: capa basal; s: capa suprabasal; CE, células: escamosas, CEp: células epiteliales; Leu: leucocitos. Triángulos indican células tipo coilocitos. **E.** Expresión del mRNA de *Shh* y *Gli1* en exocérnix de ratones Tg(Gli-Luc). Línea punteada indica el borde la capa basal. St: estroma. La sonda sentido se empleó como control negativo de la tinción. Barra de calibración=100 micras.

La inhibición de la vía de Shh disminuye el crecimiento en las etapas iniciales del cáncer cervical inducido por estradiol.

La persistente activación de la vía de Hh se ha implicado en la patogénesis de distintos tipos de cáncer humano¹⁶⁶⁻¹⁶⁹, por su importancia en el inicio y mantenimiento de los procesos que promueven el desarrollo del tumor, la vía se ha convertido en blanco terapéutico para el desarrollo de diferentes inhibidores que ahora se encuentran en etapas clínicas de estudio^{84,130}. En el contexto del cáncer cervical, se ha estudiado recientemente en líneas celulares el efecto de la CYC. En el presente estudio, en un grupo de hembras Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) que se trataron con 17 β E2 durante 39 días y al día 35 recibieron 10 mg/kg de CYC/día por vía oral, se evaluó la actividad de Gli en las orejas perforadas, el crecimiento del pelo y en epitelio cervical (**Figura 16A**). En las hembras que recibieron CYC por 4 días en 4/6 orejas se redujo la intensidad de bioluminiscencia alrededor de las orejas perforadas en comparación con los del grupo control donde 0/6 orejas redujeron la bioluminiscencia (**Figura 16B**, panel inferior). Asimismo, en la piel depilada, la CYC redujo la actividad de Gli y evitó el crecimiento del folículo piloso inducido por depilación (**Figura 16B**, vista dorsal). Estas observaciones confirman la función de Shh en la iniciación del ciclo de crecimiento de folículo¹⁷⁰, mismo que es inducido por los oncogenes E6 y E7 en el ratón Tg(K6b-E6/E7)¹⁴⁴.

Sin embargo, en la región del cérvix no se observó disminución de la actividad de Gli y al evaluar el número de células Ki67⁺, la CYC no disminuyó las células proliferantes comparado con el grupo control, observando solo una tendencia a disminuir el número de estas células proliferantes, por lo que la dosis de CYC empleada en este esquema de tratamiento no fue suficiente para causar un efecto en el cérvix (**Figura 16C y 16D**). En este caso, el tratamiento no pudo ser prolongado por más tiempo, ya que la cepa Fvb/N empleada en este estudio es susceptible a efectos tóxicos de la CYC.

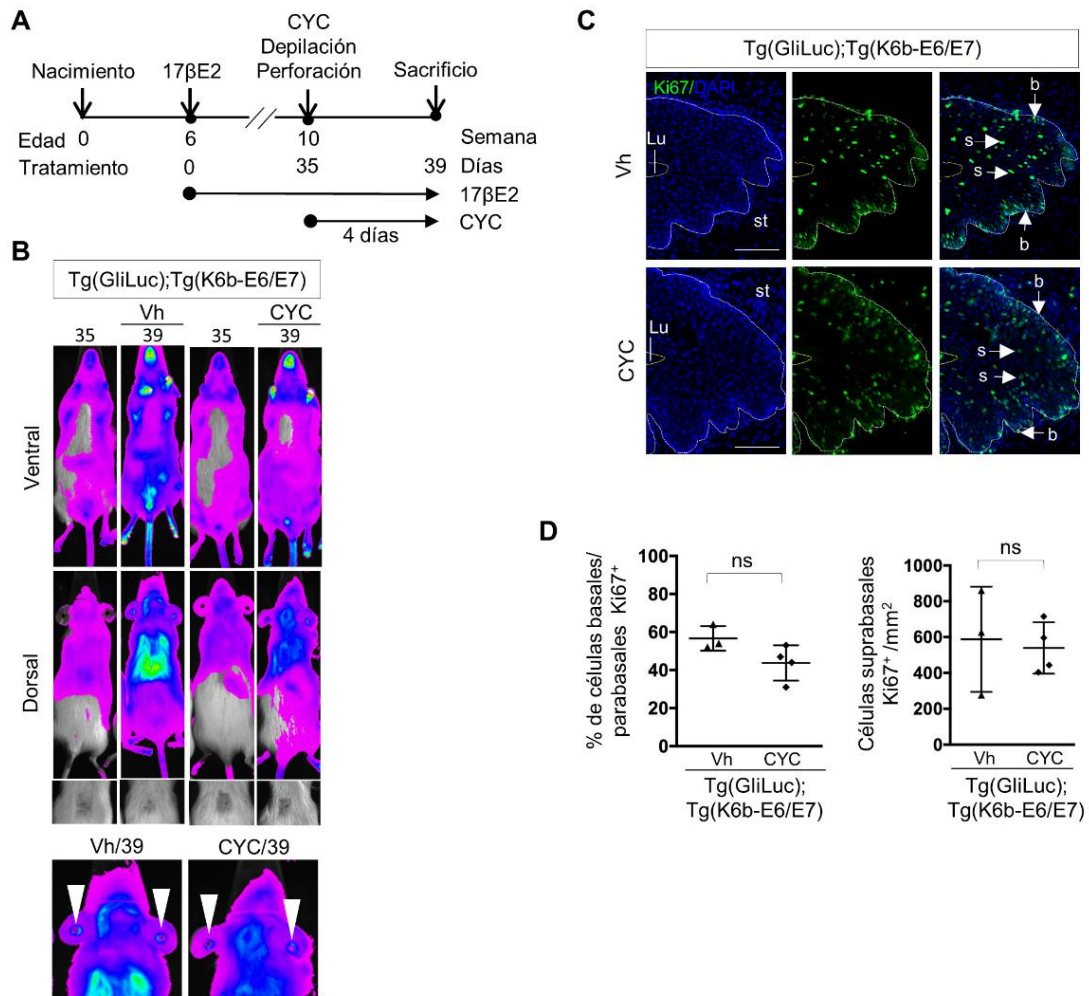


Figura 16. Inhibición de la vía de Hh con CYC en las orejas, piel y cérvix en ratones Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). **A.** Esquema del diseño experimental de tratamiento con 17-β-estradiol (17βE2) durante 35 días y ciclopamina (CYC) durante 4 días. **B.** Vista ventral y dorsal de ratones tratados con CYC al inicio (35 días) y posterior (39 días) al tratamiento. Vista dorsal, se muestra la disminución de la intensidad de bioluminiscencia (BL) inducida por depilación. Fotografía inferior muestra la piel depilada de ratones. Cabeza de flecha blanca indica la BL inducida por perforación en las orejas. **C.** Inmunotinción de células proliferantes Ki67⁺ en el exocérnix de hembras tratadas con CYC o el vehículo (Vh). **D.** Porcentaje de células basales/parabasales Ki67⁺ y células suprabasales/mm² en el exocérnix. n= 3 y 4. ns: no significativo. Barra de calibración=100 micras.

Como se mencionó en la introducción, recientemente se demostró que el ITC tiene la capacidad de inhibir la vía de Hh por un mecanismo dependiente de Smo, pero distinto al de CYC, y que en modelos animales (como el ratón *Ptch^{+/-};p53^{-/-}*) reduce el crecimiento de células tumorales y la expresión del mRNA de *Gli1*. Para determinar si el ITC inhibe la vía de Shh, en cultivos *ex vivo* de cérvix durante la etapa de proestro, se realizó el mismo experimento que se realizó con CYC donde se observó que la actividad de Gli disminuye después de 8 h de tratamiento (**Figura 13B**); sin embargo, el tratamiento con ITC no disminuyó la actividad cuando se cultivó el cérvix (**Figura 17A**). Para probar el efecto del ITC sobre la vía de Hh, utilizamos cultivos *ex vivo* de extremidades de embriones de ratón de 10.5 días. Las extremidades se trataron además con CYC o SAG (un inductor de la vía) durante 8 h. Mientras el SAG incrementó la actividad de Gli 3 veces con respecto al control (DMSO), tanto el ITC como la CYC disminuyeron a la mitad la actividad de Gli (**Figura 17B**).

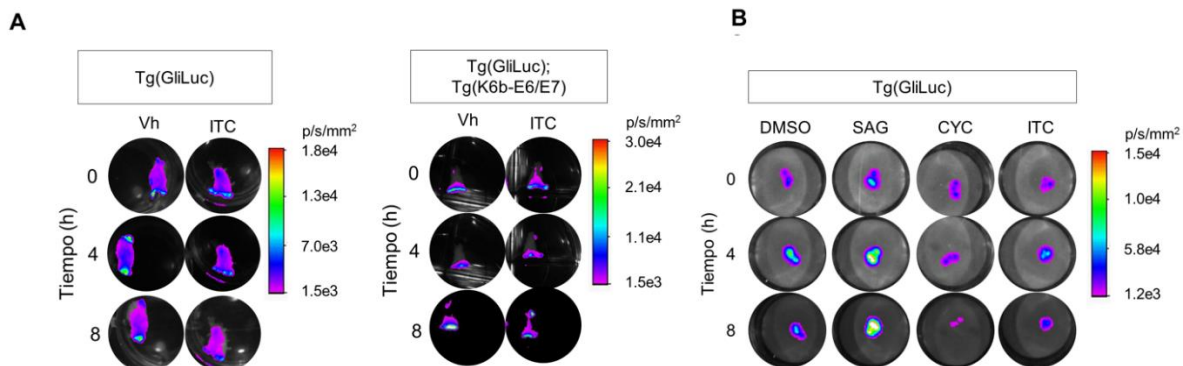


Figura 17. Efecto de inhibidores de la vía de señalización de Hh en el crecimiento del epitelio cervical y extremidades. A. Efecto del tratamiento del itraconazol (ITC) en el cérvix disecado durante 8 h de cultivo de hembras Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). Imagen representativa de 3 cérvix disecados de cada genotipo. **B.** Activación e inhibición de la bioluminiscencia en extremidades de ratón Tg(Gli-Luc) de 10.5E con el agonista de Smo (SAG), CYC e ITC con respecto al control (DMSO), respectivamente. Se muestra en la imagen 3 extremidades por pozo.

Si bien, el ITC no tuvo un efecto en el cérvix disecado como se esperaba, sí tuvo un efecto en la disminución de la actividad de Gli en la extremidades, de acuerdo a la actividad reportada de la vía de Hh en las extremidades^{171,172}. Por ello, se evaluó el efecto del ITC en la piel dorsal y en la regeneración de la oreja perforada (**Figura 18A y 18B**). En la piel, el ITC inhibió la actividad de la vía de Hh inducida por depilación e inhibió el crecimiento de los folículos en ambos grupos de ratones Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7), pero en los ratones Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) el efecto inhibitorio de los folículos resultó más evidente, ya que la expresión de los oncogenes E6 yE7 promueve el crecimiento del folículo¹⁴⁴. No obstante, en la oreja el ITC no disminuyó la actividad de Gli inducida por la perforación (**Figura 18B**). Sin embargo, en estos ratones se evaluó el porcentaje de regeneración posterior a 28 días y el ITC evitó el cerrado de las perforaciones realizadas en orejas en ratones que expresan los oncogenes E6/E7.

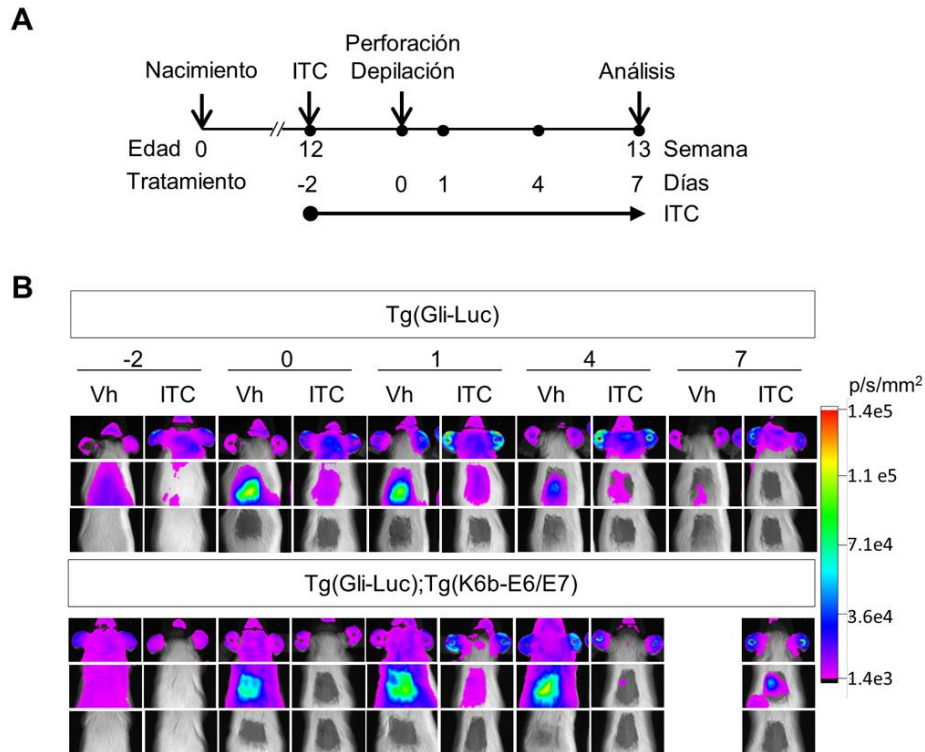


Figura 18. Efecto del itraconazol en el crecimiento del folículo piloso y regeneración de la oreja de hembras Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). **A.** Esquema de tratamiento con ITC durante 9 días en la piel dorsal depilada y perforación de orejas. **B.** Imagen de bioluminiscencia (BL) en la piel dorsal depilada y orejas perforadas de hembras tratadas con CYC y el vehículo (Vh). Panel inferior se muestra la imagen de la piel depilada y su posterior crecimiento de los folículos.

Por los resultados anteriores, donde el ITC tuvo un resultado favorable en la inhibición de la regeneración de las orejas y en el crecimiento de los folículos, dos procesos donde participa la vía de Hh, se decidió tratar a hembras Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) con 17β E2 durante 50 días y al día 35 del tratamiento se inició el tratamiento con ITC a una dosis de 75 mg/kg/día por vía oral (**Figura 19A**). Se dio seguimiento a la actividad de Gli durante el tratamiento con 17β E2 e ITC y los resultados mostraron una alta variabilidad, misma que se observó reflejada en la citología vaginal observada cada día del análisis (**Figura 19B**). Al final del tratamiento, los cambios observados en el lavado vaginal mostraron una disminución en la cantidad de células

escamosas y una reducción en el engrosamiento del epitelio cervical observado por análisis histológico en el grupo de hembras tratadas con ITC, en ambos genotipos, **(Figura 19A y 19B)**. Asimismo, se observó un incremento en el número de leucocitos en estas muestras **(Figura 19B)**. La presencia de leucocitos es característica de las etapas de diestro y metaestro durante el ciclo estral. Por el contrario, el cérvix de las hembras del grupo control presentaban abundantes células escamosas en el lumen del epitelio cervical y en el lavado vaginal abundantes escamas en respuesta a la presencia de estradiol. Por otro lado, las ondulaciones del epitelio cervical asociadas a la displasia inducida por estradiol, particularmente evidentes en los ratones que expresan los oncogenes E6/E7, se observan notoriamente disminuidas en los ratones tratados con ITC **(Figura 19C)**.

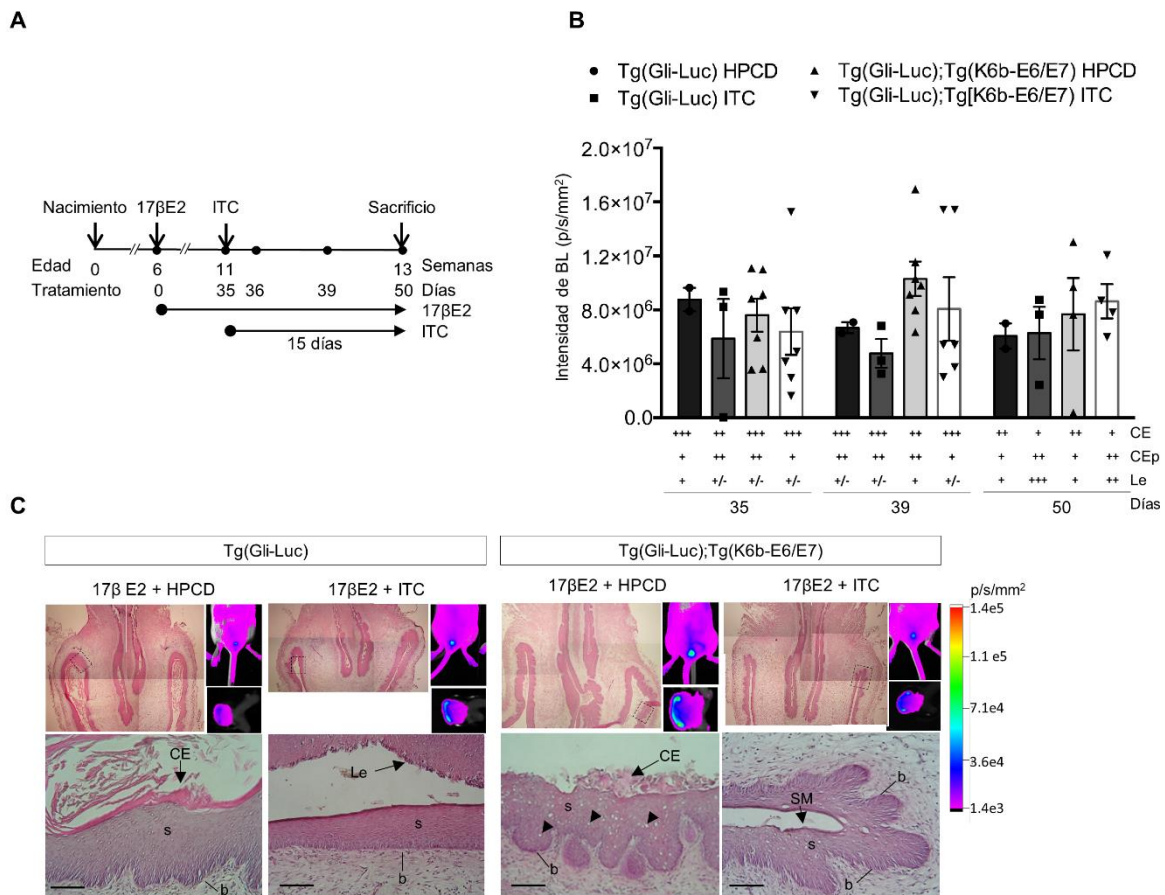


Figura 19. Efecto del itraconazol en el crecimiento del epitelio cervical inducido por estradiol de hembras Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). **A.** Esquema de tratamiento con 17- β -estradiol (17 β E2) e itraconazol (ITC) en hembras Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(k6b-E6/E7). **B.** Seguimiento de la intensidad de bioluminiscencia (BL, actividad de Gli) durante el tratamiento con ITC o vehículo (HPCD) los días 35 (inicio del tratamiento con 17 β E2), 39 y 50 (posterior al inicio de tratamiento). Panel inferior, muestra el análisis citológico del lavado vaginal de hembras tratadas con ITC mediante la presencia de células escamosas (CE), células epiteliales (CEp) y leucocitos (Lu) en el día 35, 39 y 50. +++: abundantes; ++: muchas; +: pocas; +/-: escasas células. **C.** Análisis histológico del exocérnix en hembras tratadas con 17 β E2 e ITC. Se muestra la histología del epitelio cervical con evidentes displasias, células tipo coilocitos (triángulos) en hembras Tg(Gli-Luc);Tg(k6b-E6/E7) versus Tg(Gli-Luc) y la reducción del engrosamiento del epitelio en las hembras tratadas con ITC. Panel izquierdo; imagen de BL *in vivo* y cervix disecado. b: basal; s: suprabasal; SM: estrato mucinoso. Las figuras geométricas en la gráfica indican el número de animales analizados en cada condición experimental. Media \pm EE.

El incremento en el crecimiento que conduce al desarrollo de la hiperplasia durante la carcinogénesis comúnmente se relaciona a un incremento en el número de células proliferantes ⁷⁰. Para determinar si el ITC reduce el crecimiento al disminuir la proliferación celular, se cuantificó el número de células en división en el epitelio cervical mediante la detección del marcador Ki67 (**Figura 20A**). Si bien en las hembras Tg(Gli-Luc) el ITC no disminuyó el número de células Ki67+ en la capa basal/parabasal, en las hembras Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) se observó una tendencia a disminuir las células Ki67+ (**Figura 20B**). Un efecto significativo se observó en la disminución del número de células proliferantes suprabasales en las hembras Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) (**Figura 20B**). Como se determinó previamente, la expresión de los oncogenes en las capas suprabasales conduce a un reingreso al ciclo celular tal que se detectan abundantes células en proliferación en esta capa, (**Figura 20C**). En este contexto, el ITC fue efectivo en disminuir el número de células en división, sobre todo de la capa suprabasal. Sin embargo, pese a la notable disminución de la proliferación, no hubo cambio en la expresión del ARNm de *Shh*, *Gli1* y *Gli3* (**Figura 20B**). Por lo tanto, estas evidencias señalan que la vía de Shh contribuye a la carcinogénesis cervical inducida por el estradiol y los oncogenes E6/E7, pero inhibidores como el ITC que reducen el crecimiento del epitelio cervical, parece que lo realiza por un mecanismo que no involucra a la vía de Hh, y posiblemente inhiba otras como la de WNT/ β -catenina o AKT, sobre la cuales el ITC también parece ejercer un efecto inhibitorio¹⁷³.

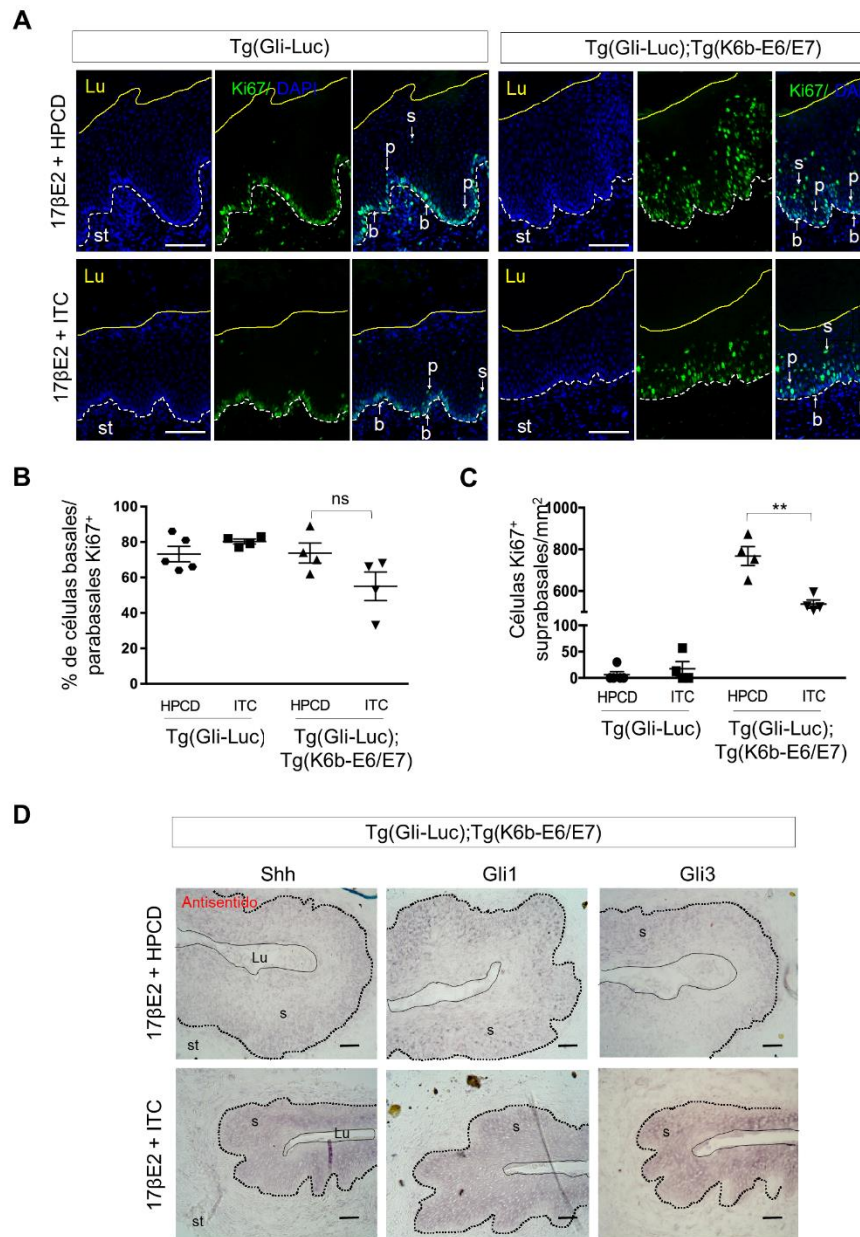


Figura 20. Efecto del itraconazol en la vía de señalización de Hh y la proliferación de las células del epitelio cervical de hembras tratadas con estradiol. A. Inmunotinción de células proliferantes Ki67+ en el exocervix de hembras Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) tratadas con 17-β-estradiol (17βE2) e itraconazol (ITC) o vehículo (HPCD). **B.** Porcentaje de células basales/parabasales Ki67+. **C.** Cuantificación de células suprabasales/mm² en el exocervix. **D.** Hibridación *in situ* para *Shh*, *Gli1* y *Gli3* en el epitelio cervical en el exocervix posterior al tratamiento por 50 días con 17βE2 y 15 días con ITC. Lu: lumen; s: capa suprabasal; st: estroma. n = 4; Media ± EE. *p ≤ 0.003. Barra de calibración=100 micras.

DISCUSIÓN

Participación de Shh en la regeneración de la oreja y la renovación del epitelio cervical

Con la finalidad de evaluar en si durante el proceso de regeneración de la oreja en el modelo del ratón Tg(K6b-E6/E7) la vía de Shh se activa, en el presente estudio se dio seguimiento al proceso de regeneración durante 28 días y se determinó que el crecimiento del tejido en ratones Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) en los primeros días (1-4) posteriores a la realización de la herida en la oreja correlacionó con el incremento en la actividad de la vía de Hh. Esta observación fue más evidente en las hembras Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) que regeneran luego de 28 días de la realización de la herida. Hasta ahora no se había reportado si la vía participa en la de regeneración de la oreja en respuesta a daño; sin embargo, se ha descrito que la piel tiene una tasa elevada de autorenovación y ante una lesión o daño se inicia un programa de reparación de la herida⁶⁰ y en este sentido otros estudios han demostrado y reconocido que la señalización de Hh es una de las principales vías que participan en la regeneración de los tejidos, incluyendo la piel^{66,72,73}. Los datos obtenidos demuestran que la vía de Hh participa en la función regenerativa de la piel inducida por los oncogenes E6/E7, y en conjunto, los resultados muestran que la vía de Hh participa en procesos de proliferación celular donde tiene una participación importante y que el reportero Gli-Luc responde a los estímulos de regeneración en el modelo de ratón Tg(K6b-E6/E7).

Durante el análisis del seguimiento de la actividad del transgén Gli-Luc se observó bioluminiscencia en la piel intacta (todo el cuerpo) de los ratones Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). Con respecto a ello se conoce que Shh tiene una importante participación en el crecimiento del folículo piloso durante el desarrollo embrionario y en la etapa postnatal durante el inicio del crecimiento del pelo^{66,170}; además, se ha demostrado que la sobreexpresión de Shh en la piel promueve el crecimiento del folículo piloso¹⁰¹. Con el propósito de corroborar si la vía se activa durante el crecimiento del pelo

en nuestro modelo experimental, se evaluó la actividad del transgén Gli-Luc durante el crecimiento del folículo en ratones Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) inducido por depilación. Los resultados mostraron que hay un incremento en la actividad de Gli en la piel de ratones Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) y que la señal proviene de los folículos en regeneración, particularmente la actividad de Gli es más evidente en los ratones Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) ya que presentaron mayor intensidad de bioluminiscencia. Lo anterior correlaciona con observaciones previas donde los ratones Tg(K6b-E6/E7) tienen una mayor frecuencia de recambio de folículos pilosos en comparación con los ratones silvestres¹⁴⁴.

Participación de Shh en la renovación del epitelio cervical

Como se mencionó anteriormente, una característica de la piel es su capacidad de autorenovación y reparación de heridas, procesos donde se ha demostrado la participación de la vía de Shh^{75,98}. Así, semejante a la piel, el epitelio cervical sufre un recambio constante a lo largo de la vida reproductiva asociado al ciclo estral (menstrual en los humanos), un proceso que es regulado hormonalmente⁴⁵. Con la finalidad de determinar si durante el ciclo estral en el cérvix de los ratones Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) se activa la vía de señalización de Shh, se dio seguimiento *in vivo* de la actividad de la señal Gli-Luc durante 28 días. Los resultados mostraron que la vía de Shh se activa durante la renovación del epitelio cervical en ambos grupos de ratones, observando una mayor actividad de la señal Gli-Luc en las etapas de mayor crecimiento, proestro y estro, y menor actividad durante las etapas de degeneración y reposo, metaestro y diestro, respectivamente. Aquí es importante mencionar la asociación de las fases del ciclo con los niveles de estradiol, ya que durante las fases de crecimiento el estradiol se encuentra elevado, mientras que durante el estado de degeneración y reposo, la actividad de crecimiento epitelial es mínima y los niveles de estradiol son bajos¹⁷⁴. Por lo anterior, los resultados observados de la actividad de la vía de Shh durante el ciclo estral y los niveles altos de estradiol endógeno durante las etapas de crecimiento del epitelio cervical, nos llevan a considerar que existe una correlación entre

el estradiol, actividad de la vía y la presencia de los oncogenes E6/E7 del HPV que también incrementan la actividad de Shh.

Se conoce que durante el ciclo estral las células epiteliales cervicales proliferan y se diferencian a medida que aumentan los niveles de estrógenos⁴⁵. Considerando esta condición, y los resultados mencionados, para determinar si la vía de Shh tiene un efecto en la proliferación de las células del epitelio cervical, durante la fase proestro se inhibió la actividad de la vía con CYC *ex vivo* e *in vivo*. Primero se analizó la actividad de Gli a través de la intensidad de bioluminiscencia, *ex vivo*, y se observó que la señal Gli-Luc disminuyó cuando se trató el cérvix con CYC en los ratones Tg(Gli-Luc) y Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). Sin embargo, *in vivo*, no se observó un cambio en la actividad de Gli en el cérvix de las hembras tratadas con CYC con respecto al grupo control. Este resultado llevó a considerar si la dosis de CYC fue suficiente para inhibir la vía de Shh en el cérvix ya que: *i*) al evaluar el crecimiento del pelo inducido por depilación y en las orejas, sí se observó una disminución de la actividad de Gli, por lo que en esta condición sí fue suficiente la dosis de CYC y *ii*) al evaluar la proliferación celular en el epitelio cervical, la CYC mostró una tendencia a reducir la proliferación celular en las células basales y parabasales del epitelio cervical en la etapa de proestro. Sin embargo, en el análisis queda pendiente evaluar si la expresión del factor de transcripción Gli1 disminuye bajo estas condiciones experimentales.

Hasta ahora se desconoce si existe un mecanismo de regulación del crecimiento en el cérvix donde participe la vía de Shh y si existe una asociación directa con la función del estradiol. Sin embargo, en otros contextos celulares, como en las líneas celulares tipo trofoblastos (empleadas comúnmente como modelo de estudio de la conversión de colesterol a esteroides), se demostró que la vía de Hh puede estimular la conversión de colesterol a estradiol y a progesterona (P4) a través del aumento en la expresión de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (3 β -HSD1) y la aromatasa que participan en su biosíntesis¹⁷⁵. Además, se mostró que la biosíntesis de estradiol es

mediada por Gli2 y la inhibición de la vía de Hh con CYC suprime la conversión de colesterol a P4 y estradiol. En otro estudio, empleando la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, donde se asoció la actividad de la vía de Hh y la respuesta a estradiol, se observó que la disminución de la expresión del ER α disminuye la expresión de Shh y Gli1, mientras que la activación del ER α con estradiol, aumenta la expresión de Shh y Gli1¹⁷⁶. Además, el tratamiento con CYC reduce la proliferación inducida por el estradiol y la expresión de Gli1 sin afectar la expresión del ER α ¹⁷⁶.

Considerando los datos de ambos estudios, y los resultados donde se observó una tendencia a disminuir la proliferación celular del epitelio cervical al inhibir la vía de Shh con CYC, es posible que uno de los mecanismos que controlan el crecimiento del epitelio sea a través de la activación del ER α con estradiol, ya que esta interacción induce la expresión de Shh y Gli1, los cuales son necesarios para la activación de la vía de señalización de Shh, que, a su vez, favorece la biosíntesis de estradiol. Esto implicaría que ambas señales proliferativas, Shh y estradiol, se retroalimenten para mantener el crecimiento durante el ciclo estral. En este sentido resultará interesante conocer si la expresión de las enzimas (3 β -HSD1 y la aromatasas) disminuye al inhibir la vía de Shh en el modelo presentado.

Participación de Shh en la iniciación de la carcinogénesis cervical

Los factores que mantienen la señalización proliferativa y regulan la progresión a través del ciclo celular, como las proteínas E6/E7 de HR-HPV y el estradiol, son los principales factores asociados a la carcinogénesis cervical en humanos y su importancia se ha demostrado en estudios epidemiológicos y modelos animales^{14,138,139,149}. Sin embargo, durante la carcinogénesis comúnmente ocurre la activación de otras vías que contribuyen a la iniciación y progresión del cáncer^{70,177}. Por ello, para determinar si la vía de Shh participa en las etapas iniciales de la carcinogénesis cervical, se empleó el modelo del ratón Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). Los resultados mostraron que en este modelo el tratamiento con 17 β E2 incrementa gradualmente la actividad de Gli en la piel y en el

cérvix durante los primeros 35 días de tratamiento. Asociado a ello, fue evidente observar características típicas que describen las etapas iniciales de la carcinogénesis como: crecimiento del cérvix, la presencia de células tipo coilocitos, células binucleadas (una característica observada en muestras de cérvix humano que indica una infección por HPV en etapas iniciales) y evidentes displasias en hembras que expresan los oncogenes, a diferencia de las hembras que no expresan los oncogenes. Sin embargo, el incremento en la señal Gli-Luc no fue sostenida en respuesta al estímulo crónico con 17 β E2, manifestándose solo transitoriamente y reduciéndose posterior a los 35 días de tratamiento. No obstante, al final del tratamiento la expresión de RNAm de *Shh* y *Gli1* cambió de expresarse principalmente en la capa basal/parabasal a extender su expresión de las células parabasales hacia las células suprabasales, al igual que la expresión del RNAm de *Gli3*. De acuerdo con esto, es posible que, en el epitelio cervical al inicio del tratamiento con estradiol, el dominio de activación de Shh-Gli1 sea temporalmente en las capas basales/parabasales y en etapas avanzadas del estímulo, Gli3 esté regulando el dominio de activación de la vía.

De acuerdo a lo anterior, el hecho que se haya observado un incremento en la señal Gli-Luc bajo el tratamiento con estradiol en ausencia o presencia de los oncogenes E6/E7, conlleva a sostener la posibilidad que el estradiol activa la vía de Shh (y ésta a su vez la biosíntesis de estradiol y la activación del ER α ¹⁷⁵) para favorecer la proliferación celular. Además, la presencia de los oncogenes E6/E7 permitiría la reentrada al ciclo celular de las células suprabasales en los ratones Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). Al mismo tiempo, la vía de Shh podría directamente funcionar como una señal proliferativa, ya que se ha observado que Shh activa genes que controlan el ciclo celular (como ciclina D y Myc)⁷⁷ y previene el frenado del ciclo celular inducido por p21¹⁷⁸. Esta posibilidad también se sustenta en estudios realizados en pacientes con cáncer cervical y líneas celulares donde se reporta que: *i*) la expresión y distribución de los componentes de la vía de Hh es alterada durante la carcinogénesis cervical¹⁵³, *ii*) diferentes alteraciones en el gen *PTCH*, el receptor de la vía, ocurren durante la carcinogénesis cervical¹⁵⁵; y *iii*) la vía de

Hh controla la proliferación de diversas líneas celulares derivadas de tumores cervicales^{156,179}. En conjunto, lo anterior permite considerar que Shh es una señal importante para la iniciación y progresión de la carcinogénesis cervical, incrementando la respuesta del estradiol en el cérvix.

Itraconazol como un inhibidor del crecimiento cervical

La mayoría de inhibidores de la vía de Hh, como CYC y vismodegib, se han dirigido a la inhibición de Smo¹²³. Por su parte, la CYC se ha empleado en diversos estudios para inhibir el crecimiento y la proliferación de células tumorales^{116,124,126,127}; sin embargo, aunque la CYC no tiene uso terapéutico, se ha empleado como un inhibidor de referencia en estudios *in vitro* e *in vivo*. Por la importancia que tiene la CYC y dado que se conoce el mecanismo de inhibición de la vía de Hh, se consideró el uso de la CYC para inhibir la vía en las condiciones experimentales descritas, no obstante, aunque la dosis empleada fue suficiente para observar una disminución de la actividad de Gli en la piel y para inhibir el crecimiento del folículo piloso inducido por depilación, fue difícil llegar a una dosis donde inhibiera eficientemente el crecimiento del cérvix *in vivo*, sin que los ratones presentaran efectos adversos. Por este inconveniente, se consideró el uso del ITC como un inhibidor la vía de Hh¹³¹ para demostrar la participación de la vía en el crecimiento del epitelio cervical en el modelo Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7).

La decisión de emplear al ITC como un inhibidor se fundamentó en el estudio realizado por Kim y cols.¹³¹, donde se mostró que el ITC inhibe la vía de Hh y suprime el crecimiento del células tumorales de meduloblastoma en el modelo de ratón *Ptch^{+/-};p53^{-/-}*. Además, la elección del ITC representó varias ventajas: *i*) tiene una concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de 800nM en la línea celular Shh-Light2 responsiva a Shh, *ii*) es un fármaco aprobado por la FDA, y *iii*) puede ser sostenido por meses en un rango de dosis de 200-600 mg/día en pacientes con CCB.

Con respecto a los resultados obtenidos, la administración de ITC *in vivo*, a diferencia de la CYC, se toleró mejor a la dosis empleada. Su efecto antagonista de la vía de Hh fue eficiente en la inhibición de la regeneración del folículo piloso inducido por depilación y en la regeneración de la oreja. Por el contrario, el crecimiento del epitelio cervical inducido por estradiol, en el punto donde la actividad de Gli reportada por el transgén Gli-Luc fue la más alta, la actividad de la vía se redujo bajo el tratamiento con ITC, pero esta disminución solo fue al principio del tratamiento y no hubo diferencias detectadas al final del tratamiento con respecto al grupo control. Sin embargo, al final del esquema de tratamiento, el ITC redujo el crecimiento del epitelio cervical, en particular en los ratones que expresan los oncogenes E6/E7. El efecto del ITC se reflejó en la reducción del engrosamiento epitelio cervical, el crecimiento displásico y la proliferación celular, particularmente de las células suprabasales. Ya que la vía de Shh no se inhibió totalmente por el ITC, pero sí se observó un efecto positivo en la inhibición del crecimiento del epitelio cervical, se sabe que otras vías participan en el crecimiento del epitelio cervical para mantener la proliferación celular, y en este sentido, existen reportes recientes que el ITC no solo tiene un efecto antagónico sobre la vía de Shh, p. ej., en la línea celular HeLa inhibe la actividad de la vía WNT/ β -catenina y la vía de Akt, que provoca la reducción de la proliferación celular¹⁷³. Es importante, notar que estas determinaciones no excluyen a Shh como un inductor de la proliferación celular como se ha demostrado en distintas líneas celulares de cáncer cervical^{156,179}.

Complementario a lo anterior, el desarrollo o establecimiento del cáncer cervical no solo depende de la proliferación celular, la participación de otros procesos como la angiogénesis tienen un papel importante, y se ha reportado que el ITC tiene propiedades antiangiogénicas^{180,181}. En células endoteliales el ITC inhibe la vía de mTOR lo que resulta en la reducción de la proliferación de células endoteliales requeridas para la angiogénesis. El mecanismo descrito de inhibición del ITC de la vía de mTOR es a través de su interacción directa con el canal de aniones dependiente de voltaje 1 (VDAC1), que modula el cociente de AMP/ATP celular y el metabolismo mitocondrial. Como

consecuencia de la inhibición, se incrementa el cociente AMP/ATP que lleva a la activación de la AMPK y finalmente conlleva a la inhibición de la vía mTOR¹⁸¹. En conjunto, el uso del ITC como un fármaco que inhibe la vía de Shh, de la vía de mTOR y la vía WNT/ β -catenina hace de este fármaco un candidato terapéutico para el tratamiento del cáncer cervical.

CONCLUSIONES

La activación de la vía de Shh, junto con el estradiol y los oncogenes E6/E7 del HPV-16, son factores que participan en el proceso de regeneración de las heridas realizadas en la piel de las orejas.

La vía de Shh se activa en la renovación del epitelio cervical de forma natural y es más activa en las etapas de crecimiento estro y proestro.

La expresión de los oncogenes E6 y E7 del HPV-16 y el estradiol exógeno en el modelo murino Tg(K6b-E6/E7) promueven la activación de la vía de señalización de Shh durante la etapa inicial de la carcinogénesis.

El itraconazol es eficiente al inhibir el crecimiento del epitelio cervical inducido por los oncogenes E6/E7 y el estradiol, pero su mecanismo de inhibición incluye otras vías de señalización distintas a la de Hh.

PERSPECTIVAS

Determinar mediante qRT-PCR la expresión de los componentes moleculares de la vía de Hh y la expresión de las proteínas durante las etapas de crecimiento del epitelio cervical durante el ciclo estral, así como en el crecimiento inducido por estradiol y los oncogenes E6/E7.

Determinar si durante el desarrollo del tumor cervical, inducido por la expresión de *Hras* y los oncogenes E6 y E7, la vía de Shh se activa.

Determinar si la inhibición de la vía de Hh limita la biosíntesis de estradiol en el modelo Tg(K6b-E6/E7).

Evaluar en el modelo Tg(K6b-E6/E7) si la vía de mTOR y la vía WNT/ β -catenina son activadas durante las etapas tempranas de la carcinogénesis cervical.

Demostrar si el itraconazol inhibe la vía de mTOR y la vía WNT/ β -catenina

Evaluar en el modelo de Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) la eficacia de otros inhibidores de la vía a nivel de Smo e inhibidores de Gli.

REFERENCIAS

1. Fortoul van der Goes, T. I. *Histología y biología celular (3a. ed.)*. (McGraw-Hill Interamericana, 2017).
2. Rehfeld, A., Nylander, M. & Karnov, K. Epithelial Tissue. in *Compendium of Histology* 79–99 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-41873-5_5.
3. Spencer, T. E., Hayashi, K., Hu, J. & Carpenter, K. D. B. T.-C. T. in D. B. Comparative Developmental Biology of the Mammalian Uterus. in vol. 68 85–122 (Academic Press, 2005).
4. Ellis, H. Anatomy of the uterus. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* (2011) doi:10.1016/j.mpaic.2010.11.005.
5. Anatomy Medicine (2020, mayo) Obtenido de <https://anatomy-medicine.com/endocrine-system/101-the-uterus.html>. (2020).
6. Dallenbach-Hellweg, Doeberitz, M. von K., J.Trunk, M. & Trunk, M. J. Normal Histology, Regeneration, and Repair. in *Color Atlas of Histopathology of the Cervix Uteri* 13–31 (Springer Berlin Heidelberg, 2006). doi:10.1007/3-540-29726-X_4.
7. Hopman, A. H. N. & Ramaekers, F. C. S. Development of the Uterine Cervix and Its Implications for the Pathogenesis of Cervical Cancer. in *Pathology of the Cervix* (ed. Herrington C. Simon) 1–20 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-51257-0_1.
8. Pontén, F., Jirström, K. & Uhlen, M. The Human Protein Atlas—a tool for pathology. *J. Pathol.* **216**, 387–393 (2008).
9. de Martel, C., Plummer, M., Vignat, J. & Franceschi, S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int. J. Cancer* **141**, 664–670 (2017).
10. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, B. F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. *International Agency for Research on Cancer* <https://gco.iarc.fr/today> (2018).
11. Hausen, H. zur. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1288**, F55–F78 (1996).

12. Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B. & Gissmann, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* **24**, S1–S10 (2006).
13. Bosch, F. X., Lorincz, A., Muñoz, N., Meijer, C. J. L. M. & Shah, K. V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology* vol. 55 244–265 (2002).
14. Moreno, V. *et al.* Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: The IARC multicentric case-control study. *Lancet* **359**, 1085–1092 (2002).
15. Vonsky, M. *et al.* Carcinogenesis Associated with Human Papillomavirus Infection. Mechanisms and Potential for Immunotherapy. *Biochem.* **84**, 782–799 (2019).
16. Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C. & Murakami, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol.* **25**, 2–23 (2015).
17. Doorbar, J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**, S7-15 (2005).
18. Doorbar, J. *et al.* The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* vol. 30 (2012).
19. Bergvall, M., Melendy, T. & Archambault, J. The E1 proteins. *Virology* **445**, 35–56 (2013).
20. McBride, A. A. The Papillomavirus E2 proteins. *Virology* (2013) doi:10.1016/j.virol.2013.06.006.
21. Doorbar, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* **445**, 80–98 (2013).
22. Venuti, A. *et al.* Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol. Cancer* **10**, 140 (2011).
23. Kabsch, K. & Alonso, A. The Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein Impairs TRAIL- and FasL-Mediated Apoptosis in HaCaT Cells by Different Mechanisms. *J. Virol.* **76**, 12162–12172 (2002).
24. Campo, M. S. *et al.* HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* **407**, 137–142 (2010).
25. Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129–1136 (1990).

26. Pang, C. L. & Thierry, F. Human papillomavirus proteins as prospective therapeutic targets. *Microb. Pathog.* **58**, 55–65 (2013).
27. Chen, J. Signaling pathways in HPV-associated cancers and therapeutic implications. *Rev. Med. Virol.* **25**, 24–53 (2015).
28. Ganti, K. *et al.* The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy. *Viruses* **7**, 3530–3551 (2015).
29. Pim, D. *et al.* Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting. *FEBS J.* **279**, 3530–3537 (2012).
30. Ganti, K. *et al.* The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy. *Viruses* **7**, 3530–3551 (2015).
31. Contreras-Paredes, A., De la Cruz-Hernández, E., Martínez-Ramírez, I., Dueñas-González, A. & Lizano, M. E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. *Virology* **383**, 78–85 (2009).
32. Gewin, L. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev.* **18**, 2269–2282 (2004).
33. Garnett, T. O. & Duerksen-Hughes, P. J. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch. Virol.* **151**, 2321–2335 (2006).
34. Moody, C. A. & Laimins, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 550–560 (2010).
35. Menges, C. W., Baglia, L. A., Lapoint, R. & McCance, D. J. Human Papillomavirus Type 16 E7 Up-regulates AKT Activity through the Retinoblastoma Protein. *Cancer Res.* **66**, 5555–5559 (2006).
36. Pim, D., Massimi, P., Dilworth, S. M. & Banks, L. Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A. *Oncogene* **24**, 7830–7838 (2005).
37. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27–30 (2000).
38. Flores, E. R., Allen-Hoffmann, B. L., Lee, D. & Lambert, P. F. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* **74**, 6622–6631 (2000).

39. Kirnbauer, R. *et al.* Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J. Virol.* **67**, 6929 LP – 6936 (1993).
40. DiGiuseppe, S., Bienkowska-Haba, M., Guion, L. G. & Sapp, M. Cruising the cellular highways: How human papillomavirus travels from the surface to the nucleus. *Virus Res.* **231**, 1–9 (2017).
41. Schiller, J. T., Day, P. M. & Kines, R. C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol. Oncol.* **118**, S12–S17 (2010).
42. Chow LT, Broker TR, S. B. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS* **118**, 422–449 (2010).
43. Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin. Sci. (Lond)*. **110**, 525–41 (2006).
44. Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C. & Huber, J. C. Production and Actions of Estrogens. *N. Engl. J. Med.* **346**, 340–352 (2002).
45. Chung, S.-H., Franceschi, S. & Lambert, P. F. Estrogen and ERalpha: culprits in cervical cancer? *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 504–11 (2010).
46. Marino, M., Galluzzo, P. & Ascenzi, P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* **7**, 497–508 (2006).
47. Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C. & Huber, J. C. Production and Actions of Estrogens. *N. Engl. J. Med.* **346**, 340–352 (2002).
48. Combined estrogen-progestogen menopausal therapy. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks to Humans* **100 A**, 263–296 (2011).
49. Kim, C. J. *et al.* Regulation of cell growth and HPV genes by exogenous estrogen in cervical cancer cells. *Int. J. Gynecol. Cancer* **10**, 157–164 (2000).
50. Hwang, J.-Y., Lin, B.-Y., Tang, F.-M. & Yu, W. C. Y. Tamoxifen Stimulates Human Papillomavirus Type 16 Gene Expression and Cell Proliferation in a Cervical Cancer Cell Line. *Cancer Res.* **52**, 6848 LP – 6852 (1992).
51. Antinore, M. J., Birrer, M. J., Patel, D., Nader, L. & McCance, D. J. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J.* **15**, 1950–1960 (1996).
52. Chan, W.-K., Chong, T., Bernard, H.-U. & Klock, G. Transcription of the transforming genes of the oncogenic human papillomavirus-16 is stimulated by

- tumor promoters through AP1 binding sites. *Nucleic Acids Res.* **18**, 763–769 (1990).
53. Chung, S.-H., Shin, M. K., Korach, K. S. & Lambert, P. F. Requirement for Stromal Estrogen Receptor Alpha in Cervical Neoplasia. *Horm. Cancer* **4**, 50–59 (2013).
 54. Schiffman, M. & Wentzensen, N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **22**, 553–560 (2013).
 55. Hajdu, S. I. The link between koilocytes and human papillomaviruses. *Annals of Clinical and Laboratory Science* (2006).
 56. Krawczyk, E. *et al.* Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am. J. Pathol.* **173**, 682–688 (2008).
 57. Schiffman, M. *et al.* Carcinogenic human papillomavirus infection. **2**, 16086 (2016).
 58. Poss, K. D. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat Rev Genet* **11**, 710–722 (2010).
 59. Seifert, A. W. & Muneoka, K. The blastema and epimorphic regeneration in mammals. *Dev. Biol.* **433**, 190–199 (2018).
 60. Reinke, J. M. & Sorg, H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* **49**, 35–43 (2012).
 61. Williams-Boyce, P. K. & Daniel, J. C. Regeneration of rabbit ear tissue. *J. Exp. Zool.* **212**, 243–253 (1980).
 62. Clark, L. D., Clark, R. K. & Heber-Katz, E. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. *Clin Immunol Immunopathol* **88**, 35–45 (1998).
 63. Heydemann, A. The super super-healing MRL mouse strain. *Front. Biol. (Beijing)*. **7**, 522–538 (2012).
 64. Bedelbaeva, K. *et al.* Lack of p21 expression links cell cycle control and appendage regeneration in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 5845–5850 (2010).
 65. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**, 539–545 (2001).
 66. Beachy, P. A., Karhadkar, S. S. & Berman, D. M. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* **432**, 324–331 (2004).

67. Schäfer, M. & Werner, S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 628–638 (2008).
68. Plummer, M. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob. Heal.* **4**, e609–e616 (2016).
69. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860–867 (2002).
70. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
71. Oike, Y. *et al.* Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling, and regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 9494–9499 (2003).
72. Singh, B. N. *et al.* Hedgehog Signaling during Appendage Development and Regeneration. *Genes (Basel)* **6**, 417–435 (2015).
73. Takebe, N. *et al.* Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol* **12**, 445–464 (2015).
74. Choudhry, Z. *et al.* Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Ann Neurosci* **21**, 28–31 (2014).
75. Varjosalo, M. & Taipale, J. Hedgehog: Functions and mechanisms. *Genes Dev.* **22**, 2454–2472 (2008).
76. Lewis, P. M. *et al.* Cholesterol Modification of Sonic Hedgehog Is Required for Long-Range Signaling Activity and Effective Modulation of Signaling by Ptc1. *Cell* **105**, 599–612 (2001).
77. Briscoe, J. & Therond, P. P. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 416–429 (2013).
78. Qi, X., Schmiede, P., Coutavas, E., Wang, J. & Li, X. Structures of human Patched and its complex with native palmitoylated sonic hedgehog. *Nature* **560**, 128–132 (2018).
79. Wolf, I. *et al.* Unmasking of epigenetically silenced genes reveals DNA promoter methylation and reduced expression of PTCH in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **105**, 139–155 (2007).
80. Nedelcu, D., Liu, J., Xu, Y., Jao, C. & Salic, A. Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothed in Hedgehog signaling. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 557–564 (2013).

81. Huang, P. *et al.* Structural Basis of Smoothened Activation in Hedgehog Signaling. *Cell* **174**, 312-324.e16 (2018).
82. Taipale, J., Cooper, M. K., Maiti, T. & Beachy, P. A. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* **418**, 892–897 (2002).
83. Oh, K. J. *et al.* The papillomavirus E7 oncoprotein is ubiquitinated by Ubch7 and Cullin 1- and Skp2-containing E3 ligase. *J Virol* **78**, 5338–5346 (2004).
84. Pak, E. & Segal, R. A. Hedgehog Signal Transduction: Key Players, Oncogenic Drivers, and Cancer Therapy. *Dev. Cell* **38**, 333–344 (2016).
85. Skoda, A. M. *et al.* The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **18**, 8–20 (2018).
86. Niewiadomski, P. *et al.* Gli Protein Activity Is Controlled by Multisite Phosphorylation in Vertebrate Hedgehog Signaling. *Cell Rep.* **6**, 168–181 (2014).
87. Scales, S. J. & de Sauvage, F. J. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 303–312 (2009).
88. Magrane, M. & Consortium, U. UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database* **2011**, (2011).
89. Shahi, M. H. *et al.* Regulation of sonic hedgehog-GLI1 downstream target genes PTCH1, Cyclin D2, Plakoglobin, PAX6 and NKX2.2 and their epigenetic status in medulloblastoma and astrocytoma. *BMC Cancer* **10**, 614 (2010).
90. Chiang, C. *et al.* Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407–413 (1996).
91. Pepicelli, C. V, Lewis, P. M. & McMahon, A. P. Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol* **8**, 1083–1086 (1998).
92. Litingtung, Y., Lei, L., Westphal, H. & Chiang, C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet* **20**, 58–61 (1998).
93. Stamatakis, D., Ulloa, F., Tsoni, S. V, Mynett, A. & Briscoe, J. A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev* **19**, 626–641 (2005).
94. Andrews, M. G., Kong, J., Novitch, B. G. & Butler, S. J. Chapter Twelve - New perspectives on the mechanisms establishing the dorsal-ventral axis of the spinal cord. in *Organ Development* (ed. Wellik, D. M. B. T.-C. T. in D. B.) vol. 132 417–

- 450 (Academic Press, 2019).
95. Ribes, V. & Briscoe, J. Establishing and Interpreting Graded Sonic Hedgehog Signaling during Vertebrate Neural Tube Patterning: The Role of Negative Feedback. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a002014–a002014 (2009).
 96. Lewandowski, J. P. *et al.* Spatiotemporal regulation of GLI target genes in the mammalian limb bud. *Dev. Biol.* **406**, 92–103 (2015).
 97. Goldman, D. Regeneration, morphogenesis and self-organization. *Development* **141**, 2745–2749 (2014).
 98. Millar, S. E. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol* **118**, 216–225 (2002).
 99. Oro, A. E. & Higgins, K. Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception. *Dev. Biol.* **255**, 238–248 (2003).
 100. Brownell, I., Guevara, E., Bai, C. B., Loomis, C. A. & Joyner, A. L. Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells. *Cell Stem Cell* **8**, 552–565 (2011).
 101. Sato, N., Leopold, P. L. & Crystal, R. G. Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of Sonic hedgehog. *J Clin Invest* **104**, 855–864 (1999).
 102. Stepan, V. *et al.* Regulation and function of the sonic hedgehog signal transduction pathway in isolated gastric parietal cells. *J Biol Chem* **280**, 15700–15708 (2005).
 103. Tanaka, T. *et al.* Expression level of sonic hedgehog correlated with the speed of gastric mucosa regeneration in artificial gastric ulcers. *J Gastroenterol Hepatol* **29**, 736–741 (2014).
 104. Lepper, C., Partridge, T. A. & Fan, C. M. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* **138**, 3639–3646 (2011).
 105. Straface, G. *et al.* Sonic hedgehog regulates angiogenesis and myogenesis during post-natal skeletal muscle regeneration. *J Cell Mol Med* **13**, 2424–2435 (2009).
 106. Hanna, A. & Shevde, L. A. Hedgehog signaling: Modulation of cancer properties and tumor microenvironment. *Mol. Cancer* **15**, 24 (2016).
 107. Kudchadkar, R., Lewis, K. & Gonzalez, R. Advances in the treatment of Basal cell

- carcinoma: Hedgehog inhibitors. *Semin Oncol* **39**, 139–144 (2012).
108. Wang, X. *et al.* Sonic hedgehog regulates Bmi1 in human medulloblastoma brain tumor-initiating cells. *Oncogene* **31**, 187–199 (2012).
 109. Nilsson, M. Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 3438–3443 (2000).
 110. Oro, A. E. *et al.* Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science (80-.).* **276**, 817–821 (1997).
 111. Aszterbaum, M. *et al.* Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice. *Nat. Med.* **5**, 1285–1291 (1999).
 112. Xie, J. *et al.* Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* **391**, 90–92 (1998).
 113. Kasper, M., Jaks, V., Fiaschi, M. & Toftgard, R. Hedgehog signalling in breast cancer. *Carcinogenesis* **30**, 903–911 (2009).
 114. Kasper, M., Jaks, V., Hohl, D. & Toftgård, R. Basal cell carcinoma — molecular biology and potential new therapies. *J. Clin. Invest.* **122**, 455–463 (2012).
 115. Aberger, F., Kern, D., Greil, R. & Hartmann, T. N. Canonical and Noncanonical Hedgehog/GLI Signaling in Hematological Malignancies. in *Vitamins and Hormones* 25–54 (2012). doi:10.1016/B978-0-12-394622-5.00002-X.
 116. Sanchez, P. *et al.* Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 12561–12566 (2004).
 117. Yang, L., Xie, G., Fan, Q. & Xie, J. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. *Oncogene* vol. 29 469–481 (2010).
 118. Saqui-Salces, M. & Merchant, J. L. Hedgehog signaling and gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 786–795 (2010).
 119. Singh, S. *et al.* Hedgehog-producing cancer cells respond to and require autocrine Hedgehog activity. *Cancer Res* **71**, 4454–4463 (2011).
 120. Chung, M. K. *et al.* Hedgehog signaling regulates proliferation of prostate cancer cells via stathmin1. *Clin Exp Med* **10**, 51–57 (2010).

121. Tian, H. *et al.* Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4254–4259 (2009).
122. Dierks, C. *et al.* Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med* **13**, 944–951 (2007).
123. Rohatgi, R., Milenkovic, L., Corcoran, R. B. & Scott, M. P. Hedgehog signal transduction by Smoothed: Pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 3196–3201 (2009).
124. Taipale, J. *et al.* Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* **406**, 1005–1009 (2000).
125. Zhao, Y., Tong, C. & Jiang, J. Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch. *Nature* **450**, 252–258 (2007).
126. Che, J., Zhang, F. Z., Zhao, C. Q., Hu, X. D. & Fan, S. J. Cyclopamine is a novel Hedgehog signaling inhibitor with significant anti-proliferative, anti-invasive and anti-estrogenic potency in human breast cancer cells. *Oncol Lett* **5**, 1417–1421 (2013).
127. Lauth, M., Bergstrom, A., Shimokawa, T. & Toftgard, R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 8455–8460 (2007).
128. Lipinski, R. J. *et al.* Dose- and route-dependent teratogenicity, toxicity, and pharmacokinetic profiles of the hedgehog signaling antagonist cyclopamine in the mouse. *Toxicol. Sci.* **104**, 189–197 (2008).
129. Tremblay, M. R., McGovern, K., Read, M. A. & Castro, A. C. New developments in the discovery of small molecule Hedgehog pathway antagonists. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 428–435 (2010).
130. Sekulic, A. *et al.* Efficacy and Safety of Vismodegib in Advanced Basal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2171–2179 (2012).
131. Kim, J. *et al.* Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell* **17**, 388–399 (2010).
132. Kim, D. J. *et al.* Open-label, exploratory phase II trial of oral itraconazole for the treatment of basal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **32**, 745–751 (2014).
133. Antonarakis, E. S. *et al.* Repurposing itraconazole as a treatment for advanced prostate cancer: a noncomparative randomized phase II trial in men with metastatic

- castration-resistant prostate cancer. *Oncologist* **18**, 163–73 (2013).
134. Liu, R. *et al.* Itraconazole suppresses the growth of glioblastoma through induction of autophagy. *Autophagy* **10**, 1241–1255 (2014).
 135. Mastrangelo, E. & Milani, M. Role and inhibition of GLI1 protein in cancer. *Lung Cancer Targets Ther. Volume 9*, 35–43 (2018).
 136. Arbeit, J. M., Münger, K., Howley, P. M. & Hanahan, D. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J. Virol.* (1994).
 137. Riley, R. R. *et al.* Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res.* **63**, 4862–4871 (2003).
 138. Brake, T. & Lambert, P. F. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2490–5 (2005).
 139. Arbeit, J. M., Howley, P. M. & Hanahan, D. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2930–5 (1996).
 140. Elson, D. A. *et al.* Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer Res.* **60**, 1267–1275 (2000).
 141. Chung, S.-H., Wiedmeyer, K., Shai, A., Korach, K. S. & Lambert, P. F. Requirement for Estrogen Receptor in a Mouse Model for Human Papillomavirus-Associated Cervical Cancer. *Cancer Res.* **68**, 9928–9934 (2008).
 142. Spurgeon, M. E., Chung, S. H. & Lambert, P. F. Recurrence of cervical cancer in mice after selective estrogen receptor modulator therapy. *Am J Pathol* **184**, 530–540 (2014).
 143. Escalante-Alcalde, D. *et al.* Expression of E6 and E7 papillomavirus oncogenes in the outer root sheath of hair follicles extends the growth phase and bypasses resting at telogen. *Cell Growth Differ* **11**, 527–539 (2000).
 144. Valencia, C. *et al.* Human papillomavirus E6/E7 oncogenes promote mouse ear regeneration by increasing the rate of wound re-epithelization and epidermal growth. *J Invest Dermatol* **128**, 2894–2903 (2008).
 145. Navarro, J. M., Casatorres, J. & Jorcano, J. L. Elements Controlling the Expression

- and Induction of the Skin Hyperproliferation-associated Keratin K6. *J. Biol. Chem.* **270**, 21362–21367 (1995).
146. Ramírez, A., Bravo, A., Jorcano, J. L. & Vidal, M. Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development. *Differentiation* **58**, 53–64 (1994).
 147. Heber-Katz, E. The regenerating mouse ear. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 415–419 (1999).
 148. Williams-Boyce, P. K. & Daniel, J. C. Comparison of ear tissue regeneration in mammals. *J. Anat.* **149**, 55–63 (1986).
 149. Garcia, C. *et al.* E6/E7 oncogenes in epithelial suprabasal layers and estradiol promote cervical growth and ear regeneration. *Oncogenesis* vol. 6 e374 (2017).
 150. Tata, P. R. *et al.* Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature* **503**, 218–223 (2013).
 151. Oviedo, N. J. & Beane, W. S. Regeneration: The origin of cancer or a possible cure? *Semin Cell Dev Biol* **20**, 557–564 (2009).
 152. Perryman, S. V & Sylvester, K. G. Repair and regeneration: opportunities for carcinogenesis from tissue stem cells. *J Cell Mol Med* **10**, 292–308 (2006).
 153. Xuan, Y. H. *et al.* Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions. *Mod Pathol* **19**, 1139–1147 (2006).
 154. Chaudary, N. *et al.* Hedgehog pathway signaling in cervical carcinoma and outcome after chemoradiation. *Cancer* **118**, 3105–3115 (2012).
 155. Chakraborty, C. *et al.* Inactivation of PTCH1 is associated with the development of cervical carcinoma: clinical and prognostic implication. *Tumor Biol.* **36**, 1143–1154 (2015).
 156. Vishnoi, K. *et al.* Cross-talk between Human Papillomavirus Oncoproteins and Hedgehog Signaling Synergistically Promotes Stemness in Cervical Cancer Cells. *Sci Rep* **6**, 34377 (2016).
 157. Chen, H., Wang, J., Yang, H., Chen, D. & Li, P. Association between FOXM1 and hedgehog signaling pathway in human cervical carcinoma by tissue microarray analysis. *Oncol. Lett.* **12**, 2664–2673 (2016).

158. Petrovic, I. *et al.* SOX18 Is a novel target gene of hedgehog signaling in cervical carcinoma cell lines. *PLoS One* **10**, (2015).
159. Sadikot, R. T. & Blackwell, T. S. Bioluminescence imaging. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2**, 512–537 (2005).
160. Welsh, D. K. & Kay, S. A. Bioluminescence imaging in living organisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 73–78 (2005).
161. Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M. & Kondoh, H. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* **124**, 1313–1322 (1997).
162. Kimura, H., Ng, J. M. & Curran, T. Transient inhibition of the Hedgehog pathway in young mice causes permanent defects in bone structure. *Cancer Cell* **13**, 249–260 (2008).
163. Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314–321 (2008).
164. Westwood, F. R. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol* **36**, 375–384 (2008).
165. Goldman, J. M., Murr, A. S. & Cooper, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res. Part B - Dev. Reprod. Toxicol.* **80**, 84–97 (2007).
166. Rubin, A. I., Chen, E. H. & Ratner, D. Basal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2262–2269 (2005).
167. Hatsell, S. & Frost, A. R. Hedgehog signaling in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **12**, 163–173 (2007).
168. Varnat, F. *et al.* Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol. Med.* **1**, 338 LP – 351 (2009).
169. Shaw, A., Gipp, J. & Bushman, W. The Sonic Hedgehog pathway stimulates prostate tumor growth by paracrine signaling and recapitulates embryonic gene expression in tumor myofibroblasts. *Oncogene* **28**, 4480–4490 (2009).
170. Ouspenskaia, T., Matos, I., Mertz, A. F., Fiore, V. F. & Fuchs, E. WNT-SHH Antagonism Specifies and Expands Stem Cells prior to Niche Formation. *Cell* **164**, 156–169 (2016).

171. Chiang, C. *et al.* Manifestation of the Limb Prepattern: Limb Development in the Absence of Sonic Hedgehog Function. *Dev. Biol.* **236**, 421–435 (2001).
172. Ahn, S. & Joyner, A. L. Dynamic Changes in the Response of Cells to Positive Hedgehog Signaling during Mouse Limb Patterning. *Cell* **118**, 505–516 (2004).
173. Ueda, T. *et al.* Itraconazole Modulates Hedgehog, WNT/ β -catenin, as well as Akt Signalling, and Inhibits Proliferation of Cervical Cancer Cells. *Anticancer Res.* **37**, 3521–3526 (2017).
174. BUTCHER, R. L., COLLINS, W. E. & FUGO, N. W. Plasma Concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 β Throughout the 4-Day Estrous Cycle of the Rat. *Endocrinology* **94**, 1704–1708 (1974).
175. Tang, C. *et al.* Hedgehog signaling stimulates the conversion of cholesterol to steroids. *Cell. Signal.* **27**, 487–497 (2015).
176. Koga, K. *et al.* Novel link between estrogen receptor α and hedgehog pathway in breast cancer. *Anticancer Res.* **28**, 731–739 (2008).
177. di Magliano, M. P. & Hebrok, M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 903–911 (2003).
178. Fan, H. & Khavari, P. A. Sonic hedgehog opposes epithelial cell cycle arrest. *J Cell Biol* **147**, 71–76 (1999).
179. Samarzija, I. & Beard, P. Hedgehog pathway regulators influence cervical cancer cell proliferation, survival and migration. *Biochem Biophys Res Commun* **425**, 64–69 (2012).
180. Chong, C. R. *et al.* Inhibition of angiogenesis by the antifungal drug itraconazole. *ACS Chem. Biol.* **2**, 263–270 (2007).
181. Head, S. A. *et al.* Antifungal drug itraconazole targets VDAC1 to modulate the AMPK/mTOR signaling axis in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E7276 LP-E7285 (2015).

ANEXO 1

- 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD) al 10%

Pesar 1 g de HPCD y adicionar 10 mL de H₂O purificada, previamente filtrada usando una membrana de 0.22 μ m. Se agita en vórtex hasta disolver completamente la HPCD.

- Preparación de itraconazol (ITC)

El itraconazol proveniente de las capsulas de Sporanox de Janssen-Cilag se pesó el contenido (granulado) de 10 capsulas y se tomó el valor promedio de ellas.

1 cápsula en promedio pesó = 465.5 mg de granulado

1 cápsula contiene 100 mg de ITC

Para preparar una suspensión de ITC de 10 mg/mL se pesaron 466 mg del granulado y se disolvieron en 10 mL de HPCD al 10%. La mezcla se vortexea y se deja en agitación contante durante 4-5 h.

Cubrir de la luz y almacenar a 4°C. Para administrar suspender.

- Buffer de citratos/fosfatos 0.1 M pH3 e HPCD al 10%

	Para 100 mL
Na ₂ HPO ₄ 0.2 M	0.21 g
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ • H ₂ O) 0.1 M	0.28 g

Preparar la solución de Na₂HPO₄ y de ácido cítrico con agua purificada. Para obtener el pH3, tomar y mezclar 79.5 mL de Ácido cítrico 0.1 M y 20.5 mL de Na₂HPO₄ 0.2 M.

A 10 mL de buffer de citratos/fosfatos 0.1 M pH3 adicionar 1g HPCD. Disolver y filtrar usando una membrana de 0.22 μ m el buffer y almacenar a 4°C.

- Preparación de ciclopamina (CYC) 2.5 mg/mL

El vial que contiene de 5 mg de CYC se adicionaron 2 mL de buffer de citratos/fosfatos 0.1 M pH3 e HPCD al 10%

- Luciferina 100 mM

Se pesaron 318.4 mg de D-luciferina y se disolvieron en 10 mL de PBS 1x pH 7.4. La solución se filtra con una membrana de 0.22 μ m y se almacena hasta su uso en alícuotas de 1 mL a -20°C.

Soluciones para ISH

- SSC 20X

	Para 150 mL
3 M NaCl	26.1 g
0.3 M Na ₃ citrato.H ₂ O	13.2 g

Disolver los componentes H₂O-DEPC y ajustar a pH 5 con ácido cítrico. Esterilizar con autoclave.

- Solución de Denhardt 50x

	Para 10 mL
1% Ficoll 400	0.1 g
1% de Polivinilpirolidona	0.1 g
1% Albúmina	0.1 g

Disolver los componentes H₂O milliQ, filtrar con membrana 0.22 μm y almacenar a -20°C

- H₂O-DEPC 0.1%

Disolver 1mL de Dietilpirocarbonato (DEPC) en 1 L de H₂O milliQ. Se deja agitar toda la noche. Esterilizar con autoclave

- Tris-HCl pH 9.5 1M

Disolver 121 g de tris base en 800 mL de H₂O milliQ y ajustar el pH con HCl concentrado. Esterilizar con autoclave

- Trietanolamina.Cl 0.1 M

Pesar y disolver 0.1857 g de trietanolamina en 10 mL de H₂O-DEPC. NO esterilizar con autoclave

- NaCl 5 M

Pesar y disolver 29 g de NaCl en 100 mL de H₂O-DEPC. Esterilizar con autoclave

- MgCl₂

Pesar y disolver 9.52g MgCl₂ en 100 mL de H₂O-DEPC. Esterilizar con autoclave

Todas las soluciones se preparan en frascos previamente horneados a 400°C por 4h

ANEXO 2

1. Artículo publicado derivado del trabajo de tesis:

Rojo-León, V., García, C., Valencia, C., Méndez, M.-A., Wood, C. & Covarrubias, L. The E6/E7 oncogenes of human papilloma virus and estradiol regulate hedgehog signaling activity in a murine model of cervical cancer. *Exp Cell Res* 2019; 381, 311–322

2. Artículos donde participé durante mis estudios del doctorado:

García, C., Hernandez-García, D., Valencia, C., Rojo-Leon, V., Perez-Estrada, J.-R., Werner, M., et al. E6/E7 oncogenes in epithelial suprabasal layers and estradiol promote cervical growth and ear regeneration. *Oncogenesis* 2017; 6, e374

Hernández-García, D., Fuentes-Jiménez, D., Rojo-León, V., Wood, C., García, C. & Covarrubias, L. Hedgehog signaling dynamics in mouse embryos determined by a bioluminescent reporter. *Int J Dev Biol* 2019; 63, 605–613



The E6/E7 oncogenes of human papilloma virus and estradiol regulate hedgehog signaling activity in a murine model of cervical cancer

Verónica Rojo-León, Celina García^{**}, Concepción Valencia, Marco-Antonio Méndez, Christopher Wood, Luis Covarrubias^{*}

Department of Developmental Genetics and Molecular Physiology, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Cuernavaca Morelos, 62210, México

ARTICLE INFO

Keywords:

E6/E7 oncogenes
Estradiol
Hedgehog
Cervical cancer

ABSTRACT

Human papilloma virus oncogenes and estradiol are major etiologic factors associated with cervical cancer. In order to understand the mechanism by which these two factors promote carcinogenesis, the role of the Hedgehog (Hh) signaling pathway was evaluated during the normal growth of cervical epithelium and in the presence of E6/E7 oncogenes and exogenous estradiol. Hh signaling activity was determined in live animals (i.e., Gli-Luc reporter levels) during the estrous cycle and was found to be higher in the cervical area during the major growth phases, proestrus-estrus, in comparison to the diestrus phase. The same pattern was observed in transgenic mice expressing the E6/E7 oncogenes, though with notably higher levels than in control mice. Adding estradiol also markedly increased Gli activity in the cervix and the skin. In agreement with the correlation between high bioluminescence and tissue growth in different context, cervical cell proliferation was reduced upon Hh signaling inhibition in mice. Treatment with itraconazole, a putative novel Hh inhibitor, at an early stage of cervical carcinogenesis, did not decrease Hh signaling but it did reduce growth. Therefore, Hh signaling likely contributes to cervical carcinogenesis and itraconazole is effective to reduce growth but by a mechanism involving additional signaling pathways.

1. Introduction

Despite campaigns promoting early diagnosis, cervical cancer remains a serious public health problem [1]. The human papillomavirus (HPV) is the prevalent etiologic agent of cervical cancer found in 90% of diagnosed cases [2]. However, cervical cancer clearly has a multifactorial origin since it only develops in a minority of women infected with high-risk HPV strains (e.g., HPV16, HPV18) [3]. In particular, high estrogen levels increase cervical cancer incidence rate which can be related to the natural growth promoting activity of estrogens on cervical tissue [4] or to the increase in expression of E6/E7 HPV oncogenes through enhancing the viral early promoter activity [5]. Progress of cervical carcinogenesis appears also to be driven by mutations in proto-oncogenes (e.g., *KRAS*) and in genes encoding molecules of specific signaling pathways that regulate growth (e.g., *PIK3CA*, *EGFR*) [6].

Hh signaling, frequently in association with its major activator Sonic Hh (Shh), has been found active in cancer cells of epithelial origin such as basal cell carcinoma [7], breast cancer [8], colon carcinoma [9]

and prostate cancer [10]. In addition, mutations in genes encoding major molecular components of the canonical Hh pathway (e.g., *Ptch1*, *Smo*) occur in human tumors [11]. In agreement with the Hh pathway contribution to carcinogenesis, mice overexpressing *Shh* [12], *Gli1* [13], and the constitutively active *Smo* [14], or mice heterozygous for a null *Ptch1* mutation [15], show susceptibility to develop tumors within the genetically altered tissue. The Hh pathway has been shown to be active during cervical carcinogenesis [16–18] and its participation is supported by a study revealing that the frequency of *Ptch1* deletions and of methylated *Ptch1* promoter increases as disease progresses [19]. Therefore, the Hh pathway likely contributes to cervical carcinogenesis, however, its interaction with other factors that promote cervical cancer (e.g., estradiol, HPV) is still poorly characterized.

Several models of human cancer have been developed in mice on the basis that oncogenes/tumour suppressors regulate the proliferation of stem/progenitor cells [20]. In Tg(K14-HPV16) [21] or Tg(K14-E6/E7) [22] mice, for example, HPV oncogenes are driven by the K14 promoter which is active in the epithelial basal layer, which is mainly

^{*} Corresponding author.

^{**} Corresponding author.

E-mail addresses: vrojo@ibt.unam.mx (V. Rojo-León), celina@ibt.unam.mx (C. García), valencia@ibt.unam.mx (C. Valencia), mmendez@ibt.unam.mx (M.-A. Méndez), chris@ibt.unam.mx (C. Wood), covs@ibt.unam.mx (L. Covarrubias).

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.05.024>

Received 10 December 2018; Received in revised form 25 April 2019; Accepted 19 May 2019

Available online 21 May 2019

0014-4827/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

composed of dividing progenitor cells. Hyperplasia of the basal layer is observed in these mice in the skin and cervical epithelium which, under chronic estradiol treatment, progresses into cervical carcinogenesis [21,22]. We generated the Tg(K6b-E6/E7) transgenic mouse line to model cervical carcinogenesis, but oncogenes are driven by the K6b promoter, mainly active in suprabasal layers [23,24]; it is worth noting that E6/E7 oncogenes in HPV infected cervical human tissue are mainly expressed in suprabasal layers [25]. Although, as expected, cells of suprabasal layers of epidermis and cervical epithelium of these mice initiate cell division, major epithelial abnormalities or signs of carcinogenesis are not observed and, instead, tissue regeneration/renewal increases [24]. As in Tg(K14-E6/E7) mice, Tg(K6b-E6/E7) mice initiate cervical carcinogenesis upon chronic estradiol treatment [24]. Here we report evidence that the Hh signaling pathway can contribute to cervical epithelial renewal and carcinogenesis in Tg(K6b-E6/E7) mice. Our data suggest that HPV oncogenes and estradiol increase Hh signaling and together promote cervical tissue growth.

2. Materials and methods

Animals. The genetic background of the mice used was that of the Fvb/N strain. Tg(K6b-E6/E7)-M8 transgenic mice have been previously described [23,24,26], whereas the Tg(Gli-Luc) transgenic mice used to report Hh signaling were characterized by Kimura et al. [27]. These latter mice contain a transgene composed of an artificial promoter containing eight Gli DNA binding sites upstream the firefly luciferase gene. Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) were derived by intercrossing heterozygous Tg(K6b-E6/E7) with homozygous Tg(Gli-Luc) mice resulting in Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) double-transgenic and Tg(Gli-Luc) heterozygous progeny (Fig. 1A). For genotyping female mice, Gli-Luc and K6b-E6/E7 transgenes were detected by PCR amplification of a fragment in tail genomic DNA that includes the promoter region and part of the luciferase gene (forward, 5'CGGGCGCGGTTCGGTAAAGT3'; reverse, 5'AACAACAACGGCGGGGGAAGT3') and a E7 gene fragment (forward, 5'CTCATCGATTACCTGCAGGATCAGCCATG3'; reverse, 5'CTCGGATCGATACCCAGCTGTAATCATGCATG3'), respectively.

Drug treatments. For long-term estradiol treatments (50 or 90 days), six-week-old Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(bK6-E6/E7) mice were anesthetized with Avertin (400 mg/kg) before subcutaneously implanting pellets loaded with β -estradiol (E2) 17-acetate (0.05 mg, 90-days release; NE-271, Innovative Research of America, USA). Cyclopamine (CYC, Merck Millipore, Germany) and itraconazole (ITC; Sporanox, Janssen-Cilag, Belgium) treatments were given to mice after 35 days of treatment with E2 or during proestrus. ITC [10 mg/ml in 10% (w/v) 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD); Sigma-Aldrich, USA] was applied by oral gavage (75 mg/kg or HPCD as control per day) for 15 days or 9 days (twice a day for depilated and ear perforated mice using water as vehicle), whereas CYC 10 mg/kg was applied by oral gavage every day for 4 days or two doses in 24 h, first 20 mg/kg and 12 h later 30 mg/kg. CYC was dissolved in 10% (w/v) HPCD in 0.1 M sodium citrate/phosphate solution (pH 3) at a concentration of 2.5 mg/mL. The mice were depilated with Nair cream (Church & Dwight Co., Inc.) two days after treatment with ITC and continued for 7 days longer. Ear perforation and hole closure monitoring and analysis was as previously described [24]. For the determination of cell proliferation, mice at proestrus phase were intraperitoneally injected with one dose of BrdU (50 μ g/g weight of mice) and 2 h later euthanized and their cervix dissected.

Ear hole closure monitoring. Twelve-week-old female transgenic mice were anesthetized with Avertin and 2 mm holes were made with a metal ear puncher in the center of both ears. The diameter of ear holes was measured at 28 days after punching and the regeneration efficiency classified in 4 categories as previously described [24].

Analysis of cervical-uterine epithelium. The estrous cycle phase was determined through the analysis of cell composition and morphology of vaginal smears stained with hematoxylin-eosin (H&E) along

28 days. The cervix was dissected and cervical-uterine epithelium was analyzed in 10 μ m slices of a specific estrous phase, and after treatment with E2, E2/ITC, E2/CYC or CYC. The slices were stained with H&E or used for Ki67 or BrdU immunodetection (anti-human Ki-67 and anti-BrdU monoclonal antibodies; Thermo-Fisher Scientific and BD BioSciences, respectively), as previously described [24] or for *in situ* hybridization. For short-term cervix culture, the cervix was dissected and longitudinally cut to obtain two fragments of the same cervix (control and treated). Subsequently, the cervix fragment was immersed in Williams' Medium containing DMSO (vehicle) or 50 μ M CYC or 10 μ M ITC and cultured for up to 8 h in a humidified 5%-CO₂ incubator at 37 °C.

In situ hybridization (ISH). Mouse *Shh*, *Gli1* and *Gli3* sequences were cloned into the pBluescript KS vector to produce the sense (T3 promoter) and antisense (T7 promoter) probes using the DIG RNA labeling kit from Roche (Mannheim, Germany). The ISH was performed on 10 μ m thick sections obtained from frozen tissues and fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde/PBS for 10 min at room temperature (RT). After washing with PBS-DEPC, the sections were acetylated 10 min in 0.25% acetic anhydride, 0.06 M HCl in 10 mM triethanolamine, rinsed 10 min in PBS-DEPC, and then incubated with the prehybridization solution [50% (v/v) formamide, 5X SSC, 500 μ g/ml yeast tRNA, 1X Denhardt's solution, DEPC-treated water] for 1 h at 42 °C. The probe was added to each tissue section at a concentration of 1 μ g/mL and hybridized overnight at 42 °C. After sequentially washing sections with 0.1X SSC at 48 °C, 0.1X SSC twice at 37 °C and 2X SSC at RT (10 min each) and incubating them for 10 min in a buffer containing 100 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl, pH 9.5, the hybridized probe was detected with an anti-digoxigenin-alkaline phosphatase antibody (1 h incubation at RT). Color development was done by incubation with a solution containing Nitro-Blue-Tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate for 1 h at RT; purple indicated specific hybridization. The sections after hybridization were photographed using an Olympus BX51 microscope.

In vivo Bioluminescence (BL) Imaging. Mice were anesthetized with intranasal 1% isoflurane (PiSA, Mexico) before intraperitoneal injection with a D-Luciferin solution (Gold Biotechnology, USA; 100 mM in sterile PBS; 150 mg/kg). The BL image capture was carried out 5 min after injection of D-Luciferin with the In-vivo Xtreme instrument (Bruker, Billerica, Massachusetts). BL image was captured in a 12 cm² (or 7.5 cm² for dissected cervix) field of view, using a binning factor of 4, aperture f/stop of 1, an acquisition time of 3 min, and an open filter. Images were taken when luciferase signals reached a steady-state plateau as determined with the In-vivo Xtreme. Animals that did not receive D-Luciferin displayed near undetectable levels of bioluminescence. Images were processed and the BL intensity was quantified using the Molecular Imaging Software (Bruker, Billerica, Massachusetts). The area to be quantified was defined with a circumference surrounding the region of interest (cervix *in vivo*, and dissected cervix). The signal intensity, corresponding to Gli activity, was expressed as the total sum of photon flux (photon/sec/mm²; p/s/mm²).

Cell culture assays. HeLa cells (ATCC[®] CCL-2[™]) were grown in DMEM medium with 10% fetal bovine serum and 1 mM sodium pyruvate. 15,000 cells were seeded into each well of a 24-well plate and incubated for 24 or 48 h with 10, 20 and 50 μ M of CYC or 0.01, 0.1, 1 and 10 μ M of ITC (Sigma-Aldrich, USA). Both drugs were dissolved in DMSO (control vehicle). At the end, cells were counted to estimate the duplication and viability rate by the trypan blue exclusion method.

Statistical analyses. All values are expressed as the mean \pm SEM. Fisher's exact test was used for the analysis of ear regeneration data; since there is a low correlation between a mouse and the regeneration efficiency of its ears, each ear was taken as an independent regeneration event [24]. Student's unpaired two-tailed *t*-test was performed to compare the BL around the closing hole at days 4 and 7 after punching between ears of Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice. For the analysis of the effects of treatments with CYC and ITC on HeLa cell

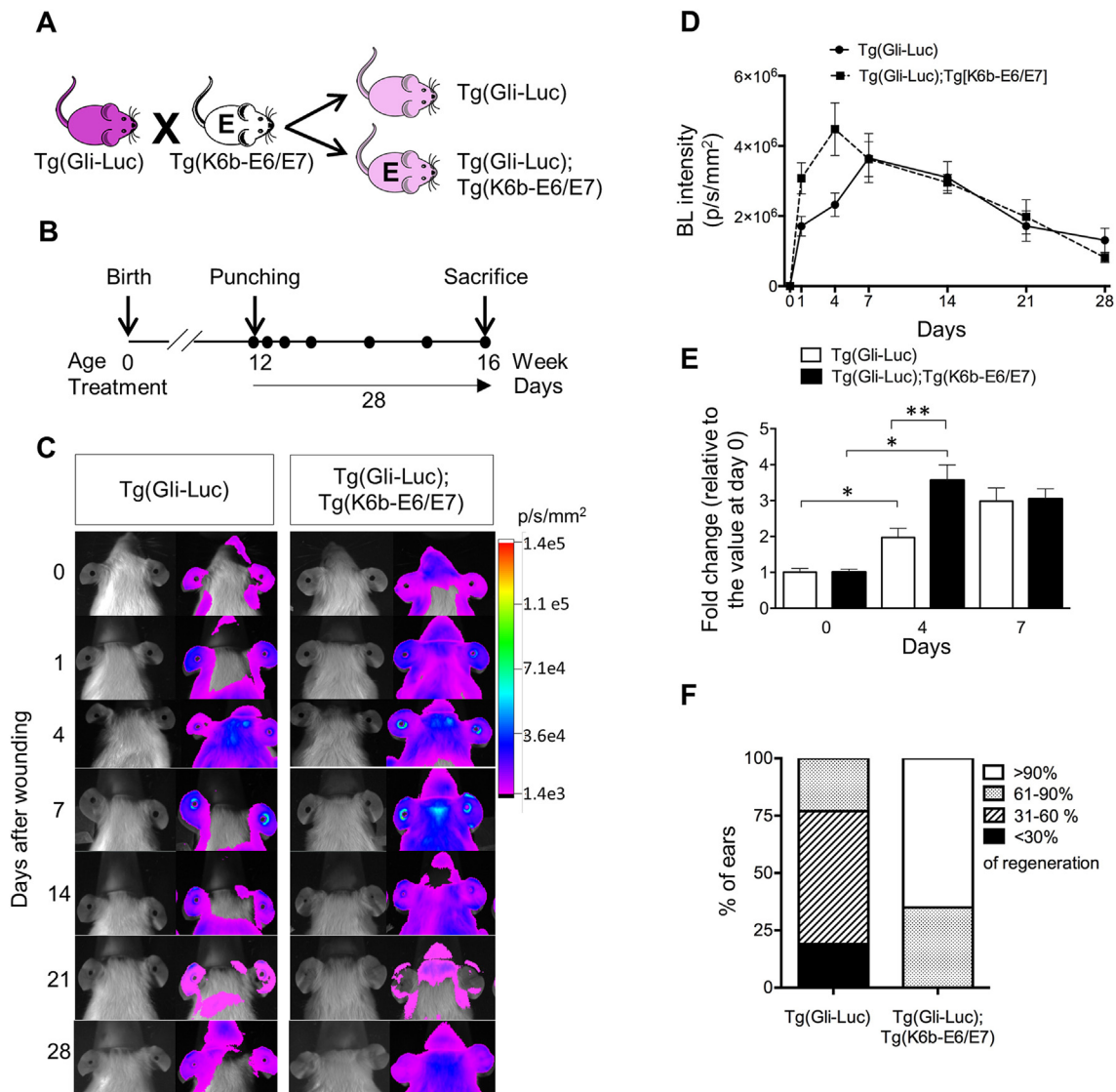


Fig. 1. Bioluminescence functional imaging of the Hh pathway activity during ear regeneration. A, The scheme illustrates the intercross between Tg(Gli-Luc) homozygous and Tg(K6b-E6/E7) heterozygous mice to obtain Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice heterozygous for both transgenes. B, Experimental design for BL analysis during the 28-day ear regeneration assay. C, BL in ears of Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc); Tg(K6b-E6/E7) mice during the regeneration assay. Note the increase in BL around the ear hole few days after punching and then a gradual decrease; the increment was more evident in ear of Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice. D, Quantification of BL intensity in the growing tissue area of perforated ears of Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice during the regeneration assay. E, fold change of BL intensity, relative to the value at day 0, at days 4 and 7 of regeneration. F, Percentage of ear regeneration in Tg(Gli-Luc) (n = 13) and Tg(Gli-Luc); Tg(K6b-E6/E7) (n = 11) mice. In D and E, the data shown correspond to the mean of BL intensity \pm SEM; *p = 0.0007, **p = 0.002.

proliferation, a one-way ANOVA was performed. When the data distribution was not normal, the Mann–Whitney Rank-Sum was performed to compare between the group of cervixes in diestrus and proestrus of the estrous cycle *in vivo* and *ex vivo* of Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice, and for quantification of Ki67⁺ cells. All tests used a significance level below 0.05. Statistical analyses were performed with the Graph Pad Prism software version 6 (La Jolla, USA).

3. Results

3.1. Bioluminescence functional imaging of Gli activity during skin and cervical epithelium renewal

Hh signaling is important for maintaining tissue homeostasis [28], and cancer development can be considered a dysregulation of the normal replacement of cells during tissue renewal in which an imbalance between cell proliferation and differentiation favors tissue

growth [29]. We previously showed that estradiol and E6/E7 increase skin growth, as estimated by the marked improvement in ear hole closure efficiency [24]. In agreement with the participation of the Hh pathway in this regeneration phenomenon, increase in Gli1 activity, a common indicator of Hh activity that can be determined by the gene reporter Gli-Luc in live mice, was an early response to ear perforation in Tg(Gli-Luc) mice (i.e., within the first 4 days; Fig. 1B–E), reached the maximum response during the growth phase (4–7 days post-perforation) and gradually decreased up to reaching the basal level when growth considerably slowed (Fig. 1C–F). The same pattern was observed in mice carrying E6/E7 but earlier and higher Gli activity was observed. These results suggest that the Hh pathway is activated in response to tissue damage and its activity correlates with growth during repair or in that induced by E6/E7.

The cervical epithelium of rodents renews every estrous cycle, a process lasting about 4–5 days and comprising four stages, proestrus, estrus, metestrus and diestrus. The growth period, encompassing

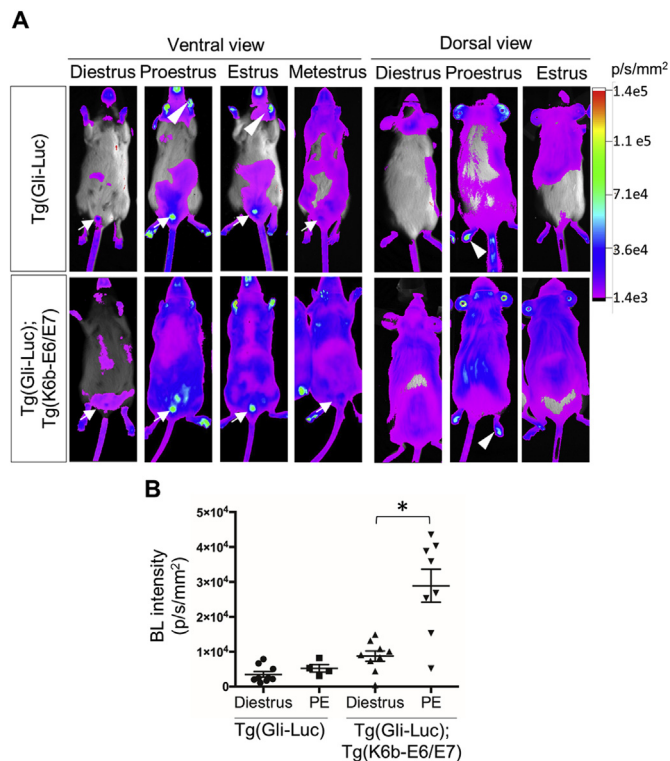


Fig. 2. Bioluminescence functional imaging of the Hh pathway during the estrous cycle in the skin and cervix. **A**, BL imaging of Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice at different phases of the estrous cycle; ventral view and dorsal view are shown. Note that the BL increased in the growth phases proestrus and estrus in tissues with high cell replacement such as limb pads (arrowheads) and skin, and was particularly evident also in the area corresponding to the female reproductive apparatus (arrows). Mice with either genotype showed the same BL pattern, but the intensity observed in Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) was greater. **B**, Quantification of BL intensity *in vivo* of dorsal body view, excluding limb pads and head. PE corresponds to quantification of BL intensity in animals at proestrus or estrus phases. The data shown correspond to the mean \pm SEM; geometric figures in the graph represent independent experimental events (n); * $p = 0.0007$.

proestrus and estrus, correlates with high estradiol levels. Our previous studies have shown that estradiol and E6/E7 positively influences the growth of both epidermis and cervical epithelium [24]. Interestingly, the BL intensity associated with Gli activity in Tg(Gli-Luc) mice was found to be higher in skin and in the cervical area during growth phases (proestrus and estrus) when compared to the degeneration/rest stages (metestrus and diestrus) (Fig. 2A and B). This same pattern was observed in Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) double-transgenic mice but, notably, broad BL intensity in skin and cervical area was greater. BL intensity was also markedly increased in the snout and fat pads, two regions with known high cell replacement (Fig. 2A).

Dissection of uterus, cervix, vulva and bladder showed that most of BL came from the cervix with little contribution from the uterus and vulva (Fig. 3A). Interestingly, as determined in live mice, the cervical region produced the highest BL in the proestrus-estrus period and the intensity was markedly reduced in the metestrus-diestrus period (Fig. 3B and C). Furthermore, BL intensity during proestrus-estrus in the cervical region of Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice was higher than in that of Tg(Gli-Luc) mice. Confirming these observations, the same pattern was observed in the cervix *ex vivo* to which the estrous cycle phase was verified by histological analyses (Fig. 3B and C). Cases in which BL intensity was significant at diestrus or metestrus, as estimated by the cell composition in vaginal smear, showed areas of thick epithelia in histological slices, condition that occurred more frequently in samples of Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice. Confirming that the BL

emitted from the cervix is associated with Hh signaling, a short-term (i.e., up to 8 h) treatment of cervix fragments with CYC, a Hh signaling inhibitor, decreased BL intensity as compared with control samples (Fig. 3D). *Shh* and *Gli1* mRNAs were not restricted to the basal layer during the growth stages but, rather, their levels formed a basal to suprabasal gradient. This distribution was not influenced by the presence of E6/E7 (Fig. 3E). Therefore, these results indicate that, as in the skin [30,31], the Hh pathway is activated by Shh during the natural renewal of the cervical epithelium and the signaling is potentiated by the action of E6/E7.

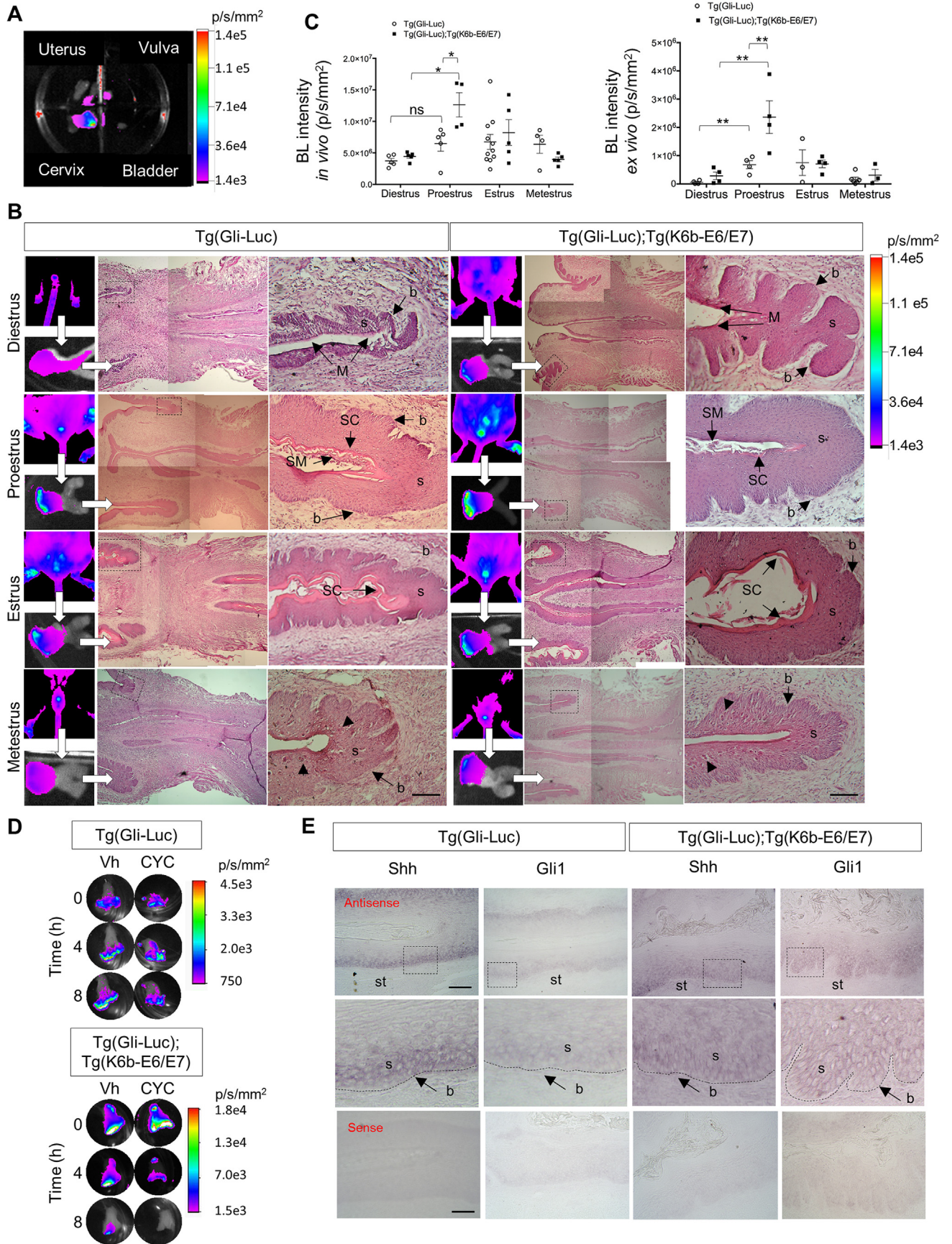
Treatment of mice at proestrus phase with CYC (2 doses) for 24 h decreased BL intensity in the cervix of Tg(Gli-Luc) mice but no change in BL intensity was apparent in the cervix of Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice (Fig. 4A and B). However, supporting the inhibitory Hh effect of CYC treatment, determination of *Gli1* mRNA levels by ISH showed a reduced area of *Gli1* expression in most cervical epithelial tissue of mice treated with CYC than in the equivalent tissue of mice treated with the vehicle (Fig. 4C). Interestingly, fewer cells along the cervical epithelium of mice treated with CYC than those of mice receiving the vehicle incorporated BrdU or were positive for the cell proliferation marker Ki67 (Fig. 4A, D). Therefore, as expected from the role of Shh in other stratified epithelia [32], Shh in the cervix regulates cell proliferation during growth phases.

3.2. The effect of estradiol and E6/E7 on Hh signaling during cervical carcinogenesis

The persistent presence of high levels of estradiol appears to be sufficient to promote cervical carcinogenesis when E6/E7 oncogenes are expressed in the cervical epithelium [21,22,24]. Interestingly, BL intensity associated with Gli-Luc in the cervical area increased across the 90 days of E2 treatment (Fig. 5A–C), but this was particularly evident in Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice in which maximum BL intensity was reached at around day 35 (Fig. 5B and C). In mice with or without E6/E7, the decrease in BL intensity was noticeable at day 63, although it remained fluctuating in Tg(Gli-Luc) mice (Fig. 5C). At the end of estradiol treatment (90 days), no differences were detected in BL intensity between Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice and the levels reached were similar to those detected in mice at metestrus or diestrus, whether determined in the cervix *in vivo* or *ex vivo* (Fig. 5B and C day 90 and Fig. 3C).

A histological analysis of samples of mice treated with E2, showed increased epithelial growth with frequent downgrowths, forming epithelial islands in few cases, in cervixes of mice of either genotype. However, tissue samples (piece that include endo- and exo-cervix) of Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) were usually larger (5 out of 6) than those of Tg(Gli-Luc) (1 out of 7), and a significant number of koilocyte-like structures (Fig. 5D) and suprabasal proliferating cells (Fig. 7A) were restricted to samples of Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7). Therefore, Hh signaling could contribute to cervical epithelial growth in response to estradiol and E6/E7, but as estimated by the Gli-Luc reporter, this would only occur at early stages, since it is apparent that the continuous action of this hormone, either in the presence or absence of E6/E7, eventually caused downregulation of Hh signaling.

Since E6/E7 acts through inducing re-entry to the cell cycle of suprabasal cells, rather than increasing growth by promoting basal cell proliferation, it was important to determine whether Shh signaling was altered at the cellular level within the epithelial tissue after long-term treatment with estradiol. Unexpectedly, during the proestrus-estrus period *Shh*, *Gli1* and *Gli3* mRNA changed from their normal location predominantly in the basal area with a gradient towards suprabasal layers, to a pattern in which the *Shh* mRNA appeared reduced in the basal area and extended towards suprabasal layers (Fig. 5E); this pattern was independent of the expression of E6/E7 (Figs. 5E and 7D). The relocation of Shh, *Gli1* and *Gli3* could be associated with the observed reduction in BL intensity, and supports the possibility of a direct



(caption on next page)

Fig. 3. Activation of the Hh pathway in the cervix during the growth phases of estrous cycle. **A**, BL obtained from the uterus, vulva, cervix and bladder of Tg(Gli-Luc) mice at estrus. **B**, BL images and histological photographs of the female reproductive apparatus of Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice. Left panels show the BL images captured from live animals (*in vivo*; upper panel) and from the corresponding dissected cervix-uterus (*ex vivo*; lower panel) throughout the estrous cycle. Slices of dissected tissue were stained with H&E; right images are magnifications of the area within the dotted squares. Mucification (M), stratum mucification (SM), stratum corneum (SC), polymorphonuclear cell infiltration (arrowhead), basal layer (b), suprabasal layer (s), stroma (st). **C**, Quantification of BL intensity in the cervical area *in vivo* and *ex vivo* and comparison between Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice at diestrus and proestrus. The data shown correspond to the mean of BL intensity \pm SEM of the selected area. Geometric figures in graphs represent independent experimental events (n); *p = 0.03, **p = 0.02 (ns, not significant). Observe that the increase in BL intensity in the cervix is associated with the growth of cervical epithelium and this is higher in Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) than in Tg(Gli-Luc) mice. **D**, BL image of cervix of Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice dissected at proestrus and treated with 50 μ M cyclopamine (CYC) or vehicle (Vh) for 0, 4 and 8 h. Observe that BL decreased with time in samples treated with CYC. **E**, *In situ* hybridization for *Shh* and *Gli1* in the cervical epithelium of the outer cervix of Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice; images below determinations with the antisense probe are magnifications of the area enclosed in the dotted square. Scale bar, 100 μ m.

interaction between E6/E7 and Hh signaling to promote suprabasal layer growth upon elevated estradiol levels (see Discussion).

3.3. Role of Hh inhibitors on growth during cervical carcinogenesis

It has recently been shown that the presence of CYC inhibits the proliferation of cells derived from cervical tumors in culture [17,18]. Hence, this drug is expected to have a positive effect to reduce growth during cervical carcinogenesis. A group of Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice received 90-days E2 releasing pellets and CYC (Supplementary Fig. 1A). However, long-term treatments or doses higher than 10 mg/kg per day with CYC was not possible due to the high toxicity of this drug to mice of the strain under study (Fvb/N). Survivors after short-term (up to 4 days) treatment with a low dose of CYC (10 mg/kg per day) showed BL intensity reduction in comparison with controls in regenerating ears (4 out of 6 ears) and in a depilated skin area but not in the cervical zone (Supplementary Fig. 1B). At this time no difference in the number of Ki67⁺ cells in the cervical epithelium was detected between CYC-treated and control mice, but hair follicle re-growth was reduced in the depilated skin area of mice treated with CYC (Supplementary Figs. 1B–D). This latter observation is in agreement with the role of Shh in the initiation of hair follicle growth cycle [30], a process that we have shown is forced by E6/E7 in Tg(K6b-E6/E7) [23]. Therefore, it is apparent that the dose of CYC used, although allowed to detect a reduction in Hh activity in the skin, was insufficient to cause any effect in the cervix.

Recently, it has been shown that itraconazole (ITC) has the ability to inhibit Hh signaling by a Smo-dependent mechanism but distinct from the one used by CYC in adults mice [33]. In addition, ITC can reduce the growth of tumour cells *in vivo* in association with a decrease in *Gli1* expression [33]. To determine whether ITC can inhibit the Shh pathway in cervical cells as CYC, its effect on HeLa cell proliferation was determined and compared to that of CYC. As expected, HeLa cell proliferation was inhibited by CYC as previously reported [17,18] (Fig. 6A). ITC produced the same effect from 0.1 μ M (Fig. 6A), a dose below the IC50 for Hh signaling in cultured cells (0.69 μ M for NIH3T3 cells) and to that reported to reduce the proliferation of other cancer cell lines, including HeLa and CaSki cells [34].

In contrast to the significant inhibitory effect of CYC in the experiments described above (Fig. 3D, Supplementary Fig. 1B) and of ITC on Hh activity in embryonic mouse limbs (unpublished data), incubation of cervical fragments with ITC did not show BL intensity reduction (Supplementary Fig. 2). However, because: (a) Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice receiving a twice-daily dose of 75 mg/kg of ITC by oral gavage (Fig. 6B), the dose previously used to inhibit tumour growth *in vivo* [33], survived to 9 days of treatment; (b) this treatment markedly reduced BL intensity in the skin and prevented hair growth after depilation (Fig. 6C), and; (c) although the treatment did not reduce BL intensity in regenerating ears, it did decrease the efficiency of ear hole regeneration, we decided to determine the long-term effect on growth/carcinogenesis of ITC.

Because of the high variability, changes in BL intensity in the cervical area of Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice across

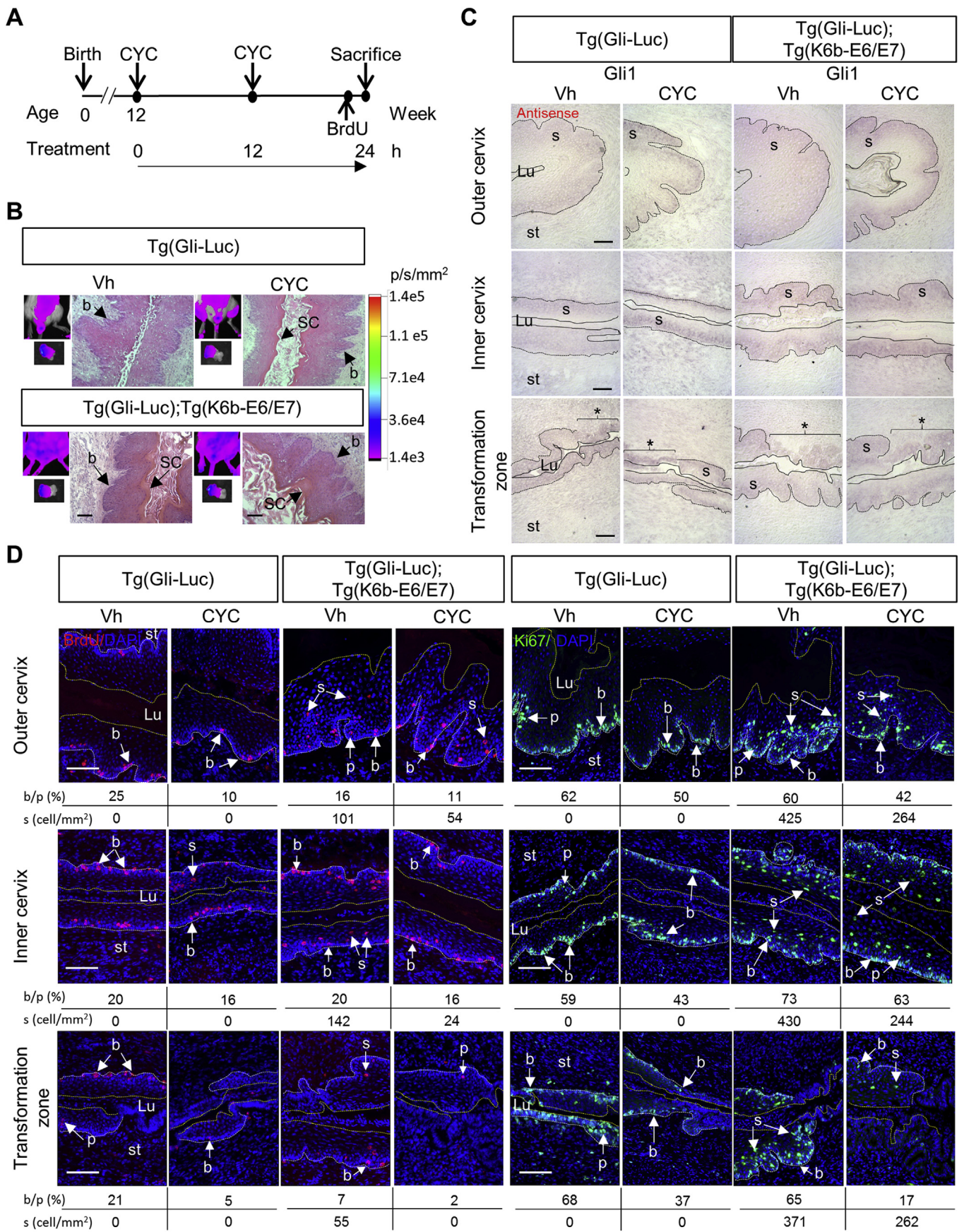
the 50 days of E2 follow by 15 days of ITC treatment (a daily one dose of 75 mg/kg by oral gavage; Fig. 6D) could not be consistently attributed to ITC, (Fig. 6E). Nonetheless, a decrease in the abundance of squamous cells was noted in vaginal smears at the end of treatment, in agreement with the reduction in cervical epithelium growth (Fig. 6F); of note was the increase in leukocytes in these samples, a characteristic of a cervix at metestrus-diestrus. A histological analysis performed at the end of treatment (50 days E2/15 days ITC), revealed that most mice treated with the vehicle, regardless of their genotype, had abundant cornified cells and detaching squamous and/or epithelial cells in the cervical lumen, which was expected as a consequence of the E2-induced overgrowth. In contrast, those animals that received ITC showed a reduced number of cornified cells in the stratum corneum (Fig. 6F). In addition, downgrowths associated with E2-induced dysplasia, particularly evident in mice carrying E6/E7, were markedly decreased in ITC-treated mice (Fig. 6F). Interestingly, despite the number of dividing cells (Ki67⁺) in the cervix of Tg(Gli-Luc) mice, mostly located in the basal/parabasal layer, was not affected by the ITC treatment, ITC significantly decreased the number of Ki67⁺ cells in the suprabasal layer of the cervical epithelium of Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice, which were particularly abundant due to E6/E7 expression [24] (Fig. 7A–C). Nonetheless this evident effect on cell proliferation, BL intensity and expression of components of the Hh pathway (i.e., *Shh*, *Gli1* and *Gli3*) were not affected by ITC treatment for 15 days (Fig. 7D). Therefore, the Shh pathway could contribute to estradiol/E6/E7-induced cervical carcinogenesis, but ITC reduces cervical growth by the contribution of mechanisms that do not appear to affect Hh signaling.

4. Discussion

BL imaging is a powerful tool to follow growth and specific signaling pathways in association with cancer [35]. Here, using a specific Hh signaling reporter transgenic mouse, we showed the participation of Hh signaling in cervical growth and its interaction with two central effectors of cervical carcinogenesis: estradiol and E6/E7 oncogenes (Fig. 7E).

4.1. *Shh* role in the renewal of cervical epithelium

Shh is associated with growth in different contexts [28]. In particular, Shh regulates hair follicle growth from the earliest stage before birth and, postnatally, at the initiation of every growth cycle [30,31]. Furthermore, overexpressing Shh in the skin promotes hair follicle growth [36]. Hence, it is likely that most BL emitted by the skin of Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice derived from regenerating hair follicles. In agreement with this view, the skin of Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice, which contain mostly hair follicles cycling due to their inability to rest at telogen [23], emitted more BL than the skin of Tg(Gli-Luc). In addition, stimulation of hair follicle growth by depilation [23,37] increased BL in the skin of both Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice. However, contrary to expectations, high intensity of skin BL correlated with mice with higher levels of E2 (i.e., those at estrus or those receiving exogenous E2). E2 arrests hair follicle



(caption on next page)

Fig. 4. Reduction of cell proliferation in the cervical epithelium by Hh signaling inhibition. **A**, Experimental design for BL and cell proliferation analysis after treatment of 12-weeks old mice at proestrus with vehicle (Vh) or cyclopamine (CYC) for 24 h. **B**, BL in the female reproductive apparatus (*in vivo*) and in the dissected cervix-uterus (*ex vivo*, at the end of CYC treatment) of indicated transgenic mice; a H&E stained section of the cervix is shown. **C**, *In situ* hybridization for *Gli1* in the cervical epithelium of the outer cervix, the inner cervix and the transformation zone after treatment for 24 h with Vh or CYC; a positive probe hybridization develops as a purple signal. The dotted line delimits the basal layer and the continuous line the lumen limit; the asterisks indicate a cuboidal epithelium found. **D**, Determination of cell proliferation by Immunostaining against incorporated BrdU and Ki67 in the outer cervix, the inner cervix and the transformation zone of Tg (Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice treated with Vh or CYC. Number below each panel are an estimation of the number of positive cells for the indicated marker (the average of 6 fields for the outer cervix, 3 fields for the inner cervix and 2 fields for the transformation zone). Same result was obtained with younger mice (5 weeks old) but number of proliferating cell detected were much higher. Lumen (Lu), stroma (st), basal (b), parabasal (p), suprabasal cells (s), stratum corneum (SC). Scale bar, 100 μ m.

growth when topically applied [37], condition that exposes the skin to high E2 levels. Therefore, it is possible that E2 promotes hair follicle growth when present at moderate high levels, similar to the ones reaching the skin when circulating at estrus or after providing a systemic low dose of exogenous E2. The growth promoting effect in the skin of E2 is also revealed in the regenerating ears [24]. Here, not only regeneration extent increased due to the application of exogenous E2 but also endogenous E2 appears to be required for efficient ear hole closure [24]. Interestingly, BL intensity increased during ear hole regeneration suggesting that E2 could regulate growth by increasing Hh activity.

Similar to hair follicles, the cervical epithelium is periodically

renewed at every estrous cycle. Although much is known about the role of hormones in estrous cycle regulation, little is known about the role of specific growth factors in the regulation of cervical epithelial cell proliferation, differentiation and degeneration. Therefore, the discovery in the present study that Shh participates in the natural renewal of cervical epithelium is particularly pertinent. Hh signaling, as measured by BL intensity in the cervix, correlated very closely with active growth phases (proestrus and estrus) of the estrous cycle and was almost completely absent during metestrus and diestrus. As expected, if BL was related to Hh signaling, cervical BL was markedly reduced by the well-known Hh signaling inhibitor CYC. CYC also reduced cell proliferation in the cervical epithelium at proestrus, suggesting that Shh signaling

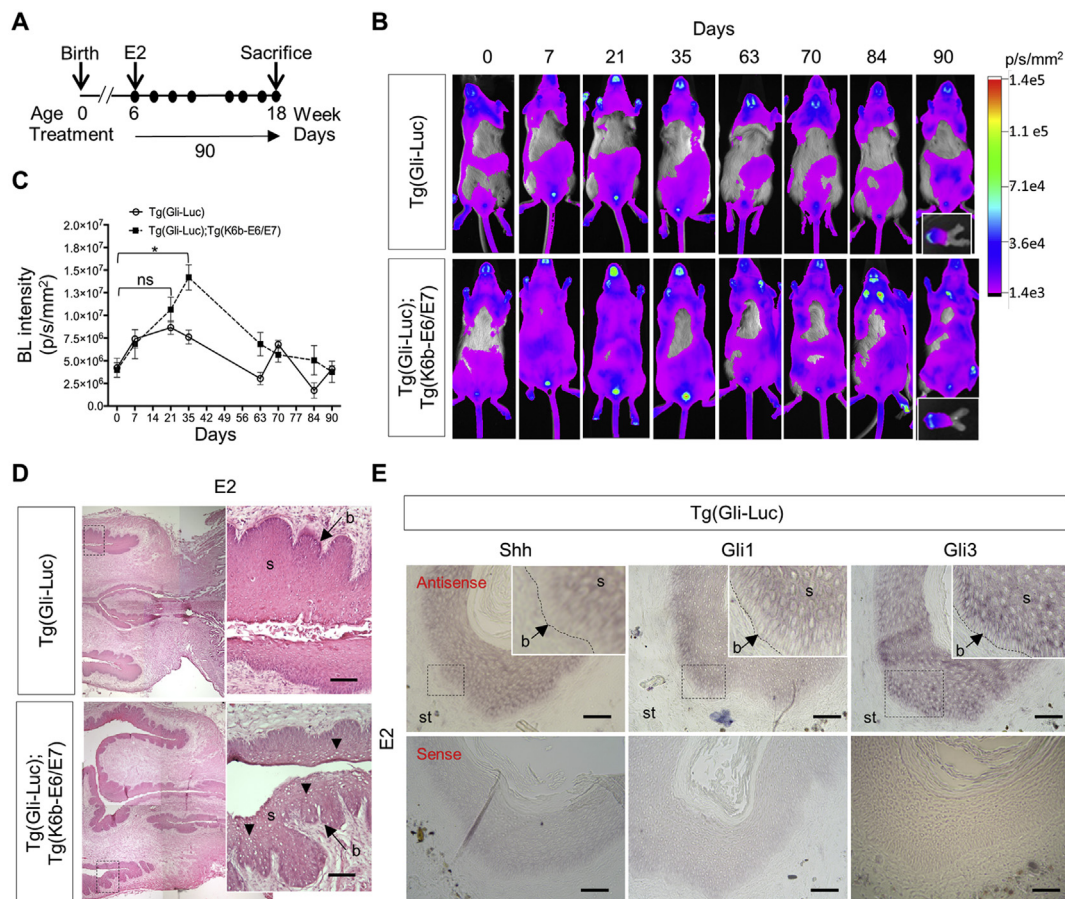


Fig. 5. Activation of the Hh pathway in response to exogenous E2. **A**, Experimental design for BL analysis during treatment with E2 for 90 days. **B**, BL in the female reproductive apparatus (*in vivo*) and in the corresponding dissected cervix-uterus (inset; *ex vivo* at the end of E2 treatment) of Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice during treatment with E2. **C**, Quantification of BL intensity *in vivo* along treatment with E2. Note that the cervical area of Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice reached higher levels of BL intensity than the equivalent region of Tg(Gli-Luc) at day 35 of E2 treatment. Data shown correspond to the mean of BL intensity \pm SEM ($n = 5$ for Tg(Gli-Luc) and $n = 3$ Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7)); * $p = 0.008$, ns, not significant. **D**, H&E stained section of cervix of Tg(Gli-Luc) and of Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice (inset, higher magnification of the area within the dotted square). Arrowheads indicate koilocyte-like structures. **E**, *In situ* hybridization for *Shh*, *Gli1* and *Gli3* in the cervical epithelium of outer cervix after treatment for 50 days with E2 in Tg(Gli-Luc) mice. Upper panels show the positive signal (purple mark) given by the antisense probe (insets are magnifications of the area within the dotted square; the line marks the lower limit of the basal layer), whereas lower panels are negative controls using the sense probe. Stroma (st), basal (b), suprabasal cells (s). Scale bar, 100 μ m.

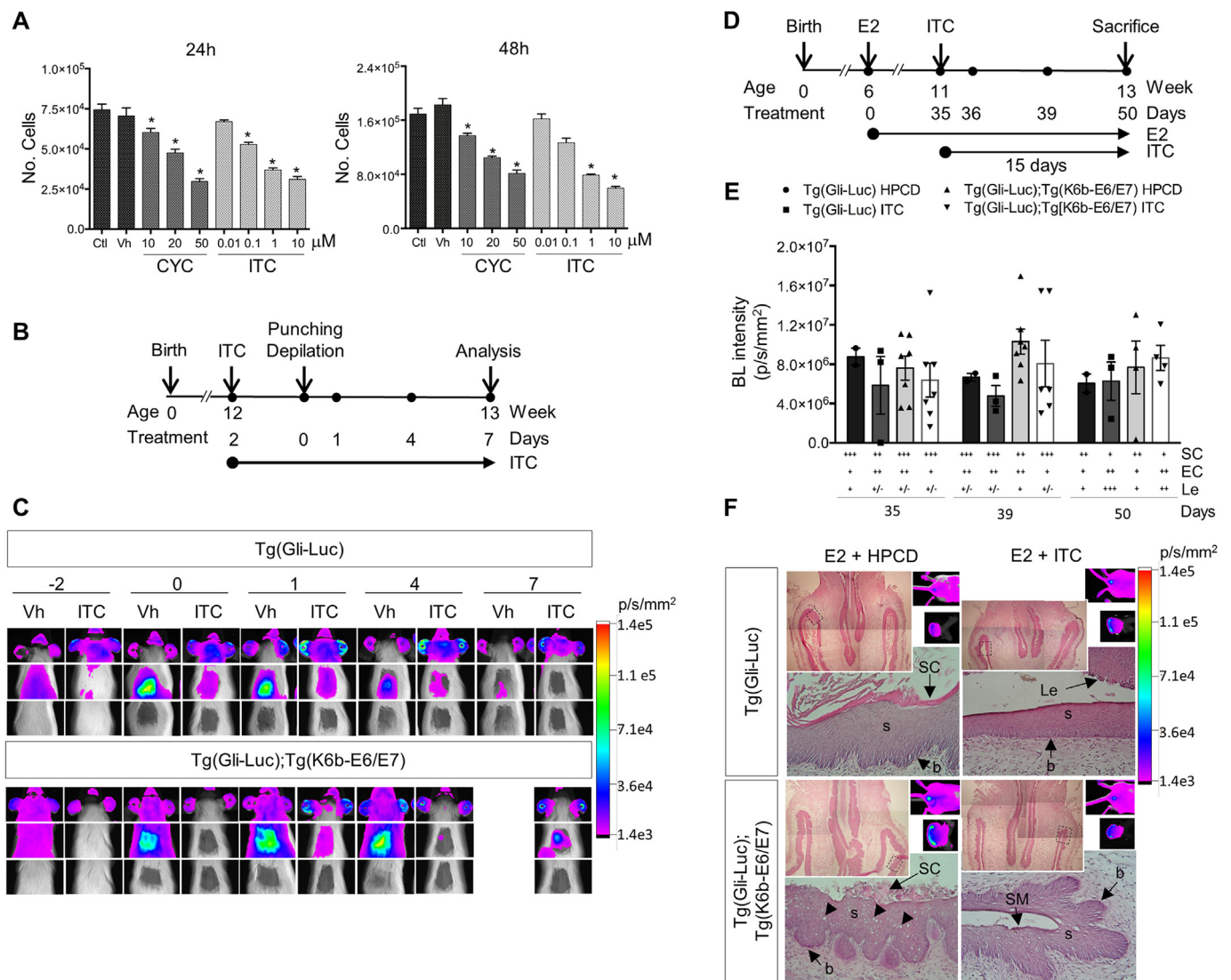


Fig. 6. The effect on growth of inhibitors of the Hh signaling pathway. **A**, Effect of cyclopamine (CYC) and Itraconazole (ITC) on proliferation of HeLa cells during 24 and 48 h of treatment (Ctl, control without any addition; Vh, DMSO). The data shown correspond to the mean ± SEM (triplicate of 3 independent experiments), **p* ≤ 0.004. **B**, ITC treatment protocol for ear and skin BL analysis in Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice. **C**, BL images of Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice at different days of treatment with ITC or with Vh (water). Upper panels show the ITC effect on BL intensity in regenerating ears, whereas middle (BL image) and lower (hair growth) panels shows the ITC effect on hair growth. **D**, ITC treatment protocol for Tg(Gli-Luc) (*n* = 2) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice (*n* = 2) treated with E2 for 50 days. **E**, BL intensity before (35 days of E2 treatment) and after 4 days and 15 days of ITC treatment (39 and 50 days of E2 treatment, respectively). No significant differences were detected in BL intensity at any time evaluated. Qualitative cytological characteristics of vaginal smears of treated mice are shown below graph (-, absent; +/-, scarce; ++, abundant; +++, very abundant). Note that treatment (50 days) with ITC decreased the abundance of squamous cells (SC) and increased the presence of leucocytes (Le) and epithelial cells (EC). Geometric figures in graphs represent independent experimental events (*n*). **F**, Representative images (*n* = 4–5 mice) of cervix of Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice treated with E2 and ITC. Each set of photographs shows: a low magnification of a H&E stained section, a magnification of the region within the dotted square (upper right panel), and *in vivo* and *ex vivo* BL images (lower right panels). Observe the decrease in the thickness and downgrowths of the cervical epithelium in females treated with E2 and ITC. Arrowheads indicate koilocyte-like structures. Stratum mucification (SM), stratum corneum (SC), basal (b), suprabasal cells (s). Scale bar, 100 μm.

regulates cervical epithelium renewal, which is in agreement with the expression pattern of genes encoding essential component of the Hh pathway. It is apparent that Shh controls proliferation of basal cells by an autocrine or paracrine mechanism, which is similar to the function of Shh in hair follicle development [30] and renewal [31]. As an extension of what we have observed in the skin, we are led to speculate that E2 also directly regulates Hh signaling in the growing cervical epithelium, rather than simply functioning as an endocrine promotor of proestrus initiation. This direct mechanism has been observed in a breast cancer cell line responsive to estrogens, in which a decrease and increase in ERα activity correlates with a decrease and increase in Hh signaling, respectively [38]. Conversely, Hh can stimulate the

conversion of cholesterol to E2 through the up-regulation of enzymes of the cholesterol and estrogen biosynthetic pathways [39]. In addition, steroids could be required for Shh-Ptch1 interaction as was recently proposed [40]. Further studies will be required to establish whether this reciprocal crosstalk between Hh and E2 occurs during cervical epithelium renewal.

4.2. Participation of Shh at the initiation of cervical carcinogenesis

E2 and E6/E7 HPV oncogenes are major factors involved in cervical carcinogenesis both in humans and in animal models [4,21,22,24]. A third component that could be critical at the initiation and during the

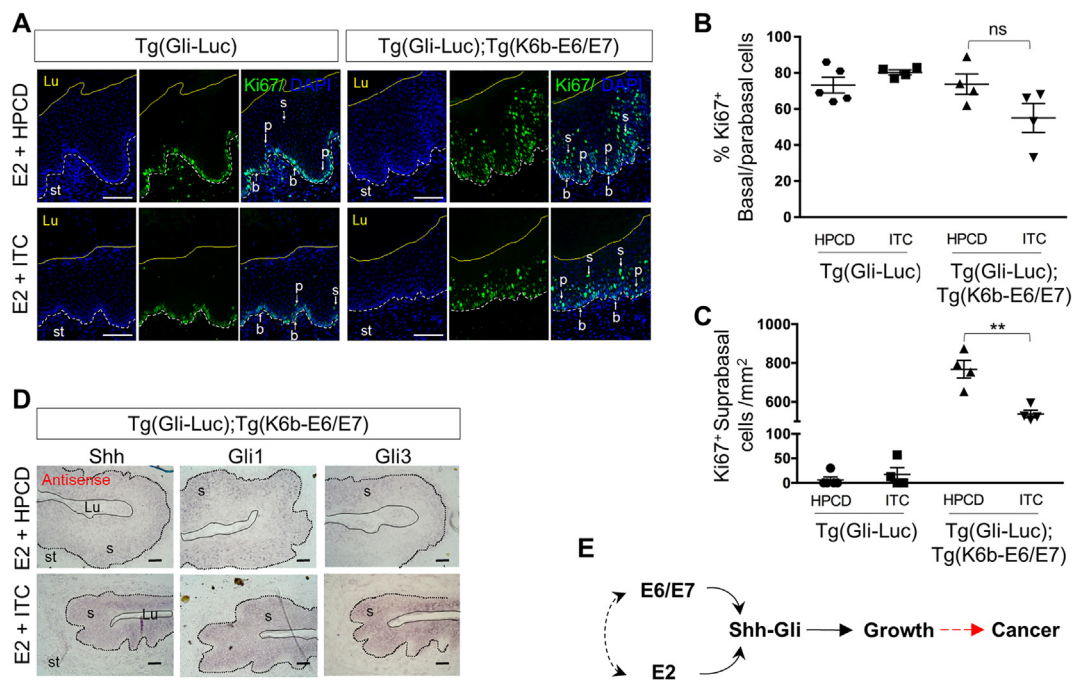


Fig. 7. The effect of ITC in the Shh signaling pathway in the cervical epithelium of females treated with E2. **A**, Immunostaining of proliferating cells (Ki67⁺) in the outer-cervix of Tg(Gli-Luc) and Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice treated with E2 in combination with ITC or 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD). Lu, lumen; St, stroma; b, basal; p, parabasal and; s, suprabasal cells. **B**, Percentage of Ki67⁺ basal/parabasal cells in the outer-cervix epithelium. **C**, Quantification of Ki67⁺ cells (per mm²) in suprabasal layers of the outer-cervix epithelium. The data shown correspond to the mean \pm SEM; geometric figures in graphs represent independent experimental events (n); **p = 0.03 (ns, not significant). Note the evident reduction in suprabasal proliferating cells in the cervical epithelium of Tg(Gli-Luc);Tg(K6b-E6/E7) mice treated with ITC. **D**, *In situ* hybridization for *Shh*, *Gli1* and *Gli3* in the cervical epithelium after treatment for 50 days with E2 and 15 days with ITC. **E**, Model representing the regulation of Shh-Gli signaling by E6/E7 oncogenes and E2 observed in the present study and its implications in growth and cancer initiation. Scale bar 100 μ m.

progression of cervical carcinogenesis is the Hh pathway. Three findings support this possibility: (i) the distribution of Hh pathway components is altered during cervical carcinogenesis [16]; (ii) mutation in genes of the Hh pathway occur during cervical carcinogenesis [19], and; (iii) the Hh pathway controls the proliferation of several cell lines derived from cervical tumors [17,18]. In the present study we investigated the interaction between these three factors *in vivo*.

E6/E7 oncogenes in Tg(K6b-E6/E7) mice are expressed in suprabasal layers, like the pattern of these genes in stratified epithelia carrying human HPV [24,25]. Coincidentally, increased numbers of proliferating cells are located in suprabasal layers in the absence of an increment in basal proliferating cells [24]. Despite this evident phenomenon, Hh activity in the cervix was markedly increased due to the presence of oncogenes. Although an interaction between suprabasal and basal cells cannot be discarded, the expected increase in basal cell proliferation due to the rise in Hh activity was not observed. Therefore, we propose that a direct interaction between E6/E7 and Hh signaling components is occurring within suprabasal cells such that their re-entry to the cell cycle promoted by E6/E7 oncogenes is facilitated by Hh signaling. Accordingly, we show here that CYC reduced the number of proliferating cells in suprabasal layers of the cervical epithelium of Tg(K6b-E6/E7) mice and *Shh* and *Gli1* are expressed in suprabasal layers under carcinogenic conditions. These observations together with evidence showing that *Shh* activates genes encoding cell cycle regulators (e.g., cyclin D, Myc) [41] and prevents p21-induced cell cycle arrest associated with suprabasal cell differentiation [42] support a role of *Shh* in cell cycle regulation. In agreement with a direct interaction, E6 regulates Hh signaling and, in addition, this pathway appears to regulate oncogene expression or mRNA processing in cells derived from cervical tumors [18].

As mentioned above E2 also appears to regulate Hh signaling in the natural renewal of cervical epithelium. This direct effect of E2 has also

been observed in different cancer cell lines [38,43]. Accordingly, BL intensity in the cervical area increased in response to chronic E2 treatment, effect that was significant in mice carrying E6/E7 oncogenes. Unexpectedly, this effect was transient and, as inferred from BL intensity, notably reduced after 35 days of E2 treatment, independent of the presence or absence of E6/E7. The mechanism of this latter effect is not understood, but because *Shh* and *Gli1* were still expressed at the end of E2 treatment, it is apparent that alternate signaling pathways are activated that counteract Hh signaling without preventing the growth promoting effect of E2. In the carcinogenic context (i.e., chronic treatment with E2), increasing Hh signaling could be at least one mechanism by which E6/E7 cooperate with E2 to promote growth (Fig. 7E). *Shh*, as a possible component of the carcinogenic micro-environment that increases in response to E2 in the cervix, can establish a crosstalk with the mechanisms that regulate hypoxia [44] and, in this way, cooperate to promote cervical cancer development.

4.3. Itraconazole as a cervical growth inhibitor

CYC is a known specific inhibitor of Hh signaling albeit, as reported by others [33,45], one to which our mice showed poor survival. The amount of CYC required to inhibit Hh signaling in the cervix is difficult to determine, but definitively is higher than that required to inhibit it in the skin. The novel Hh inhibitor ITC, in contrast, was tolerated by our animals at a systemic dose that has been shown to inhibit growth of tumour cells *in vivo* [33]. Accordingly, the depilation-induced Hh signaling and hair follicle regeneration were reduced by ITC at the same dose. Notably, E6/E7 could not revert this inhibitory effect of ITC, which contrast with their ability to counteract the inhibitory effect of topical E2 on hair follicle growth [23]. In the cervix, Gli activity, as detected by the Gli-Luc transgene, was reduced by ITC only at the beginning of treatment but no difference was detected at the end.

However, ITC reduced the growth of cervical epithelium after chronic E2 treatment, which was particularly evident in mice carrying E6/E7. This effect was characterized by a thinner epithelium with reduced dysplastic outgrowths and number of proliferating suprabasal cells, typical of active E6/E7. Therefore, although ITC was able to inhibit cell proliferation and growth of the cervical epithelium, the mechanism of action might not affect the canonical Hh signaling pathway. This is similar to the observed reduction in hole closure efficiency of ears of mice treated with ITC without an apparent decrease in Hh signaling. Candidate alternative pathways affected by ITC could involve WNT/ β -catenin or AKT [34].

Maintenance of tissue growth involves different processes including regulation of cell proliferation, cell death and angiogenesis. There is no doubt that ITC has the capacity to inhibit Hh signaling, which in cervical cancer cells regulates proliferation [34]. However, since ITC has also antiangiogenic properties [46,47], its effect on cervical tissue growth might involve other affected cell types. In endothelial cells, ITC inhibits mitochondrial metabolism and cholesterol trafficking by direct interaction with the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) and the lysosomal Niemann-Pick Type C 1 (NPC1) protein [48], respectively, which, in turn, inhibits mTOR resulting in reduced cell proliferation. The capacity of ITC to affect growth by interacting with different molecular targets, supports further preclinical and clinical studies to treat cervical carcinogenesis with this low-cost drug. The present work is one step towards this goal.

Additional information

Ethics approval and consent to participate

The mice were maintained and treated (all experiments and protocols approved) in accordance with the regulations of the local Bioethical Committee.

Conflicts of interest

The authors declare no potential conflicts of interest.

Funding

This work was supported by DGAPA/UNAM PAPIIT grants IN213416, IA200915 and IA202317 and by CONACyT (CB239891 and CB131031).

Author's contributions

Study conception and design: L.C., C.G., V.R-L., Data acquisition: V.R-L., M-A.M. V.C., and C.W., assisted with experimental design (ISH and BL, respectively). Data analysis or interpretation of results: V.R-L., C.G., L.C., Original draft preparation: V.R-L., C.G., L.C., Review, editing and approval of manuscript: all authors.

Acknowledgements

We appreciate the donation of the Tg(Gli-Luc) mice by Dr. Tom Curran. We thank Elizabeth Mata, Graciela Cabeza and Sergio González for their technical assistance, and M. Carcaño for her secretarial support. We also appreciate the accessibility of the LNMA-UNAM for the performance of BL-detection protocols. This study is V. R-L.'s requirement to get the Ph.D. degree in 'Posgrado en Ciencias Biológicas', UNAM. V. R-L. is a recipient of a fellowship from CONACyT (359965) and DGAPA/UNAM PAPIIT (IA202317).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.05.024>.

doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.05.024.

References

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: globocan 2012, *Int. J. Cancer* 136 (2015) E359–E386, <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- [2] H. zur Hausen, Papillomavirus infections — a major cause of human cancers, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Canc.* 1288 (1996) F55–F78, [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(96\)00020-0](https://doi.org/10.1016/0304-419X(96)00020-0).
- [3] J. Doorbar, Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer, *Clin. Sci. (Lond.)* 110 (2006) 525–541, <https://doi.org/10.1042/CS20050369>.
- [4] V. Moreno, F.X. Bosch, N. Muñoz, C.J.L.M. Meijer, K.V. Shah, J.M.M. Walboomers, R. Herrero, S. Franceschi, Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study, *Lancet* 359 (2002) 1085–1092, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08150-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08150-3).
- [5] S. Mitrani-Rosenbaum, R. Tsvieli, R. Tur-Kaspa, Oestrogen stimulates differential transcription of human papillomavirus type 16 in SiHa cervical carcinoma cells, *J. Gen. Virol.* 70 (Pt 8) (1989) 2227–2232, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-8-2227>.
- [6] A.A. Wright, B.E. Howitt, A.P. Myers, S.E. Dahlberg, E. Palescandolo, P. Hummelen, L.E. MacConaill, M. Shoni, N. Wagle, R.T. Jones, C.M. Quick, A. Laury, I.T. Katz, W.C. Hahn, U.A. Matulonis, M.S. Hirsch, Oncogenic mutations in cervical cancer, *Cancer* 119 (2013) 3776–3783, <https://doi.org/10.1002/ncr.28288>.
- [7] A.I. Rubin, E.H. Chen, D. Ratner, Basal-cell carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 353 (2005) 2262–2269, <https://doi.org/10.1056/NEJMra044151>.
- [8] S. Hatsell, A.R. Frost, Hedgehog signaling in mammary gland development and breast cancer, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 12 (2007) 163–173, <https://doi.org/10.1007/s10911-007-9048-2>.
- [9] F. Varnat, A. Duquet, M. Malerba, M. Zbinden, C. Mas, P. Gervaz, A. Ruiz i Altaba, Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion, *EMBO Mol. Med.* 1 (2009) 338 LP-351 <http://embomolmed.embopress.org/content/1/6-7/338.abstract>.
- [10] A. Shaw, J. Gipp, W. Bushman, The Sonic Hedgehog pathway stimulates prostate tumor growth by paracrine signaling and recapitulates embryonic gene expression in tumor myofibroblasts, *Oncogene* 28 (2009) 4480–4490, <https://doi.org/10.1038/onc.2009.294>.
- [11] L. Yang, G. Xie, Q. Fan, J. Xie, Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications, *Oncogene* 29 (2010) 469–481, <https://doi.org/10.1038/onc.2009.392>.
- [12] A.E. Oro, K.M. Higgins, Z. Hu, J.M. Bonifas, E.H. Epstein, M.P. Scott, Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog, *Science* 276 (1997) 817–821, <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.276.5313.817>.
- [13] M. Nilsson, Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 97 (2000) 3438–3443, <https://doi.org/10.1073/pnas.050467397>.
- [14] J. Xie, M. Murone, S.M. Luoh, A. Ryan, Q. Gu, C. Zhang, J.M. Bonifas, C.W. Lam, M. Hynes, A. Goddard, A. Rosenthal, E.H. Epstein, F.J. De Sauvage, Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma, *Nature* 391 (1998) 90–92, <https://doi.org/10.1038/34201>.
- [15] M. Aszterbaumb, J. Epstein, O. Anthony, V. Douglas, P.E. Leboit, M.P. Scott, E.H. Epstein, Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice, *Nat. Med.* 5 (1999) 1285–1291, <https://doi.org/10.1038/15242>.
- [16] Y.H. Xuan, H.S. Jung, Y.L. Choi, Y.K. Shin, H.J. Kim, K.H. Kim, W.J. Kim, Y.J. Lee, S.H. Kim, Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions, *Mod. Pathol.* 19 (2006) 1139–1147, <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800600>.
- [17] I. Samarzija, P. Beard, Hedgehog pathway regulators influence cervical cancer cell proliferation, survival and migration, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425 (2012) 64–69, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.051>.
- [18] K. Vishnoi, S. Mahata, A. Tyagi, A. Pandey, G. Verma, M. Jadhli, T. Singh, S.M. Singh, A.C. Bharti, Cross-talk between human papillomavirus oncoproteins and hedgehog signaling synergistically promotes stemness in cervical cancer cells, *Sci. Rep.* 6 (2016) 34377, <https://doi.org/10.1038/srep34377>.
- [19] C. Chakraborty, S. Dutta, N. Mukherjee, S. Samadder, A. Roychowdhury, A. Roy, R.K. Mondal, P. Basu, S. Roychowdhury, C.K. Panda, Inactivation of PTCH1 is associated with the development of cervical carcinoma: clinical and prognostic implication, *Tumor Biol.* 36 (2015) 1143–1154, <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2707-1>.
- [20] D.-J. Cheon, S. Orsulic, Mouse models of cancer, *Annu. Rev. Pathol.* 6 (2011) 95–119, <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.3.121806.154244>.
- [21] J.M. Arbeit, P.M. Howley, D. Hanahan, Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 2930–2935, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.7.2930>.
- [22] T. Brake, P.F. Lambert, Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 2490–2495, <https://doi.org/10.1073/pnas.0409883102>.
- [23] D. Escalante-Alcalde, F. Recillas-Targa, C. Valencia, J. Santa-Olalla, P. Chavez,

- A. Marroquin, X. Gutierrez, P. Gariglio, L. Covarrubias, Expression of E6 and E7 papillomavirus oncogenes in the outer root sheath of hair follicles extends the growth phase and bypasses resting at telogen, *Cell Growth Differ.* 11 (2000) 527–539 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063126>.
- [24] C. García, D. Hernandez-García, C. Valencia, V. Rojo-León, J.-R. Perez-Estrada, M. Werner, L. Covarrubias, E6/E7 oncogenes in epithelial suprabasal layers and estradiol promote cervical growth and ear regeneration, *Oncogenesis* 6 (2017) e374 <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.73>.
- [25] J. Doorbar, Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer, *Clin. Sci. (Lond.)* 110 (2006) 525–541, <https://doi.org/10.1042/CS20050369>.
- [26] C. Valencia, J. Bonilla-Delgado, K. Oktaba, R. Ocadiz-Delgado, P. Gariglio, L. Covarrubias, Human papillomavirus E6/E7 oncogenes promote mouse ear regeneration by increasing the rate of wound re-epithelization and epidermal growth, *J. Invest. Dermatol.* 128 (2008) 2894–2903, <https://doi.org/10.1038/jid.2008.156>.
- [27] H. Kimura, J.M. Ng, T. Curran, Transient inhibition of the Hedgehog pathway in young mice causes permanent defects in bone structure, *Cancer Cell* 13 (2008) 249–260, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.01.027>.
- [28] R. Petrova, A.L. Joyner, Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair, *Development* 141 (2014) 3445–3457, <https://doi.org/10.1242/dev.083691>.
- [29] P.A. Beachy, S.S. Karhadkar, D.M. Berman, Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis, *Nature* 432 (2004) 324–331, <https://doi.org/10.1038/nature03100>.
- [30] T. Ouspenskaia, I. Matos, A.F. Mertz, V.F. Fiore, E. Fuchs, WNT-SHH antagonism specifies and expands stem cells prior to niche formation, *Cell* 164 (2016) 156–169, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.058>.
- [31] Y.-C. Hsu, L. Li, E. Fuchs, Transit-amplifying cells orchestrate stem cell activity and tissue regeneration, *Cell* 157 (2014) 935–949, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.057>.
- [32] B. St-Jacques, H.R. Dassule, I. Karavanova, V.A. Botchkarev, J. Li, P.S. Danielian, J.A. McMahon, P.M. Lewis, R. Paus, A.P. McMahon, Sonic hedgehog signaling is essential for hair development, *Curr. Biol.* (2004), [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)70443-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70443-9).
- [33] J. Kim, J.Y. Tang, R. Gong, J. Kim, J.J. Lee, K.V. Clemons, C.R. Chong, K.S. Chang, M. Fereshteh, D. Gardner, T. Reya, J.O. Liu, E.H. Epstein, D.A. Stevens, P.A. Beachy, Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth, *Cancer Cell* 17 (2010) 388–399, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.02.027>.
- [34] T. Ueda, H. Tsubamoto, K. Inoue, K. Sakata, H. Shibahara, T. Sonoda, Itraconazole modulates hedgehog, WNT/ β -catenin, as well as akt signalling, and inhibits proliferation of cervical cancer cells, *Anticancer Res.* 37 (2017) 3521–3526 <http://ar.iiarjournals.org/content/37/7/3521.abstract>.
- [35] B. Kocher, D. Piwnica-Worms, Illuminating cancer systems with genetically engineered mouse models and coupled luciferase reporters in vivo, *Cancer Discov.* 3 (2013) 616–629, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0503>.
- [36] N. Sato, P.L. Leopold, R.G. Crystal, Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of Sonic hedgehog, *J. Clin. Investig.* 104 (1999) 855–864, <https://doi.org/10.1172/JCI7691>.
- [37] H.S. Oh, R.C. Smart, An estrogen receptor pathway regulates the telogen-anagen hair follicle transition and influences epidermal cell proliferation, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 93 (1996) 12525–12530, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12525>.
- [38] K. Koga, M. Nakamura, H. Nakashima, T. Akiyoshi, M. Kubo, N. Sato, S. Kuroki, M. Nomura, M. Tanaka, M. Katano, Novel link between estrogen receptor alpha and hedgehog pathway in breast cancer, *Anticancer Res.* 28 (2008) 731–740 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18507014>.
- [39] C. Tang, Y. Pan, H. Luo, W. Xiong, H. Zhu, H. Ruan, J. Wang, C. Zou, L. Tang, T. Iguchi, F. Long, X. Wu, Hedgehog signaling stimulates the conversion of cholesterol to steroids, *Cell. Signal.* 27 (2015) 487–497, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.01.004>.
- [40] X. Gong, H. Qian, P. Cao, X. Zhao, Q. Zhou, J. Lei, N. Yan, Structural basis for the recognition of sonic hedgehog by human Patched 1, *Science* 80 (2018), <https://doi.org/10.1126/science.aas8935>.
- [41] J. Briscoe, P.P. Thérond, The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14 (2013) 416–429, <https://doi.org/10.1038/nrm3598>.
- [42] H. Fan, P.A. Khavari, Sonic hedgehog opposes epithelial cell cycle arrest, *J. Cell Biol.* 147 (1999) 71–76 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508856>.
- [43] Y. Sun, Y. Wang, C. Fan, P. Gao, X. Wang, G. Wei, J. Wei, Estrogen promotes stemness and invasiveness of ER-positive breast cancer cells through Gli1 activation, *Mol. Cancer* 13 (2014) 137, <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-137>.
- [44] M.F. Bijlsma, A.P. Groot, J.P. Oduro, R.J. Franken, S.H.H.F. Schoenmakers, M.P. Peppelenbosch, C.A. Spek, Hypoxia induces a hedgehog response mediated by HIF-1 α , *J. Cell Mol. Med.* (2009), <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00491.x>.
- [45] R.J. Lipinski, P.R. Hutson, P.W. Hannam, R.J. Nydza, I.M. Washington, R.W. Moore, G.G. Giridaukas, R.E. Peterson, W. Bushman, Dose- and route-dependent teratogenicity, toxicity, and pharmacokinetic profiles of the hedgehog signaling antagonist cyclopamine in the mouse, *Toxicol. Sci.* 104 (2008) 189–197, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn076>.
- [46] C.R. Chong, J. Xu, J. Lu, S. Bhat, D.J. Sullivan, J.O. Liu, Inhibition of angiogenesis by the antifungal drug itraconazole, *ACS Chem. Biol.* 2 (2007) 263–270, <https://doi.org/10.1021/cb600362d>.
- [47] S.A. Head, W. Shi, L. Zhao, K. Gorskov, K. Pasunooti, Y. Chen, Z. Deng, R. Li, J.S. Shim, W. Tan, T. Hartung, J. Zhang, Y. Zhao, M. Colombini, J.O. Liu, Antifungal drug itraconazole targets VDAC1 to modulate the AMPK/mTOR signaling axis in endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 112 (2015) E7276 LP-E7285 <http://www.pnas.org/content/112/52/E7276.abstract>.
- [48] S.A. Head, W.Q. Shi, E.J. Yang, B.A. Nacev, S.Y. Hong, K.K. Pasunooti, R.J. Li, J.S. Shim, J.O. Liu, Simultaneous targeting of NPC1 and VDAC1 by itraconazole leads to synergistic inhibition of mTOR signaling and angiogenesis, *ACS Chem. Biol.* 12 (2017) 174–182, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00849>.

ORIGINAL ARTICLE

E6/E7 oncogenes in epithelial suprabasal layers and estradiol promote cervical growth and ear regeneration

C García, D Hernández-García, C Valencia, V Rojo-León, J-R Pérez-Estrada, M Werner and L Covarrubias

Tissue growth is a common characteristic of carcinogenesis and regeneration. Here we show that suprabasal expression of human papillomavirus (HPV)16 E6/E7 oncogenes in Tg(K6b-E6/E7) mice, similar to that observed in HPV-infected human tissue, and estradiol increased cervical epithelium growth and ear-hole closure efficiency. Oncogenes in combination with estradiol had a significant contribution to the proliferation of suprabasal cells of cervical epithelium that correlated with an increased expression of keratin genes. Remarkably, long-term treatments with estradiol resulted in evident cellular and tissue abnormalities indicative of a precancerous phenotype. Regenerating ear epithelium of transgenic mice also showed increased suprabasal cell proliferation and expression of keratin genes. Unexpectedly, we observed higher ear regeneration efficiency in adult than in young female mice, which was further increased by E6/E7 oncogenes. Supporting a role of estradiol in this phenomenon, ovariectomy and treatment with an estrogen receptor inhibitor caused a significant reduction in regenerative capacity. Our data suggest that Tg(K6b-E6/E7) mice are unique to mimic the initial stages of HPV-mediated cervical carcinogenesis, and ear regeneration could facilitate the elucidation of mechanisms involved.

Oncogenesis (2017) 6, 374; doi:10.1038/oncsis.2017.73; published online 28 August 2017

INTRODUCTION

Growth is a condition that predisposes tissues to initiate a carcinogenic process.^{1,2} Accordingly, tissues that carry out continuous renewal during adult life have high incidence of tumors,² and their specific stem cells are the main candidates for cancer initiation. In addition, injury, another condition associated with cancer development,³ forces tissues to recruit cells from other niches to fulfill the high demand of cells needed for healing.⁴ The self-renewal capacity of stem cells places them as the major target for the accumulation of mutations that trigger a carcinogenic process.² However, recent studies have shown the emergence of tumors from transient proliferating progenitors or from postmitotic differentiated cells.^{5,6}

A hallmark of tissue renewal, repair and regeneration is the activation of cell proliferation, differentiation and growth.⁷ Thus, it is not surprising that proto-oncogenes and tumor suppressors participate in these processes by promoting cell proliferation and differentiation, respectively.⁸ In this context, it is interesting the evolution of the *Ink4a* locus encoding in mammals for *Arf* and *p16Ink4a*, key regulators of the p53 and pRb1 pathways; this locus in lower vertebrates, including amphibians, encodes exclusively for *p16Ink4a*, possibly causing a marked difference in cell cycle regulation.^{8,9} Furthermore, in addition to the increase in cell proliferation, reducing the activity of these tumor suppressors facilitates cell reprogramming/dedifferentiation,^{10,11} a process common to regeneration and cancer.

Cervical–uterine cancer is the cause of many deaths worldwide. Cervical–uterine endometrium is a continuously renewing tissue during the whole reproductive life. The estrous cycle is a hormonally regulated process whose phases can be distinguished by the marked growth changes occurring in the reproductive tract.¹² Slow dividing stem cells have been identified in this tissue,

which proliferate upon estrogen receptor (ER) stimulation.^{13,14} Infection by human papillomavirus (HPV) is a major etiological factor associated with cervical–uterine cancer, though cancer incidence in infected women is low.¹⁵ Although, it is predicted that stem cells are the target of HPV oncogenes during cancer initiation, viral replication and expression of major HPV oncogenes (e.g., E6, E7) occur in the suprabasal layers of the growing epithelium to ensure a productive infection.¹⁶ Accordingly, *LacZ* expression driven by the Long-Control-Region of HPV was located in suprabasal layers.¹⁷ Actually, it has been proposed that E6/E7 could promote cell cycle re-entry in upper epithelial layers.^{16,18}

Mouse models of cervical–uterine cancer have been developed previously by directing the expression of HPV oncogenes to the basal layer of epithelia (K14+ cells).^{19,20} Here, we determined the effect of E6/E7 HPV oncogenes on cervical epithelium renewal when expressed in suprabasal layers (K6b+ cells) during the growing phases. In addition, taking advantage of the increased regenerative capacity of these mice,²¹ we compared the growth effect on ear regeneration and cervix renewal in response to oncogenes and/or estradiol.

RESULTS

Growth induction without changing the estrous cycle-associated pattern in Tg(K6b-E6/E7) cervix

Keratin gene expression in the cervix of wild-type (WT) mice significantly changed during the estrous cycle (Figure 1a). Except for *K5*, the genes encoding all keratins tested increased during the diestrus–proestrus transition. *K14* and *K10* expression increased about fivefold, whereas *K6b* and *K16* expression increased between 10- and 20-fold; the lowest mRNA levels were reached at metestrus. Similar pattern was observed in Tg(K6b-E6/E7) mice

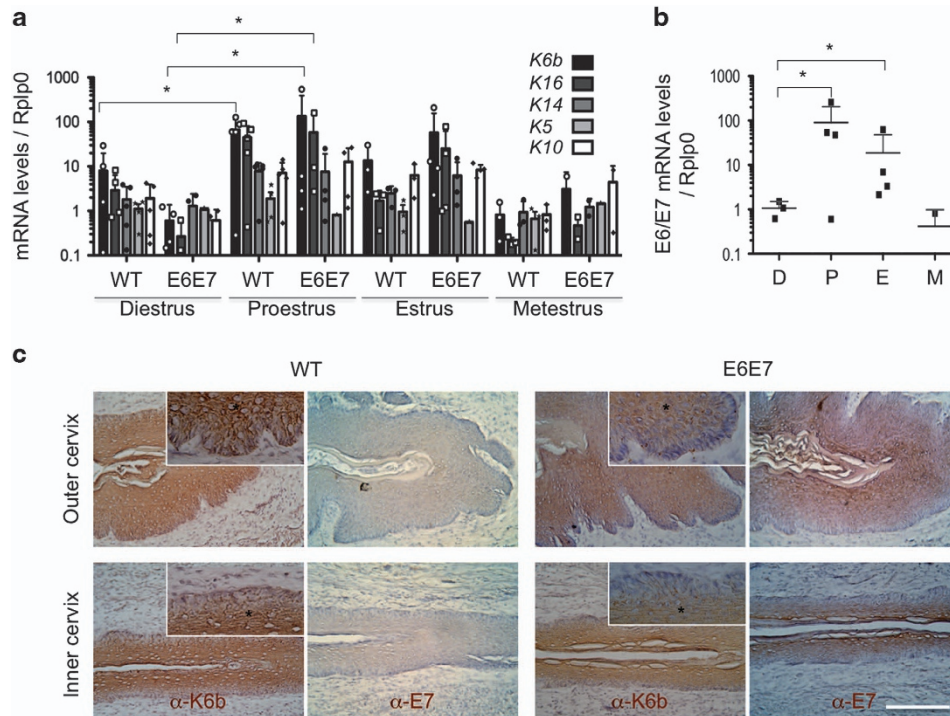


Figure 1. Keratin genes and *E6/E7* expression in the cervix during the estrous cycle. Cervix samples were taken from 9-week-old wild type (WT; $n = 4$) or Tg(K6b-E6/E7) (*E6/E7*; $n = 4$) mice at specific estrous cycle phases (D, diestrus; E, estrus; P, proestrus and M: metestrus) and keratin genes (a) or *E6/E7* (b) mRNA levels determined by RT-qPCR (see Materials and Methods). Observe the highest expression levels during the growing phases (P and E). Immunolocalization of K6b and E7 in the epithelium of outer and inner cervix at proestrus showed the presence of these proteins in suprabasal layers (* mark), with a more abundant E7 presence in the most suprabasal layers (c). * $P < 0.05$; scale bar, 100 μm .

but upregulation was much higher than that determined in WT mice reaching up to 100-fold for *K6b* and *K16* and 5- to 10-fold for *K14* and *K10* (Figure 1a); in the cervix of Tg(K6b-E6/E7) mice, mRNA levels at metestrus were higher than those in equivalent samples of WT mice. As expected, *E6/E7* expression correlated with the pattern observed for *K6b* (Figure 1b).

The *E6/E7* expression pattern along the estrous cycle and distribution of E7 protein in the cervix at proestrus was similar to that of *K6b* and restricted to suprabasal layers in either outer or inner cervix (Figure 1c); oncogene proteins were more abundant in the most suprabasal layers. Distribution of *K5*, the *K14* companion keratin usually located in the basal layer, was not altered by oncogenes in the outer cervix, where it showed an evident basal-suprabasal gradient (Figure 2a). However, this gradient was only detected in the thicker than WT transformation zone and inner cervix epithelia of Tg(K6b-E6/E7) mice (Figure 2a).

In agreement with the expected effect and expression pattern of HPV oncogenes in the cervix of Tg(K6b-E6/E7) mice, the increase in proliferating cells was restricted to suprabasal layers (Figures 2a and b; see also Figures 3e and f). Actually no Ki67+ cell was found in the suprabasal layer of WT mice and the few BrdU+ cells found (1 for every 10 basal) could be recently differentiated cells. These observations correlated with a higher growth of cervical epithelium of Tg(K6b-E6/E7) in comparison with that of WT mice, evident during proestrus, where epithelial protrusions into the stroma were noted (Figure 2c). Despite these abnormalities, the epithelium of cervix established the major characteristics of each estrous phase (Figure 2c).

Increased number of cycles and longer proestrus-estrus phase in Tg(K6b-E6/E7) mice

In order to obtain indications of estrous cycle progression, we compared Tg(K6b-E6/E7) and WT mice regarding the number of cycles, as determined by the frequency of sequential proestrus-

estrus phases, and the time staying at the growth phases, as determined by the frequency of proestrus and estrus, both within a defined number of days (19 days). Notably, the frequency of cycles (Figure 3a) and, apparently, the incidence of growth phases (Figures 3b-d) were higher in Tg(K6b-E6/E7) than in WT mice. Nonetheless, the initiation of each cycle was still dependent on estradiol as cycling was blocked in both Tg(K6b-E6/E7) and WT mice treated with raloxifene (Figures 3c and d).

Cytological analysis after a short-term β -estradiol (E2) treatment showed a tendency of mice to stay in the growth phases of the estrous cycle (Figures 3c and d). This result suggests a possible effect of estradiol on epithelium during the growth phases. To test this hypothesis, mice were treated with raloxifene once proestrus had initiated and, then, cell proliferation evaluated by the presence of Ki67 (Figure 3e). Despite the higher number of suprabasal proliferating cells due to oncogene expression, reduction in the number Ki67+ cells was observed in both WT and Tg(K6b-E6/E7) mice with a similar effect in basal/parabasal and suprabasal cells (Figure 3f); no indication of cell death was detected in the presence of raloxifene (Supplementary Figure S1). These results confirm the critical role of estradiol in epithelial growth and support the cooperation with oncogenes during the proestrus-estrus phase.

In contrast with short-term E2 treatments, proliferating cells in suprabasal layers of WT cervical epithelia were detected (about 28% of total Ki67+ cells) after long-term treatments (> 1.5 months) and, as expected, many more of those were detected (about 44% of total Ki67+ cells) in the cervical epithelia of Tg(K6b-E6/E7) mice (Figure 4a). Accordingly, long-term E2 treatments thickened the epithelia of the transformation zone of WT cervix ($n = 4$), though a more pronounced growth in this region occurred in Tg(K6b-E6/E7) mice ($n = 3$; Figure 4b). Interestingly, as a possible indication of a precancerous condition, koilocyte-like cells (i.e., squamous cells with a clear cytoplasm²²) were found in the grown cervical

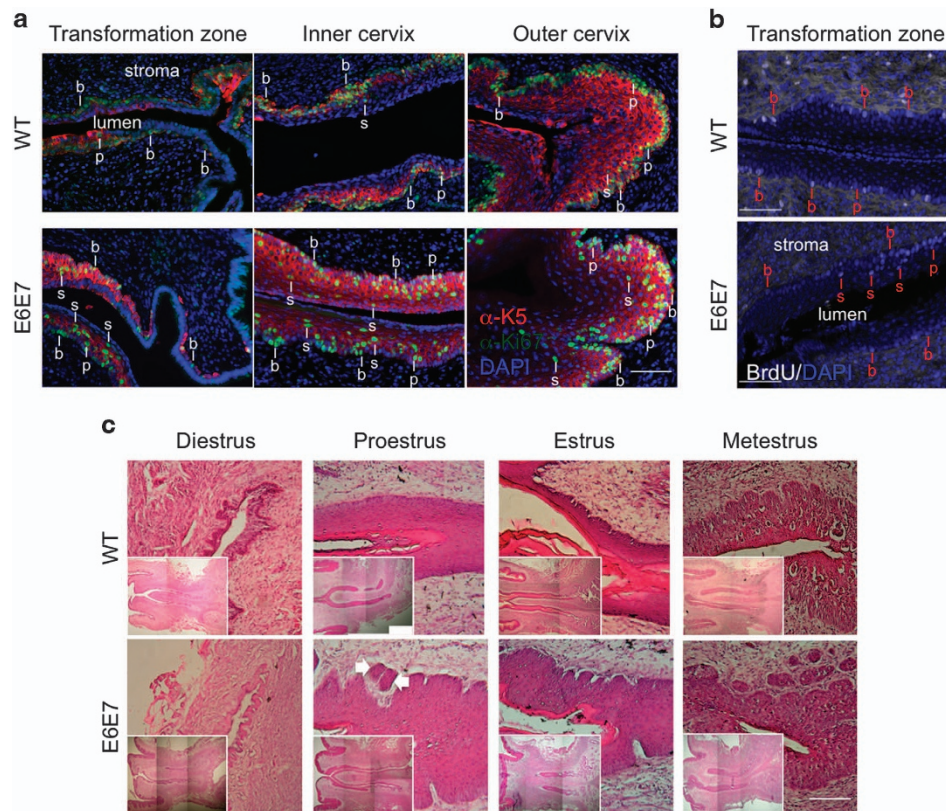


Figure 2. Growth pattern of WT and Tg(K6b-E6/E7) cervix during the estrous cycle. Ki67 determination (a) and 2-h BrdU incorporation (b) during the growth phases in transformation zone, and inner and outer cervix showed that oncogenes added suprabasal proliferating cells to those regularly present in the basal layer. Note the basal to suprabasal K5 distribution gradient, particularly evident in the outer cervix. Some basal (b), parabasal (p) and suprabasal (s) cells are indicated. (c) A histological comparison between WT and Tg(K6b-E6/E7) cervix of 9-week-old mice showed similar tissue appearance at each estrous cycle phase but a thicker epithelium during the growing phases in the latter than in the former, in some cases evidenced as epithelia invading the stroma (arrows). Scale bar, 100 μ m.

epithelia of both WT and Tg(K6b-E6/E7) mice, with an evident increased number in the latter (Figure 4c). In addition, a high frequency of bi-nucleated cells was found in vaginal smears of E2-treated Tg(K6b-E6/E7) mice (Figure 4d). In WT mice, even after 9 months of E2 treatment, hyperplasia was the major phenotype of cervical epithelium. In contrast, in Tg(K6b-E6/E7) mice, hyperplasia and an irregular epithelium resembling a dysplastic tissue were frequently observed even in the absence of the hormone, as it was described above, but E2 treatment notoriously exacerbated the hyperplastic phenotype showing deep dysplastic protrusions and epithelial islands that commonly characterize the carcinoma *in situ* (Figures 4c and e).

Ear regeneration in adult mice is influenced by estradiol and E6/E7 oncogenes

Induction of *K6b*, *K16*, *K14*, *K5* and *K10* expression during epidermal growth in regenerating as compared with intact ears was similar to that observed in the cervix during the diestrus–proestrus transition (Figure 5a). Induction was higher for *K6b* and *K16* (around 20- to 50-fold) than for *K14*, *K5* and *K10* (2- to 5-fold). As in the cervix, E6/E7 oncogenes promote growth of epidermal tissue in regenerating ears,²¹ but induction of keratin gene expression remained in the same range as in regenerating WT ears (Figure 5a) and that of E6/E7 expression followed similar pattern (fourfold; Figure 5b). Distribution pattern of E7 protein during regeneration was found very similar to that of K6b (Figure 5c). Around the wound borders (dashed line), restriction to suprabasal layers was evident; similar pattern was observed in the growing area where the basal layer was well defined (square bracket) and

E7 was better detected in the most upper layers (Figure 5c); in disorganized epidermis, commonly seen in the regenerating area, this restriction was not evident. K5, in contrast with the basal restriction in intact epidermis, was widely distributed in the growing area with a basal to suprabasal gradient pattern in both WT and Tg(K6b-E6/E7) mice (Figure 5c).

Regeneration is expected to be more efficient in young animals; accordingly, most ear regeneration studies have been done with mice younger than 2 months. Therefore, it was unexpected to find that the hole in ears of female WT adult mice regenerated more efficiently than in those of young female animals (Figure 5d). A more pronounced effect was noted in ears of Tg(K6b-E6/E7) adult mice (Figure 4d). Regeneration efficiency was related with faster hole closure (Figure 5e). As previously demonstrated for young animals,²¹ closing of ear holes involved fast re-epithelization and, as expected for regeneration rather than a wound repair with scar, formation of new cartilage and hair follicles was observed (Figure 5f).

Hole closure efficiency decreased in juvenile ovariectomized mice (Figure 6a); this effect on regeneration was evident in adult WT mice but not noted in Tg(K6b-E6/E7) mice (Figure 6b). Supporting estradiol as the relevant molecule removed by ovariectomy, the exogenous addition of E2 fully recovered the regeneration capacity of WT ovariectomized mice (Figure 6b). In addition, raloxifene produced the same effect as ovariectomy especially noted in Tg(K6b-E6/E7) (Figure 6b). Addition of E2 to WT or Tg(K6b-E6/E7) mice had no effect on ear hole closure (Figure 6c). However, exogenous E2 in males did produce a detectable improvement in regeneration (Supplementary Figure S2). This observation is relevant considering that an

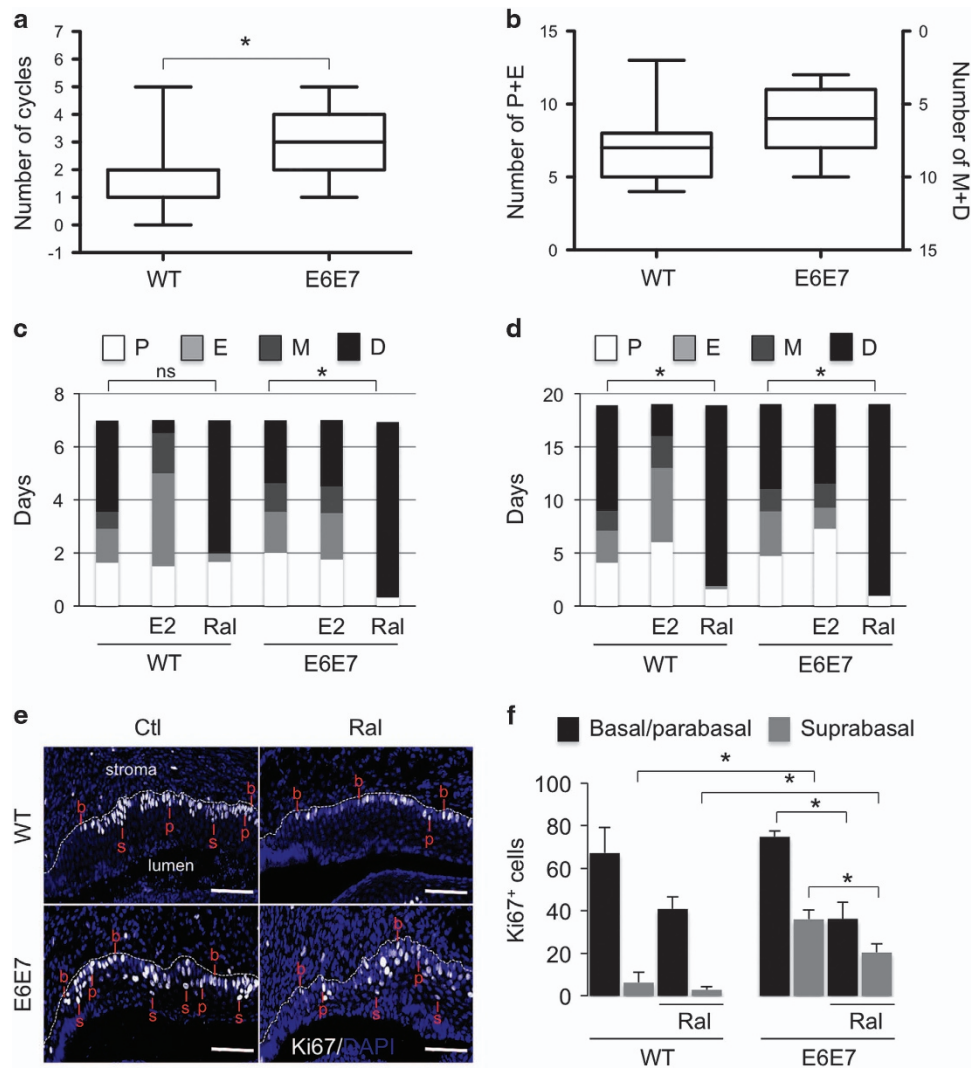


Figure 3. Cooperation between E6/E7 and estradiol during the estrous cycle. Frequency of P–E sequence (a), and in M or D (b) determined along 19 days. Note that the frequency of P–E sequence, and apparently the number of days in the growing phases, was higher in Tg(K6b-E6/E7) ($n = 11$) than in WT ($n = 11$) mice. WT ($n = 2$) but not Tg(K6b-E6/E7) ($n = 4$) mice continuously treated with E2 were more days at proestrus–estrus (P–E) during a 7 (c) or 19 days (d) period, whereas raloxifene (Ral) blocked the estrous cycle of both WT ($n = 3$) and Tg(K6b-E6/E7) ($n = 3$) mice. (e, f) Ki67 immunopositive (Ki67+) cells determined in the cervix of mice at proestrus treated for 14 h with Ral (or PBS); note that the increase in the number of Ki67+ cells in Tg(K6b-E6/E7) mice was restricted to suprabasal layers and the reduction in these cells was observed in both WT ($n = 3$) and Tg(K6b-E6/E7) ($n = 4$) mice. Some basal (b), parabasal (p) and suprabasal (s) cells are indicated. * $P < 0.05$; NS, not significant. Scale bars, 100 μm .

inhibitory factor appeared present in males, as demonstrated by the increased ear regeneration capacity of castrated males (Supplementary Figure S2).

Estradiol promotes cell proliferation during ear regeneration

In young mice, E6/E7 improved regeneration capacity in association with increased cell proliferation.²¹ Accordingly, the number of proliferating cells increased in both WT and Tg(K6b-E6/E7) adult mice in the regenerating area but the latter, likely due to oncogene expression, showed a higher proportion of proliferating cells in suprabasal than in basal layers (Figure 6d). In agreement with a poor effect of exogenous E2 on regeneration, the change in the number of proliferating cells (Ki67+ cells) in regenerating ears of mice treated with E2 was not significant (Figure 6e). However, treatment with raloxifene caused a reduction in the number of proliferating cells in both WT and Tg(K6b-E6/E7) mice (Figure 6e). BrdU incorporation supports this conclusion and, in addition, the apparent accumulation of BrdU+ in the wound borders suggests that estradiol may also

contribute to the important migration at early stages of regeneration (Supplementary Figure S3).²¹ Therefore, E6/E7 cooperate with estradiol to promote proliferation, and possibly also migration, of epidermal cells during regeneration. The number of proliferating cells determined by estradiol and/or oncogenes is the likely factor responsible of epidermal growth, since direct measurement of epidermal tissue in the growing area followed the same pattern (Figure 6f). The contribution of proliferating hair follicle cells to the regenerating area was observed in few instances (Supplementary Figure S4), but could not be considered a major source of cells for ear regeneration.

DISCUSSION

Contribution of suprabasal epithelial cells to carcinogenesis and regeneration
In stratified epithelia, the proliferative compartment is restricted to the basal layer. Here, cycling stem cells and progenitors live

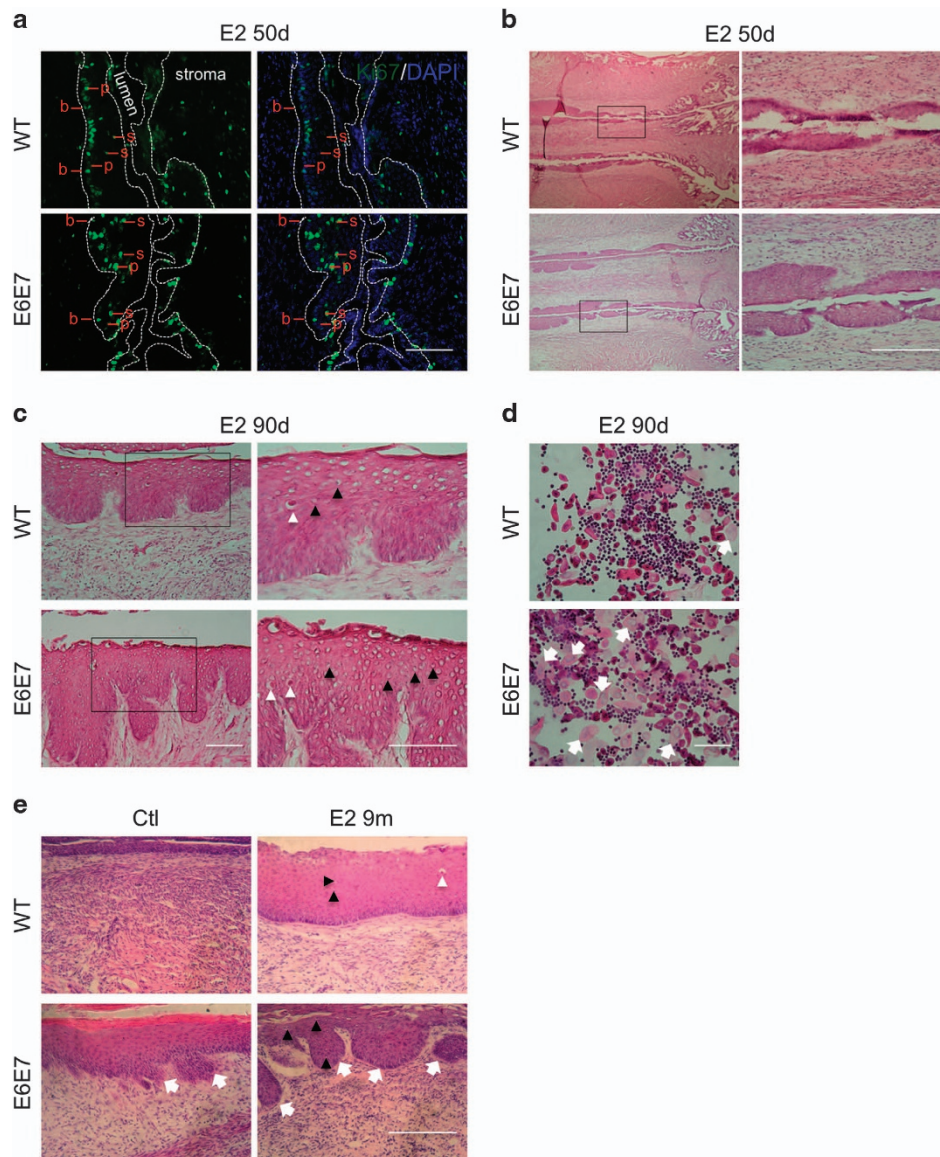


Figure 4. Cooperation between E6/E7 and estradiol in the induction of an epithelial cancerous phenotype. **(a)** Ki67 immunopositive (Ki67+) cells determined in transformation zone of WT ($n = 3$) and Tg(K6b-E6/E7) ($n = 4$) mice treated with E2 for 50 days; note the emergence of Ki67 cells in suprabasal layers of cervical epithelium of WT mice and an increased number of these in Tg(K6b-E6/E7) mice (50 days). Some basal (b), parabasal (p) and suprabasal (s) cells are indicated. **(b)** Thickening of the cervical epithelium of mice treated with E2 for 50 days. Note the epithelial hyperplasia in the transformation zone, particularly evident in that of Tg(K6b-E6/E7) mice. **(c)** Koilocyte-like cells detected in mice treated with E2 and in a larger number in samples from Tg(K6b-E6/E7) mice; sometimes, leukocyte infiltration was detected in these samples (white arrowheads). **(d)** Bi-nucleated cells (arrows) in Tg(K6b-E6/E7) vaginal smears. **(e)** Hyperplasia was the main outcome in cervix of WT animals at 9 months of E2 treatment, whereas in Tg(K6b-E6/E7) signs of dysplasia and carcinoma *in situ* were present (arrows). Scale bars, 100 μ m.

together and derive into the non-dividing terminally differentiated cells of suprabasal layers which mature up to producing the cornified tissue.^{13,23} Commonly, hyperplasia and dysplasia in skin and cervix are characterized by a high number of proliferating cells located in suprabasal layers.^{19,20,24} The recurrent hypothesis to this phenotype is the invasion of basal proliferating cells into upper layers. However, recent data^{5,6} open alternative hypotheses that need to be considered to trace the origin of cancer-initiating cells.

It has been proposed that a productive cycle of HPV in the cervix starts with the infection of basal layer cells.¹⁶ Upon differentiation, suprabasal cells start to express the early viral genes.¹⁶ Therefore, the primary cells for E6/E7 action are

suprabasal cells which, in response, re-enter into the cell cycle. Tg(K6b-E6/E7) mice reproduced this pattern in the cervix, and accordingly, cell proliferation was promoted in suprabasal layers. This function is active in the growing phases of the estrous cycle when *K6b* was detected to be highly expressed. Since suprabasal E6/E7 expression did not affect the number of proliferating basal cells, few of these cells contributed to the suprabasal proliferation pattern observed. Therefore, suprabasal cells are relevant candidates to carry the role of cancer-initiating cells in the cervix infected with HPV. In contrast, although Tg(K14-E6/E7) mice can reproduce many aspects of cervical-uterine cancer when chronically treated with E2,^{19,20} the compelled premise for the search of cancer-initiating cells in these mice is that they are stem/

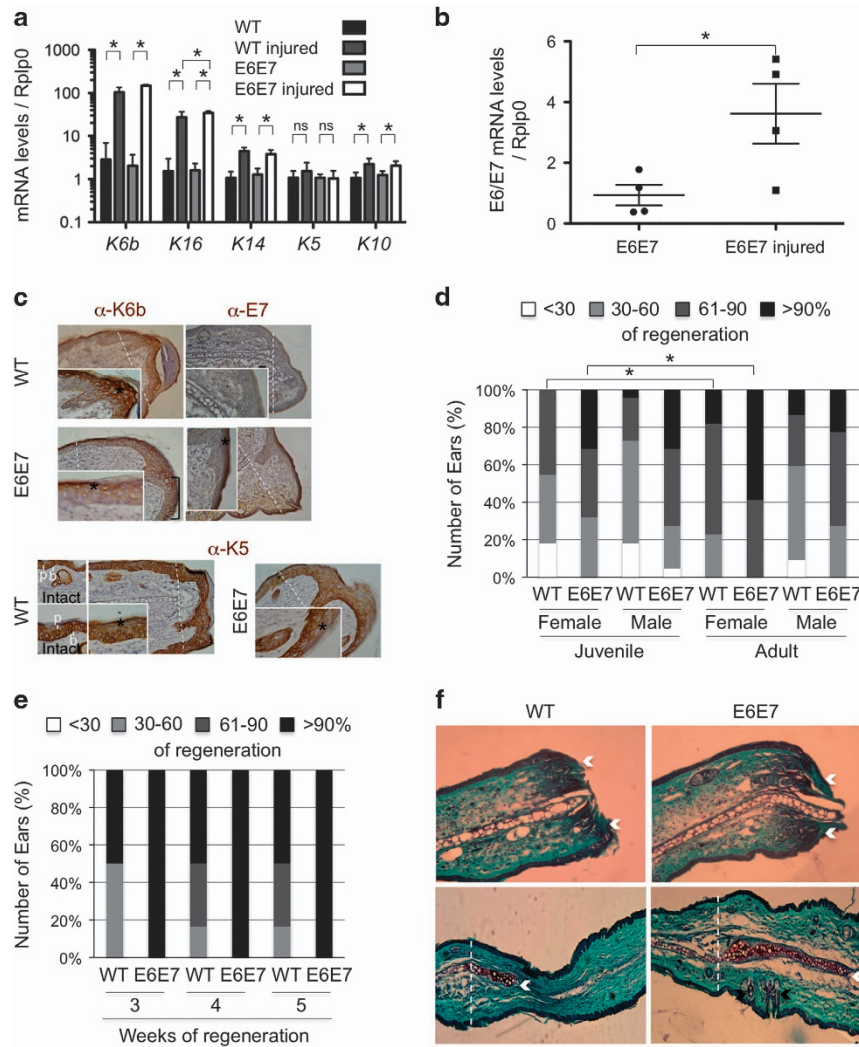


Figure 5. Keratin genes and *E6/E7* expression during ear regeneration in adult mice. Keratins (a) and *E6/E7* (b) mRNA levels were determined in samples of 3-month-old mice from intact ears or from those perforated 7 days earlier (WT, $n = 7$; *E6E7*, $n = 5$); mRNA levels were higher in samples from perforated than from intact ears. (c) Immunolocalization of K6b and E7 in the epidermis of regenerating ears showed these proteins in suprabasal layers around the wound borders (* mark), but K6b was also in the basal area of the growing epidermis and K5 more restricted to basal layers in the intact tissue. (d) Regeneration efficiency of holes in ears of juvenile (6-weeks-old) and adult (3-months-old) (WT, $n = 22$; *E6E7*, $n = 22$); ear regeneration was more efficient in adult than in juvenile female mice, and even better in *Tg(K6b-E6/E7)* mice, whereas no difference due to age was detected in males. (e) Evaluation of hole closure at 3, 4 and 5 weeks after perforation ($n = 6$) indicated that higher efficiency was related to a faster regeneration process. (f) Sections of ears of WT and *Tg(K6b-E6/E7)* mice 24 h (upper panel) or 3 months after perforation (lower panel) stained with fast-green and safranin to visualize the re-epithelization process (white arrows indicate the border of the epithelial tongue covering the wound), the emergence of new cartilage (white arrows) and the formation of new hair follicles (black arrows); the dashed line indicates the site of injury. Note that epidermis of intact ears is very thin, normally composed of few suprabasal layers. NS, not significant; b, basal; p, parabasal cells. * $P < 0.05$; scale bar, 100 μ m.

progenitor cells of the basal layer. Therefore, these mice unlikely model the initiation of cervical carcinogenesis in humans infected with HPV as, possibly, *Tg(K6b-E6/E7)* mice do.

It is interesting that, in contrast with *Tg(K14-E6/E7)* mice,²⁵ the interfollicular epidermis of *Tg(K6b-E6/E7)* mice is not affected and skin alterations are restricted to the hair follicle renewal cycle.²⁶ This is expected because *K6b* is expressed in the companion layer of the inner root sheath of hair follicles and regulated during the renewal cycle. In contrast, upon ear punch injury, a marked increase in *K6b* and *K16* expression was observed that correlates with the increased oncogene expression that, in the ear regenerating epidermal area with well-organized basal layer correlated with the restricted presence of *K6b* in suprabasal layers. This is similar to the growing cervical epithelium (Figure 1c) and the stimulated growing epidermis without injury.^{27,28} The disorganized epidermis commonly seen in the growing area of

regenerating ears is possibly due to the high contribution of migratory cells from the wound borders and a delay in the reconstruction of the basal layer at early regeneration stages.²¹ In agreement with our observations, the epidermis of *Tg(K10-E6/E7)* mice, with expected constitutive limited oncogene expression in suprabasal layers, showed hyperplasia/hyperkeratosis and dividing cells in suprabasal layers under untreated conditions but, in contrast, a marked number of dividing cells were also increased in basal layers.^{29,30} This latter effect might be a long-term consequence of the constant re-entering into the cell cycle of suprabasal cells (see below), since neither hyperplasia in the interfollicular epidermis under untreated conditions nor increased basal cell proliferation were observed in *Tg(K6b-E6/E7)* mice.

An interesting observation was the large area of coincidence of *K5* and *K6b* expression and the location of most dividing cells in the growing epithelial tissue. In particular, we found that the zone

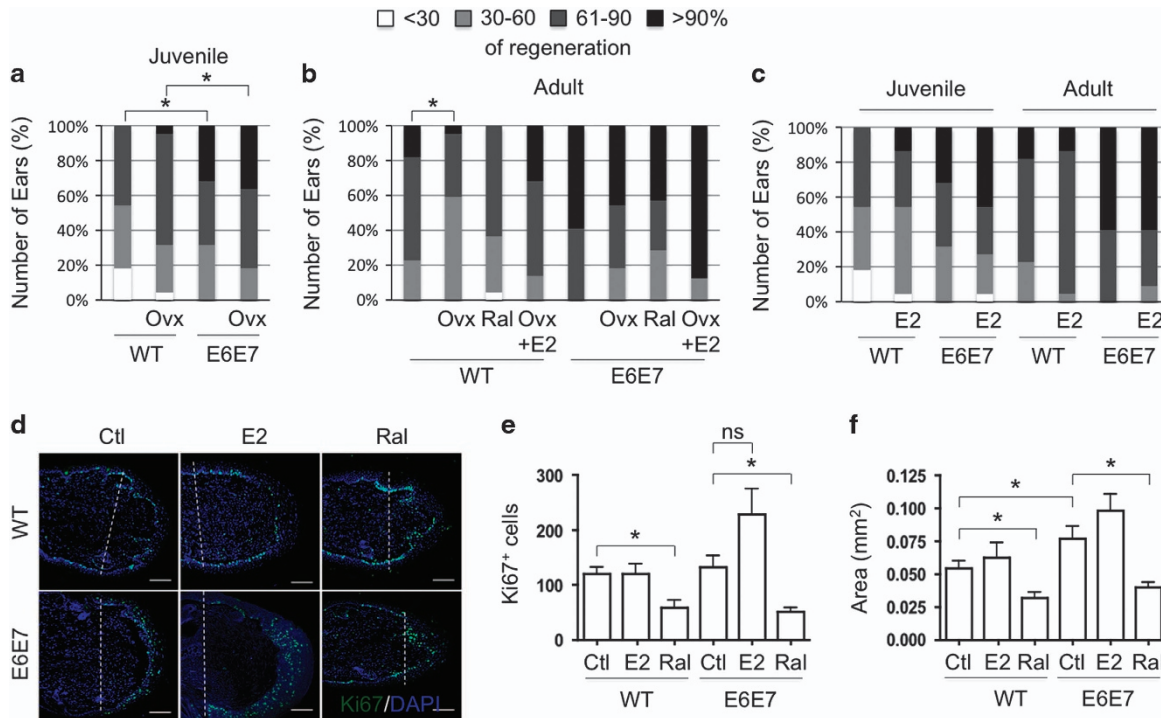


Figure 6. Cooperation between E6/E7 oncogenes and estradiol in ear regeneration. Ear regeneration in 6-week-old (juvenile; **a**) and 3-month-old (adult; **b**) WT and Tg(K6b-E6/E7) mice after ovariectomy (Ovx; $n = 44$) or treatment with raloxifene (Ral; $n = 22$); some ovariectomized mice were also treated with E2 (Ovx+E2; $n = 22$). Note that the reduction in estradiol levels (Ovx, Ral) decreased regeneration efficiency, whereas E2 addition recovered it. (**c**) Exogenous E2 had no effect in juvenile ($n = 22$) or adult ($n = 22$) female mice. (**d, e**) The distribution and number of Ki67+ cells were determined 10 days after punching in regenerating ears of juvenile WT and Tg(K6b-E6/E7) mice that were treated with raloxifene (Ral; $n = 3$) or with PBS (Ctl; $n = 3$). A marked reduction in Ki67+ cells was observed in samples from mice treated with raloxifene; in the case of Tg(K6b-E6/E7) mice, the reduction was mostly restricted to suprabasal cells. (**f**) The total growing area of epidermis was delimited and measured from the initial injury site (dashed line); note that the growth pattern after treatment with E2 or raloxifene is similar to that of proliferating cells in the epidermis. NS, not significant; * $P < 0.05$.

of coincidence of *K6b* and *K5* expression in the cervical epithelial tissue correlates with the area where dividing cells in suprabasal layers were present. Accordingly, extension of *K5* expression to upper layers has also been observed in organotypic raft cultures transfected with HPV.³¹ Therefore, *K6b*+/*K5*+ cells in the cervix might identify those susceptible for oncogene-induced cell cycle re-entry. Although we detected the highest amount of E7 in upper suprabasal layers, it has been reported that high levels of p21/p27 make differentiated cells refractory to E7 mitogenic effects.³²

In Tg(K6b-E6/E7) mice, longer duration of the growing phases is the likely cause of the thicker cervical epithelium during proestrus–estrus phase. This is similar to the effect of E6/E7 on hair follicles, which also show higher cycling frequency and a longer growing phase (anagen) than those of WT mice.²⁶ We interpreted this phenomenon as oncogenes preventing from the entry of stem/progenitor cells of the bulge into the G0 cell cycle phase, expected for resting hair follicles (telogen). An alternative interpretation according to the present study is that E6/E7 drives the re-entry into the cell cycle of postmitotic *K6b*+ cells causing hair follicle growth from these cells instead of the regular stem cells that receive the resting signals.

Estradiol as a growth-promoting factor

Estradiol is an endocrine factor required for the initiation of growth of the cervical–uterine tract, such that lack of ER α in pituitary is sufficient to interrupt estrous cycling and the cervical tissue remains at diestrus.^{33,34} However, in agreement with the participation of additional factors in estrous cycle regulation, continuous administration of E2 at the dose used here did not prevent from the action of factors ending the growth phase (e.g.,

progesterone¹²) and cycling continued. Proestrus initiation in Tg(K6b-E6/E7) mice was completely dependent on estradiol signaling and the end of the growth phase occurred as in WT mice. This is likely due to the transient *E6/E7* expression during the estrous cycle. Exogenous E2 did not increase the frequency of estrous cycles but endogenous estradiol was required to exit from diestrus in both WT and Tg(K6b-E6/E7) mice. Therefore, the reversible interruption of carcinogenesis by raloxifene recently reported³⁵ could be due to the induced estrous cycle pause at diestrus, stage at which *E6/E7* are expressed at low levels and, likely, the HPV lifecycle is halted in human patients.

An additional possible role of estradiol in the regulation of estrous cycle is the growth promoting activity during proestrus.^{36,37} Accordingly, estradiol extended the time WT cervical tissue was at the proestrus–estrus phase. In addition, we observed that after proestrus initiation, ER inhibition caused a marked reduction in basal proliferating cells of the cervix. This same effect was noted in basal and suprabasal cells of the cervix of Tg(K6b-E6/E7) mice, revealing the cooperative effect of oncogenes and estradiol. This cooperation was confirmed by the cancerous phenotype generated in Tg(K6b-E6/E7) mice treated with E2, showed even under continuous cycling. Interestingly, similar growth effects were noted in regenerating ears of both WT and Tg(K6b-E6/E7) mice, though only a mild effect was noted in regeneration efficiency. However, estradiol does not seem to be a limiting factor in this growth promoting activity in female mice, since increasing estradiol levels did not produce a marked effect on regeneration efficiency or the number of proliferating cells. ER α is the best candidate to carry out this activity since mediates estradiol mitogenic activities *in vitro*³⁸ and is expressed in the lower layers of cervix^{14,37} and epidermis epithelia.³⁹ However, an

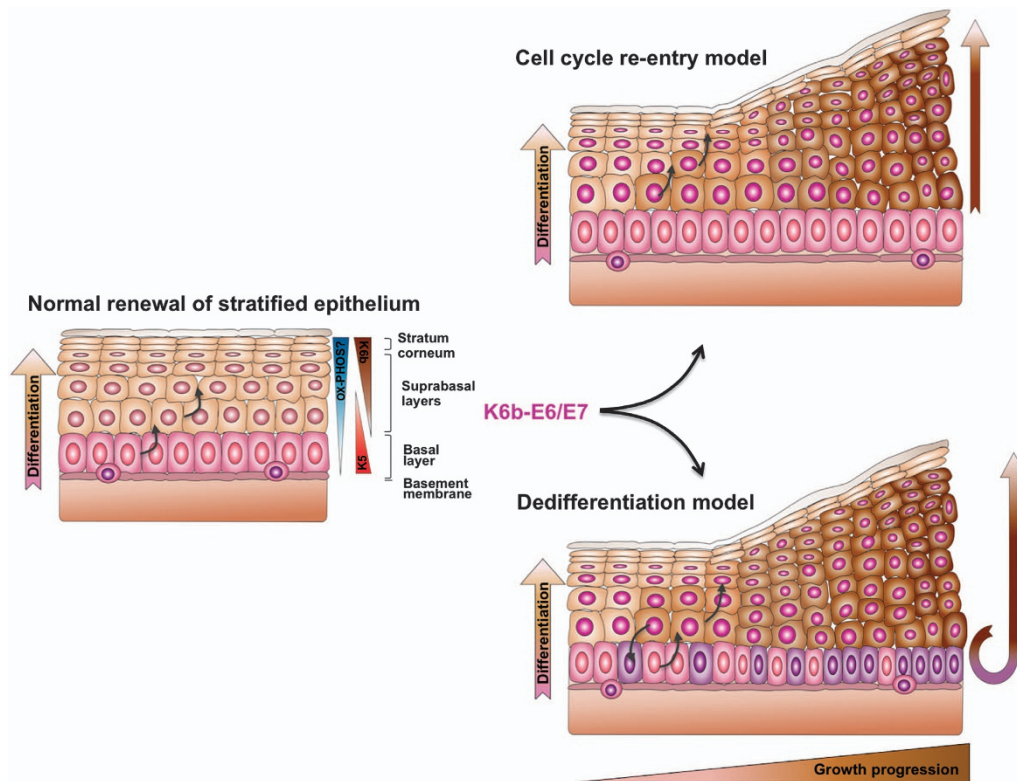


Figure 7. Models of suprabasal E6/E7 promoting growth effect on cervical epithelium. During normal growth (proestrus–estrus phase), the cervical stratified epithelium derives from basal stem cells that proliferate and give rise to the postmitotic cells of suprabasal layers that finally derive into the stratum corneum. In association with this process, the genes encoding K5 and K6b form opposite basal–suprabasal expression gradients, and oxidative phosphorylation could increase. As it appears to occur in HPV-infected human cervical tissue, E6/E7 oncogenes in suprabasal cells promote cell cycle re-entry directly causing increased cell proliferation and tissue growth (cell cycle re-entry model). Alternatively, possibly resulting from the re-entry into the cell cycle, suprabasal cells dedifferentiate into basal-like stem cells; growth in this case result from the increased number of basal cells (dedifferentiation model). The data presented support the first model since we were unable to detect any significant increase in basal proliferating cells due to suprabasal oncogene expression.

indirect effect mediated by estradiol signaling in the cervical stroma has been suggested based in the expression of *ERα*^{14,37} and its genetic inactivation⁴⁰ in this tissue. A definitive conclusion in this regard awaits further investigation, since the *ERα* gene inactivation strategy used to support this possibility did not discard that the gene was also deleted in endocrine organs (e.g., pituitary), consequently blocking the estrous cycle and the carcinogenic process as referred above.

Mechanisms of regeneration in carcinogenesis

Postmitotic cells can contribute to tissue repair by dedifferentiation into stem cells.⁴¹ Our data support that the increased growth induced by HPV oncogenes at the initial stages of carcinogenesis is mostly due to the cell cycle re-entry of suprabasal cells without requiring dedifferentiation into basal-like cells (Figure 7) similar to what has been observed in regenerating tissues.^{42–44} Nonetheless, the re-entry into the cell cycle of postmitotic cells could be essential for dedifferentiation at later stages of carcinogenesis. Actually, this phenomenon might explain the increase in basal dividing cells in the epidermis of Tg(K10-E6/E7) mice as referred above. We propose that the long-term cooperation between E6/E7 and estradiol in cervical–uterine cancer development could result from the cumulative increase in new proliferating cells contributing to epithelial growth and carcinogenesis (Figure 7). In this regard, it was interesting to find an increased number of koilocyte-like and bi-nucleated cells in the chronically growing cervical epithelium of E2-treated Tg(K6b-E6/E7) mice, as occurs at the early stages of carcinogenesis in the HPV-infected human tissue.²²

Cancer and regeneration are closely related processes. The present work supports this relationship showing that two well-known promoters of cancer, estradiol and HPV oncogenes, also promote regeneration. Furthermore, it is interesting the parallel estradiol-E6/E7 cooperation for growth observed between cervix and skin. Accordingly, as in the cervix, *ERα* has been implicated in skin carcinogenesis.⁴⁵ Since ear regeneration is a simple experimental model, the data presented encourage further studies in regenerating ears of Tg(K6b-E6/E7) mice to understand the early stages in cervical carcinogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Animal handling and treatments

The genetic background of Tg(K6b-E6/E7)-M8 transgenic mice (always hemizygous for the transgene) was that of CD1 outbred or Fvb/N inbred strains. These and the corresponding WT mice were maintained and treated in accordance with the regulations of the local Bioethical Committee. Genotype was determined by E7-specific PCR, as previously reported.²⁶ Bilateral ovariectomy was performed at the moment of ear perforation, whereas castration in males was performed 2 weeks before ear punching. Pellets embedded with 0.05 mg β-estradiol (E2) 17-acetate (90-day release; NE-271; Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA) were implanted in the dorsal-anterior area of mice at the day of ear perforation for long-term ear regeneration experiments; whereas, pellets embedded with 0.25 mg E2 17-acetate (90-day release; NE-271) were implanted for estrous cycle determination (19 days) or for cancer experiments (up to 3 pellets for 9 months). For short-term regeneration studies, E2 (0.7 μg/100 μl dissolved in corn oil) or the vehicle were injected subcutaneously every day up to for 14 days; hormone was not injected on the day of ear perforation or of BrdU injection. For ER inhibition, female

mice were intraperitoneally injected with raloxifene (Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA; 10 mg/ml in phosphate-buffered saline (PBS)); for regeneration experiments, 1.5 mg of raloxifene was delivered daily for 14 days or 5 days/week for a month and, during the estrous cycle, the same amount was delivered daily through 19 days or once at proestrus. BrdU (50 µg/g weight of mice) was intraperitoneally injected (1 dose) and mice killed 2 h later.

Hole closure assay

Excisional 2 mm punches were made with a metal ear puncher on the center of ears of 6 weeks and 3-month-old mice. The hole diameter was measured 4 weeks after punching under a dissecting microscope. Formation of new hair follicles and cartilage was determined by visualizing them in samples stained with fast green and safranin after 24 h or 3 months of ear perforation.²¹ Ear regeneration efficiency was classified into four categories (gray scale in bar graphs) based on the following estimation:

Percent of regeneration (P_r) = $100 - (100 \cdot \text{non-regenerated area} / \text{area excised})$

$$P_r = 100 - \left(100 \frac{\pi r_1^2}{\pi r_2^2} \right)$$

where r_1 = measured diameter (mm)/2, and $r_2 = 2 \text{ mm}/2 = 1 \text{ mm}$. Therefore,

$$P_r = 100 - (100r_1^2)$$

Analysis of estrous cycle

Mice for analysis of estrous cycles were CD1-based 9 weeks old, whereas those for promotion of cervical-uterine carcinomas were Fvb/N-based 1-month-old. The estrous cycle phase was determined by analysis of cell composition and morphology of vaginal smears, taken every day at the same hour, stained with hematoxylin–eosin. The number of estrous cycles was determined by counting the number of proestrus–estrus (P–E) sequence along 19 days.⁴⁶ Samples for molecular analysis were obtained along the estrus cycle or at specific estrus phase in the case of E2-treated mice.

Histochemistry and immunodetection procedures

Ears and/or cervix were dissected from mice treated as described above, fixed in 4% paraformaldehyde and kept in 30% sucrose at 4 °C until sectioning. Frozen sections (10 µm) were used for all determinations. Ki67 and incorporated BrdU were the antigens used to determine the number of proliferating cells in at least six sections per sample initially subjected to a permeabilizing solution (1% Triton X-100, 3% H₂O₂ in TBS) at room temperature for 15 min, then incubated with 1 N HCl for 20–30 min and neutralized with 0.1 M boric acid pH 8.5; for BrdU detection, we additionally incubated with 0.001% trypsin. All tissue sections were subjected to heat-induced epitope retrieval with ImmunoDNA Retriever Citrate (Bio SB Inc, Santa Barbara, CA, USA) at 60 °C for 30 min and treated with 0.3% H₂O₂ in methanol for 30 min. Tissues for keratin 5 (K5) and 6b (K6b) and E7 oncogene detection were permeabilized at this stage with 0.1% Triton X-100 in PBS for 30 min. After washing with PBS, samples were treated for 30–60 min with a blocking solution (10% mouse serum in PBS for K5, K6b and E7, and 10% donkey serum, 0.1% Triton X-100 in TBS for Ki67 and BrdU). Slides were then incubated in a humid chamber for 30–60 min at 25 °C and overnight at 4 °C with the specific antibodies (Supplementary Table S1), washed twice with PBS and incubated with the corresponding secondary antibody (Supplementary Table S1) for 2 h. Regardless of the secondary antibody used for histochemical determinations, after washing with PBS, tissue sections were incubated with the ABC Elite (Avidin/Biotin) System (1:200 dilution; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at 25 °C for 30 min. The horseradish peroxidase activity was developed using H₂O₂ and 3,3-diaminobenzidine. Dying cells were detected with *In Situ* Cell Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany). Finally, tissue sections were counterstained with DAPI or hematoxylin, mounted with ProLon Gold (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and photographed using an invert microscope (confocal LSM 510, Apotome Axio Observer Z1, Zeiss, Jena, Germany; confocal FV1000 or BX51, Olympus, Tokyo, Japan). To count Ki67+ and BrdU+ cells, a section of tissue was taken and positive nuclei counted along a defined linear extension (at least 400 µm) of epithelium.

Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) procedure

RNA was obtained from cervix and ears of WT or Tg(K6b-E/6E7) mice using the Hybrid-R kit (GeneAll, Seoul, South Korea). For estrous cycle analysis, 9-week-old CD1 mice were selected at each estrous cycle phase and the whole cervix dissected. For ear regeneration, 3–4 perforations were done in one ear of 3-month-old CD1 female mice and, 7 days later, both injured and non-injured ears were collected. First-strand cDNA was synthesized using HyperScript Reverse Transcriptase (GeneAll, Seoul, South Korea) and random primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The real-time quantitative PCR was performed using KAPA SYBR FAST mix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) in the presence of specific primers (Supplementary Table S2) and the Rotor-Gene Q (Qiagen, Wilmington, MA, USA). Gene expression was evaluated using a $\Delta\Delta C_t$ method. The housekeeping gene *Rplp0* was used to normalize gene expression levels.

Statistic analysis

Animals were sorted only by genotype or treatment, and although exclusion or inclusion of an animal was not predetermined, some mice of the Tg(K6b-E/6E7) died during the experimental treatment (the majority died before 2 months of age²⁶); it is important to mention, however, that the cause of death was never associated with the presence of tumors. Specific blinding or randomization method was not applied. The size of each experimental group was limited according with reproducibility and extent of difference; generally, small groups (3–4 independent individuals) were only considered for determination with an evident qualitative difference between groups. Fisher's exact test was used for the analysis of ear regeneration data; since there is a low correlation between a mouse and the regeneration efficiency of its ears, each ear was taken as an independent regeneration event. For other experiments, the *t*-Student test was performed when the distribution was normal, or the Mann–Whitney Rank-Sum Test when the data distribution was not normal. Since the intact and perforated ear sample for gene expression analysis derived from the same mouse, the paired *t*-Student test was used in this case. The results are shown as the mean \pm s.d. and the variance analysis was performed when two data sets were analyzed. We considered significant differences when the *P*-value was ≤ 0.05 .

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Elizabeth Mata, Graciela Cabeza and Rubén Blancas for their technical assistance, and Minerva Carcaño for her secretarial support. This work was supported by DGAPA/UNAM (PAPIIT grant IN209813, IN213416, IA202317, CONACyT CB239891 and postdoctoral fellowship to GC).

PUBLISHER'S NOTE

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646–674.
- Tomasetti C, Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 2015; **347**: 78–81.
- Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004; **432**: 324–331.
- Blanpain C, Fuchs E. Stem cell plasticity. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science* 2014; **344**: 1242281.
- Wang X, Julio MK-D, Economides KD, Walker D, Yu H, Halili MV *et al*. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature* 2009; **461**: 495–500.
- Molyneux G, Geyer FC, Magnay F-A, McCarthy A, Kendrick H, Natrajan R *et al*. BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; **7**: 403–417.
- Hsu Y-C, Li L, Fuchs E. Transit-amplifying cells orchestrate stem cell activity and tissue regeneration. *Cell* 2014; **157**: 935–949.

- 8 Pomerantz JH, Blau HM. Tumor suppressors: enhancers or suppressors of regeneration? *Development* 2013; **140**: 2502–2512.
- 9 Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**: 667–677.
- 10 Tamaki S, Nye C, Slorach E, Scharp D, Blau HM, Whiteley PE *et al*. Simultaneous silencing of multiple RB and p53 pathway members induces cell cycle reentry in intact human pancreatic islets. *BMC Biotechnol* 2014; **14**: 86.
- 11 Pajcini KV, Corbel SY, Sage J, Pomerantz JH, Blau HM. Transient inactivation of Rb and ARF yields regenerative cells from postmitotic mammalian muscle. *Cell Stem Cell* 2010; **7**: 198–213.
- 12 Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2007; **80**: 84–97.
- 13 Patterson AL, Pru JK. Long-term label retaining cells localize to distinct regions within the female reproductive epithelium. *Cell Cycle* 2013; **12**: 2888–2898.
- 14 Chan RWS, Gargett CE. Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. *Stem Cells* 2006; **24**: 1529–1538.
- 15 Cutts FT. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bull World Health Organ* 2007; **85**: 719–726.
- 16 Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci* 2006; **110**: 525–541.
- 17 Cid A, Auewarakul P, Garcia-Carranca A, Ovseiovich R, Gaissert H, Gissmann L. Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J Virol* 1993; **67**: 6742–6752.
- 18 Davy CE, Jackson DJ, Raj K, Peh WL, Southern SA, Das P *et al*. Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/Cyclin B1 complexes. *J Virol* 2005; **79**: 3998–4011.
- 19 Arbeit JM, Howley PM, Hanahan D. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 2930–2935.
- 20 Brake T, Lambert PF. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 2490–2495.
- 21 Valencia C, Bonilla-Delgado J, Oktaba K, Ocádiz-Delgado R, Gariglio P, Covarrubias L. Human papillomavirus E6/E7 oncogenes promote mouse ear regeneration by increasing the rate of wound re-epithelization and epidermal growth. *J Invest Dermatol* 2008; **128**: 2894–2903.
- 22 Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; **16**: 1–17.
- 23 Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **10**: 207–217.
- 24 Lapouge G, Youssef KK, Vokaer B, Achouri Y, Michaux C, Sotiropoulou PA *et al*. Identifying the cellular origin of squamous skin tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 7431–7436.
- 25 Lambert PF, Pan H, Pitot HC, Liem A, Jackson M, Griep AE. Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes in the skin of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 5583–5587.
- 26 Escalante-Alcalde D, Recillas-Targa F, Valencia C, Santa-Olalla J, Chávez P, Marroquín A *et al*. Expression of E6 and E7 papillomavirus oncogenes in the outer root sheath of hair follicles extends the growth phase and bypasses resting at telogen. *Cell Growth Differ* 2000; **11**: 527–539.
- 27 Takahashi K, Yan B, Yamanishi K, Imamura S, Coulombe PA. The two functional keratin 6 genes of mouse are differentially regulated and evolved independently from their human orthologs. *Genomics* 1998; **53**: 170–183.
- 28 Rothnagel JA, Seki T, Ogo M, Longley MA, Wojcik SM, Bundman DS *et al*. The mouse keratin 6 isoforms are differentially expressed in the hair follicle, footpad, tongue and activated epidermis. *Differentiation* 1999; **65**: 119–130.
- 29 Auewarakul P, Gissmann L, Cid-Arregui A. Targeted expression of the E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus type 16 in the epidermis of transgenic mice elicits generalized epidermal hyperplasia involving autocrine factors. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 8250–8258.
- 30 Dong W, Kloz U, Accardi R, Caldeira S, Tong W-M, Wang Z-Q *et al*. Skin hyperproliferation and susceptibility to chemical carcinogenesis in transgenic mice expressing E6 and E7 of human papillomavirus type 38. *J Virol* 2005; **79**: 14899–14908.
- 31 Jackson R, Togtema M, Lambert PF, Zehbe I. Tumorigenesis driven by the human papillomavirus type 16 Asian-American e6 variant in a three-dimensional keratinocyte model. *PLoS ONE* 2014; **9**: e101540.
- 32 Noya F, Chien WM, Broker TR, Chow LT. p21cip1 degradation in differentiated keratinocytes is abrogated by costabilization with cyclin E induced by human papillomavirus E7. *J Virol* 2001; **75**: 6121–6134.
- 33 Singh SP, Wolfe A, Ng Y, DiVall SA, Buggs C, Levine JE *et al*. Impaired estrogen feedback and infertility in female mice with pituitary-specific deletion of estrogen receptor alpha (ESR1). *Biol Reprod* 2009; **81**: 488–496.
- 34 Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 11162–11166.
- 35 Spurgeon ME, Chung S-H, Lambert PF. Recurrence of cervical cancer in mice after selective estrogen receptor modulator therapy. *Am J Pathol* 2014; **184**: 530–540.
- 36 Evans GS, Gibson DF, Roberts SA, Hind TM, Potten CS. Proliferative changes in the genital tissue of female mice during the oestrous cycle. *Cell Tissue Kinet* 1990; **23**: 619–635.
- 37 Chung S-H, Wiedmeyer K, Shai A, Korach KS, Lambert PF. Requirement for estrogen receptor alpha in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Res* 2008; **68**: 9928–9934.
- 38 Merlo S, Frasca G, Canonico PL, Sortino MA. Differential involvement of estrogen receptor and estrogen receptor in the healing promoting effect of estrogen in human keratinocytes. *J Endocrinol* 2008; **200**: 189–197.
- 39 Verdier-Sevrain S, Yaar M, Cantatore J, Traish A, Gilchrist BA. Estradiol induces proliferation of keratinocytes via a receptor mediated mechanism. *FASEB J* 2004; **18**: 1252–1254.
- 40 Chung S-H, Shin M-K, Korach KS, Lambert PF. Requirement for stromal estrogen receptor alpha in cervical neoplasia. *Horm Cancer* 2013; **4**: 50–59.
- 41 Tata PR, Mou H, Pardo-Saganta A, Zhao R, Prabhu M, Law BM *et al*. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells *in vivo*. *Nature* 2013; **503**: 218–223.
- 42 Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S, Maden M, Epperlein HH *et al*. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 2009; **460**: 60–65.
- 43 Rinkevich Y, Lindau P, Ueno H, Longaker MT, Weissman IL. Germ-layer and lineage-restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip. *Nature* 2011; **476**: 409–413.
- 44 Lehoczyk JA, Robert B, Tabin CJ. Mouse digit tip regeneration is mediated by fate-restricted progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 20609–20614.
- 45 Logotheti S, Papaevangelou D, Michalopoulos I, Sideridou M, Tsimaratou K, Christodoulou I *et al*. Progression of mouse skin carcinogenesis is associated with increased ERα levels and is repressed by a dominant negative form of ERα. *PLoS ONE* 2012; **7**: e41957.
- 46 Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci*. 2009; 4(Appendix): 41.



Oncogenesis is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

Supplementary Information accompanies this paper on the *Oncogenesis* website (<http://www.nature.com/oncsis>).

Hedgehog signaling dynamics in mouse embryos determined by a bioluminescent reporter

DAVID HERNÁNDEZ-GARCÍA[#], DANIEL FUENTES-JIMÉNEZ[#], VERÓNICA ROJO-LEÓN, CHRISTOPHER WOOD^{*}, CELINA GARCÍA^{*} and LUIS COVARRUBIAS^{*}

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelos, México

ABSTRACT Determination of cellular signaling in live embryos is key to understand the molecular processes that drive development. Here, we show that a transgenic mouse line carrying a luciferase-based gene reporter of Gli-mediated transcriptional activation (*Gli-Luc*) displays sonic hedgehog (Shh) signaling in discrete developmental processes during short-term cultures of whole embryos or embryo explants. The bioluminescence in E9.5 embryos was detected in regions in which Shh activity has been demonstrated. Later, in E10.5 embryos, bioluminescence intensity markedly increased, mostly corresponding to the high Shh activity of the developing midbrain and limb. Notably, the dynamic range of the *Gli-Luc* reporter in the developing limb revealed the progressive emergence of bioluminescence in the zone of polarizing activity, where reporter activity locally increased and spatially spread in agreement with the signaling gradient expected for Shh. In the midbrain of E9.5 mouse embryos, bioluminescence was not detected along the ventral region as expected but, instead, Shh-dependent anterior and posterior bioluminescence foci emerged by E10.5 indicating that the *Gli-Luc* reporter can only respond transcriptionally to relatively high levels of GliA and/or without the interaction with other transcription factors. The present work supports the use of bioluminescence to identify and study the dynamics of centers of morphogen signaling during mouse embryogenesis.




KEY WORDS: *sonic hedgehog, luciferase, embryogenesis, midbrain, limbs*

Introduction

Cell signaling is a constant and dynamic process that is behind all molecular mechanisms that control cell behavior during development. Cell signaling involves the activation of a receptor and its transduction into changes in the concentration of second messengers and/or in activation of signaling protein phosphorylation cascades that may ultimately end in modifications of gene expression due to a single or few transcription factors. Therefore, the activity of cell signaling pathways in time windows of minutes or hours can be deduced from the levels of activity of their associated transcription factors. This can be achieved by measuring the expression levels of a reporter transgene that carries one or several copies of the specific transcription factor binding sequence fused to a basal promoter.

Bioluminescent reporter assays are convenient tools for the detection and measurement of different aspects of biological functions, including transcriptional activity in live organisms (Welsh & Kay 2005; Saito *et al.*, 2012; Iwano *et al.*, 2018). One reporter protein frequently employed in these assays is the luciferase enzyme of the firefly *Photinus pyralis* which, in the presence of its substrate luciferin, produces photons. By employing highly sensitive detectors coupled to micro- and macro-scopes, spatially resolved gene expression levels can be followed dynamically over several hours, due to the assay's low toxicity, wide dynamic range and fast response to changes in transcriptional activity (Thorne *et al.*, 2010). Assays with this or similar luciferases have been

Abbreviations used in this paper: *Gli-Luc*: luciferase-based gene reporter of Gli-mediated transcriptional activation; Shh, sonic hedgehog; ZPA, zone of polarizing activity.

***Address correspondence to:** Luis Covarrubias / Celina García / Christopher Wood. Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62210, México.
Tel: +52 (777) 3290817 / +52 (777) 3291636. E-mail: covs@ibt.unam.mx / celina@ibt.unam.mx / chris@ibt.unam.mx - web: <http://www.ibt.unam.mx>
 <https://orcid.org/0000-0002-4066-4915> (LC);  <https://orcid.org/0000-0003-3433-0115> (CG) and  <https://orcid.org/0000-0001-7175-7121> (CW)

#Note: Both authors contributed equally to this study

Supplementary Material (9 supplementary videos for this paper is available at: <https://doi.org/10.1387/ijdb.190098LC>)

Submitted: 5 June, 2019; Accepted: 16 October, 2019.

ISSN: Online 1696-3547, Print 0214-6282

© 2019 UPV/EHU Press
Printed in Spain

implemented for visualization of live cell cultures and live whole organisms (Welsh & Kay 2005; Saito *et al.*, 2012; Iwano *et al.*, 2018). Fluorescent proteins are alternative non-invasive reporters of transcriptional activity, but despite significant improvements and increased diversity, luciferases retain advantages where phototoxicity must be minimized (e.g., long-term imaging), high sensitivity is required, or where the use of most fluorescent proteins to measure gene activity within whole complex organisms (e.g., mammals) is limited by the intrinsic opacity and autofluorescence of most tissues (Saito *et al.*, 2012).

In contrast with zebrafish, the entire process of mouse embryogenesis cannot be observed in real time. Conveniently, explant cultures of pieces of embryo or organs are alternative options to study mouse developmental processes in real time. This type of experimental approach closely reproduces cellular and molecular events associated with a specific developmental process within a determined time window, and has been validated for, among others, both embryonic midbrain and limb development (Baizabal, Covarrubias, 2009; Hernández-Martínez *et al.*, 2009). Therefore, determination of real time transcription dynamics related to specific cell signaling pathways in explant cultures could provide valuable information to understand cell communication during mammalian development.

The Hedgehog (Hh) signaling pathway plays a major role in many developmental processes. Among these, the morphogenetic activity of Sonic hedgehog (Shh) has been studied in detail in two contrasting functions: the specification of neural precursors within the neural tube (Blaess *et al.*, 2011; Ribes *et al.*, 2010) and the specification of digit identity in the developing limb (Ahn, Joyner, 2004; Harfe *et al.*, 2004). In mammals, Shh mediates its effect through the regulation of three Gli family members (Gli1-3), which can activate (GliA; mainly Gli1 and Gli2) or repress transcription (GliR; mostly Gli3) by binding to the Gli binding sequence (GBS; Jiang, Hui, 2008). Here, we used whole embryo and explant cultures derived from a transgenic mouse line that reports transcriptional activation by GliA, to observe the dynamics of Shh activity in different developmental contexts.

Experimental Protocols

Animals

All animal protocols were approved by the Bioethics Committee of the Instituto de Biotecnología-UNAM and performed in accordance with its guidelines. The mice were housed in the animal facility of the Instituto de Biotecnología-UNAM on a 12 h light/dark diurnal cycle. Food was provided *ad libitum*. The embryos employed in the assays were derived from intercrosses among Fvb/NJ Tg(Gli-Luc) homozygous mice or between homozygous for the transgene and Fvb/NJ wild type mice to obtain hemizygous mice. Embryos hemizygous for the transgene were used for all determinations, except for the ones done with midbrain explants (see below). The *Gli-Luc* transgene consists of eight tandem GBS repeats in proximity to the δ -crystallin basal promoter upstream of the *Photinus pyralis* luciferase coding sequence (Kimura *et al.*, 2008). Parents of embryos were genotyped using specific primers in the *Gli-Luc* transgene sequence (forward, 5'CGGGCGCGGTCGGTAAAGT3'; reverse, 5'ACAACAACGCGCGGGAAGT3') and/or by determining bioluminescence intensity in ear pieces.

Whole embryo and embryo explant cultures

E9.5-E11.5 embryos (i.e., embryos at 9.5-11.5 days post coitum; 0.5 was the day of plug detection) were put on a layer of 0.8% agarose in PBS supplemented with 1 mM D-Luciferin (Gold Biotechnology, St. Louis, MO) in a 35 mm Petri dish (Corning Incorporated, Corning, NY) covered with 1 ml of KSOM medium (Embryomax; Millipore, Kenilworth, NJ); cultures were for up to 27 h. In the case of E9.5 and E10.5 embryos, we used 50 μ M of cyclopamine (CYC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and DMSO drug vehicle was used for control cultures. The explant culture procedure was based on the protocol previously described (Baizabal, Covarrubias, 2009; Fig. 1A). For real-time observations, a group of four explants were placed on a 35 mm cover-glass bottom Petri dish (World Precision Instruments, Sarasota, FL) with the ventricular surface facing upwards and individually embedded in a collagen matrix. For treatment with a SMO inhibitor (200 nM SANT-1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), individual explants were placed in one of a 4-chamber 35mm glass bottom Petri dish (*In vitro* Scientific, Mountain View, CA); SANT-1 was added 3 h after the addition of media supplemented with D-Luciferin and cultured for an additional 12 h. Cultures of limbs were performed as previously described (Hernández-Martínez *et al.*, 2009). Briefly, dissected limbs of E10.5 embryos were placed on a 0.22 μ m Durapore GVPP membrane (Millipore, Kenilworth, NJ) which was let floating on DMEM medium with a drop of it added to each sample in a 4-chamber 35 mm glass bottomed Petri dishes with a SMO agonist (100-200 nM SAG; Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, TX) or a SMO antagonist (50 μ M CYC) added to separate chambers and incubated in a 5% CO₂ incubator at 37°C for 6 h. After culture, limbs were incubated in 1 ml of KSOM medium containing 100 nM D-Luciferin for 10 min in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Bioluminescence images of midbrain explants or limbs after culture were acquired either with a 2X objective as described below or within the In-Vivo Xtreme (Bruker, Billerica, MA) with a 7.2 cm² field of view, using a binning factor of 4x4, aperture f/stop of 1, and an acquisition time of 3 min, with no emission filter in place.

Real time bioluminescence assay procedure

For real time determination of luciferase activity, the Petri dish with embryos or midbrain explants was placed into an incubator chamber (INU ZILCS F-1 Tokai Hit, Fujinomiya-shi, Shizuoka, Japan) located on the stage of a microscope (MVX10 Macroview; Olympus Shinjuku, Tokyo, Japan) (Fig. 1B). The parameters for the incubator chamber were 41°C for top heater and 38°C for the stage heater. CO₂ was pumped at 5% in humidified air to the chamber by a dosing pump (CO₂ Module S and Humidifier S; Pecon, Erbach, Germany). No emission filters were employed in the detection light path. For imaging of explants, bright-field and luminescence images were acquired with an EM-CCD camera device (iXon X3 897; Andor, Belfast, UK) attached to the microscope top port. For luminescence acquisition, water cooled to 10°C was circulated (Oasis 160; Solid State, Wappingers Falls, NY) through the cooling chamber of the camera. The camera device was controlled by computer using Micromanager 1.4 (<https://www.micro-manager.org/>), with the Highest Dynamic Range (Conventional Amplifier) acquisition mode at 10°C for bright-field images and Photon Counting for Large Acquisition Time (>1 s) mode at -90°C for luminescence images. One bright-field image was taken at the beginning of the experiment and then a time-lapse image acquisition program proceeded to work for up to 27 h, with one 10-min exposure image taken every 11 minutes

without on chip binning (effective pixel size $16\mu\text{m} \times 16\mu\text{m}$).

For imaging of whole embryos, bright-field and luminescence images were acquired with a slow scan CCD camera device (iKon M; Andor, Belfast, UK) attached to the microscope top port, with water-cooling as described for explant imaging. The camera device was controlled using Micromanager 1.4 (<https://www.micro-manager.org/>), with bright-field images acquired at 10°C chip temperature (100-500 ms exposure), and luminescence images acquired at chip temperature of -95°C , 0.05 MHz read-out. One bright-field image was taken at the beginning of the experiment and then a time-lapse image acquisition program was applied for up to 27 h, with single 10-min exposure images taken every 11 minutes at 2×2 on-chip binning (effective pixel size $26\mu\text{m} \times 26\mu\text{m}$).

Image analysis

The images obtained at the assays were processed with ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Bright-field images were adjusted to the best fit for brightness/contrast. For bioluminescence images, a 16-color LUT was applied. Cosmic ray background was removed with the noise>remove outlier function of ImageJ (1 pixel radius, threshold 5). The brightness/contrast was adjusted to enhance dynamic range for visualization of bioluminescence associated with *Gli-Luc* expression in each sample, without changing original pixel grey level values. Zero value on LUT scale excludes background. LUT value scales according with these settings are shown in figures.

Results and Discussion

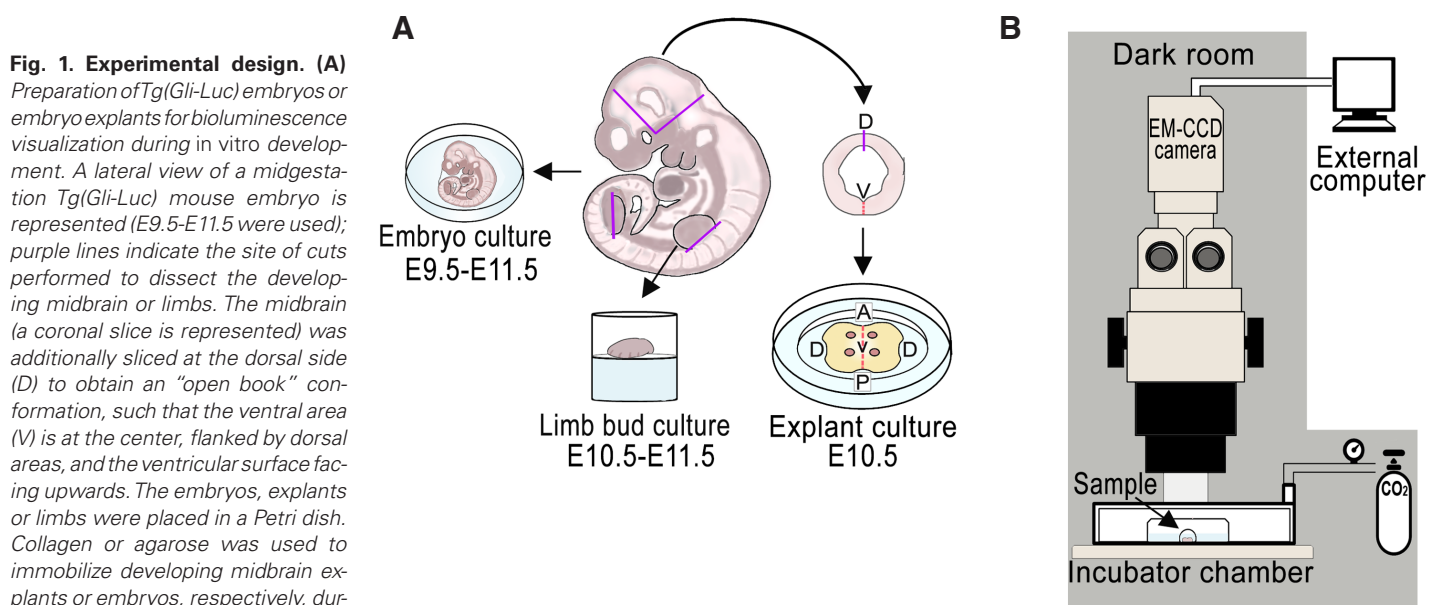
Gli-Luc-directed bioluminescence correlates with *Shh* signaling activity in E9.5-E11.5 mouse embryos

Postnatal Tg(*Gli-Luc*) mice display bioluminescence, mostly visualized in the skin, foot pads and possibly in the developing cerebellum, that can be reversibly abolished by Smo antagonists,

which supports the notion that bioluminescence is produced as a consequence of Hh signaling activation (Kimura *et al.*, 2008). In addition, this report showed high bioluminescence intensity in E15.5 embryos of this transgenic line, but the corresponding distribution pattern of Gli-related transcriptional activation (i.e., due to the Gli transcriptional activators, GliA, Gli1 and Gli2; Jiang, Hui, 2008) was not determined. To evaluate GliA activity in real time during mouse embryo development, we developed a functional real-time imaging system to visualize cultures of embryos or embryo explants of the Tg(*Gli-Luc*) mouse line (Fig. 1). Whole E9.5-E11.5 Tg(*Gli-Luc*) embryos were recorded for up to 27 hours in order to observe the emergence and extinction of Hh-related bioluminescence in distinct embryo regions.

Bioluminescence intensity in E9.5 embryos was low but detectable and spatially restricted (Fig. 2A and Suppl. Video 1). The presence of *Shh*, *Ptch* and/or *Gli1/2* has been reported in the posterior region of the developing forelimb, the distal zone of the first branchial arch, the frontonasal prominence, the differentiating somites and the presomitic/somitic mesoderm (Ahn, Joyner, 2004; Hahn *et al.*, 1996; Harfe *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2004; Marti *et al.*, 1995; McDermott *et al.*, 2005; Platt *et al.*, 1997). For the first branchial arch, the appearance and extinction of bioluminescence in its distal area is likely coincident with the beginning and the end of its outgrowth, a phenomenon regulated by *Shh* (Jeong *et al.*, 2004), whereas, the emergence of bioluminescence in the posterior area of the developing forelimb reports the initiation of *Shh* activity associated with the zone of polarizing activity (ZPA) that controls digit specification (see below) (Ahn, Joyner, 2004; Harfe *et al.*, 2004). On the other hand, the strong bioluminescence in the very posterior zone of the embryo is coincident with the progressive somitogenesis still occurring at this stage (McDermott *et al.*, 2005; Platt *et al.*, 1997).

Despite the good correlation described above, the pattern



observed in the dorsal area around the midbrain has not been consistently detected using *in situ* hybridization or immunohistochemistry (see references above), though one report shows the presence of *Gli1* mRNA in what appears to be the same domain (Platt *et al.*, 1997), and although *Gli2* mRNA is present in this area (Mavromatakis *et al.*, 2011), it has been associated with transcriptional repression rather than activation. In the ventral midbrain, Shh, initially secreted from the notochord (first phase) and then from the floor plate (second phase), specifies progenitors

of ventral neurons, including those in the floor plate that give rise to the mesencephalic dopaminergic neurons, and regulates the initial phases of neuronal differentiation (Hayes *et al.*, 2013). The first phase of Shh signaling within the floor plate occurs prior to the developmental stages analyzed in this study, but during the initiation of the second phase at E9.5, GliA activity was not detected, despite being an area that, at this developmental stage, shows consistent presence of all Hh components (Hayes *et al.*, 2013; Mavromatakis *et al.*, 2011; Platt *et al.*, 1997). On the basis of the bioluminescent

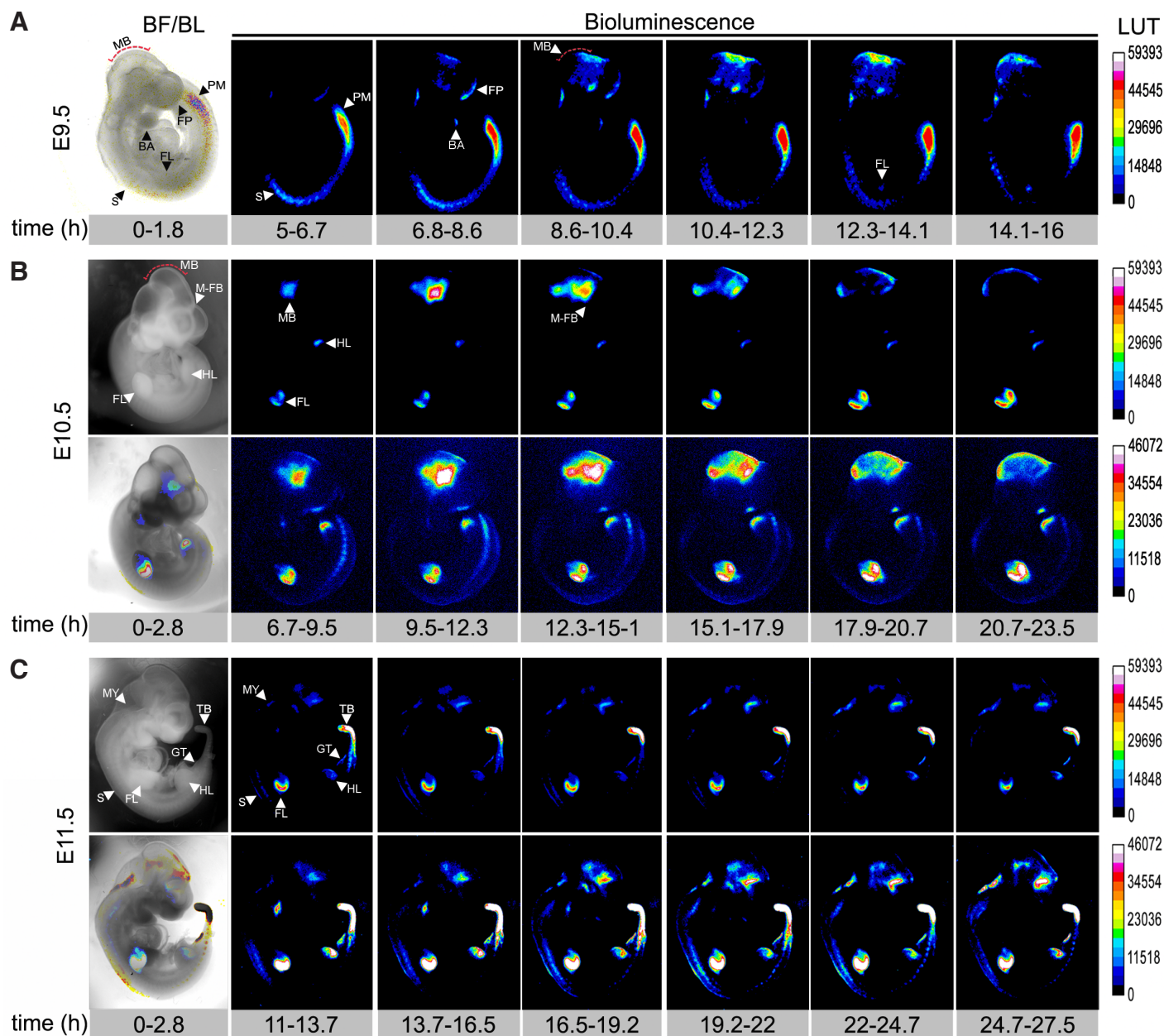


Fig. 2. Bioluminescence during *Tg(Gli-Luc)* embryo development. Bright-field (BF) or overlapped BF and bioluminescence (BF/BL) images of E9.5 (A), E10.5 (B) and E11.5 (C) *Tg(Gli-Luc)* embryos at time 0 (i.e. at culture initiation) are shown. Images to the right are images of the bioluminescence captured within the time window indicated below each image; images are the average time projection of 10 (A) or 15 (B,C) images. Note that the bioluminescent signal appeared to come from somites (S), the first branchial arch (BA), the frontonasal prominence (FP), the somitic/presomitic mesoderm (PM), a midbrain-forebrain (M-FB) region, forelimbs (FL), hindlimbs (HL), the ventral midbrain (MB), the myelencephalon (MY), the genital tubercle (GT) and the tail bud (TB), all regions with known Shh activity. Lower panels of (B,C) show the same bioluminescence images at a compressed intensity scale. In no case additional sites of bioluminescence emission were found.

pattern observed in E10.5 embryos (see below), this unexpected observation suggests that the promoter of *Gli-Luc* only responds to GliA activity either under certain transcriptional genome contexts, including DNA sequences and transcriptional protein complexes

surrounding the GliA-responsive elements, or in the presence of relatively high levels of GliA proteins (more discussion regarding this issue below). Due to the proximity of floor plate and somites, at the obtained spatial resolution we cannot discard the possibility

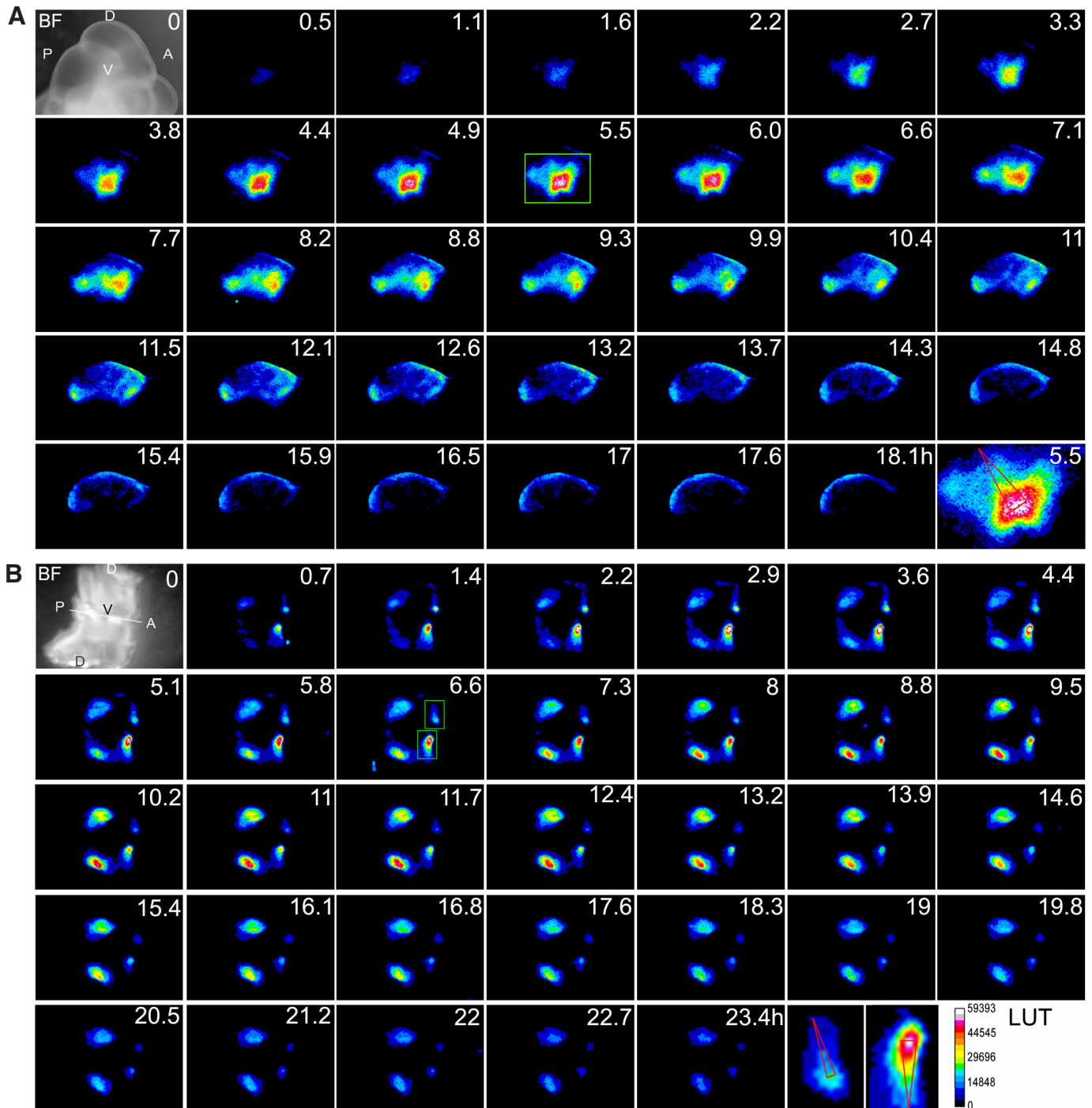


Fig. 3. Bioluminescence imaging in the midbrain during E10.5Tg(Gli-Luc) embryo or midbrain explant development. (A) The midbrain area of a developing E10.5Tg(Gli-Luc) embryo was selected for closer analysis. Each image is a projection of the time-average of 3 individual images. Note that the signal increased first in an anterior (A) domain and then emerged from a posterior (P) domain. **(B)** Midbrain explants from E10.5Tg(Gli-Luc) embryos were cultured for up to 24 h, the period during which bioluminescence was determined. Each image represents the time-average of 4 individual images. Bioluminescence was emitted in restricted domains that emerged with a similar pattern to bioluminescent domains in the intact embryo, though absolute bioluminescence intensity was at a lower range. Red triangles in (A,B) represent the signal gradient in magnifications of the area enclosed in green squares.

that bioluminescence is also absent along the developing spinal cord, where Shh in the floor plate specifies neighboring domains that give rise to motoneurons, among other neuron types (Martí, Bovolenta, 2002).

At E10.5, the bioluminescence remained associated with areas corresponding to differentiating somites where expression of genes encoding Hh components have been reported, as mentioned above, and only extended to few other areas, even when the signal was overexposed (Fig. 2B and Suppl. Video 2). Notably, the ventral area of the midbrain and the ZPA of developing limbs reported relatively high levels of bioluminescence when compared to those detected in E9.5 embryos or other regions of E10.5 embryos. Shh activity has been studied in detail in these two areas (Ahn, Joyner, 2004; Harfe *et al.*, 2004; Hayes *et al.*, 2013). Note that at this stage the

posterior region of hindlimbs are beginning to show GliA activity, in agreement with their delayed development in comparison with forelimbs.

At E11.5, elevated levels of bioluminescence remained in the developing limbs, evident in forelimbs but also in hindlimbs, and emerged in the genital tubercle and in the tail bud where Shh activity has been reported (Haraguchi *et al.*, 2001; Fig. 2C and Suppl. Video 3). At this stage, bioluminescence was still detected in what appears to be the posterior and anterior edges of mesencephalon, myelencephalon and in somites.

To corroborate that the bioluminescent signal detected in embryos described above is Shh-dependent (Fig. 2 A,B), E9.5 and E10.5 embryos were cultured in the presence or absence of the Hh signaling inhibitor cyclopamine (Fig. 5A). Notably near all the

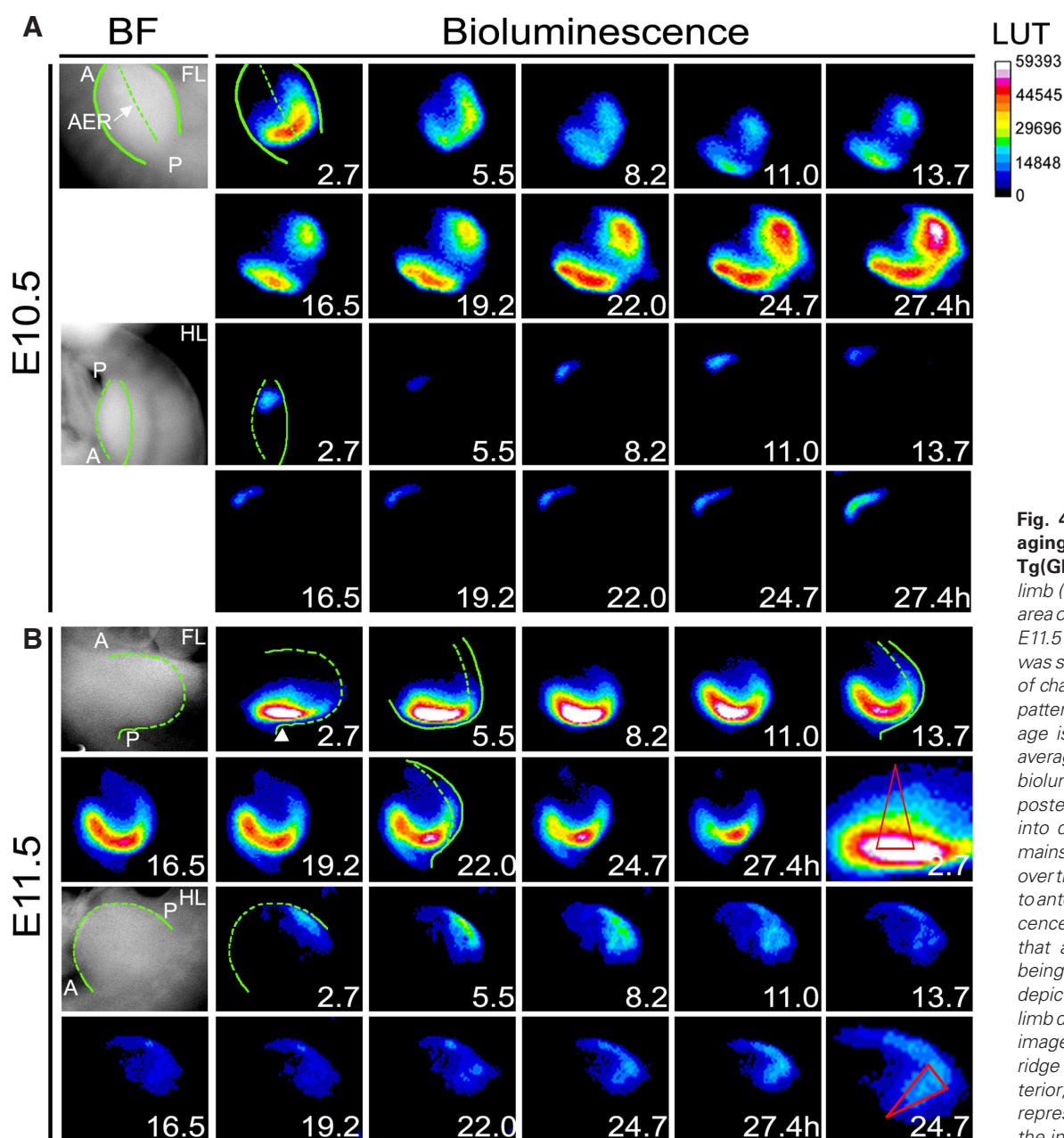
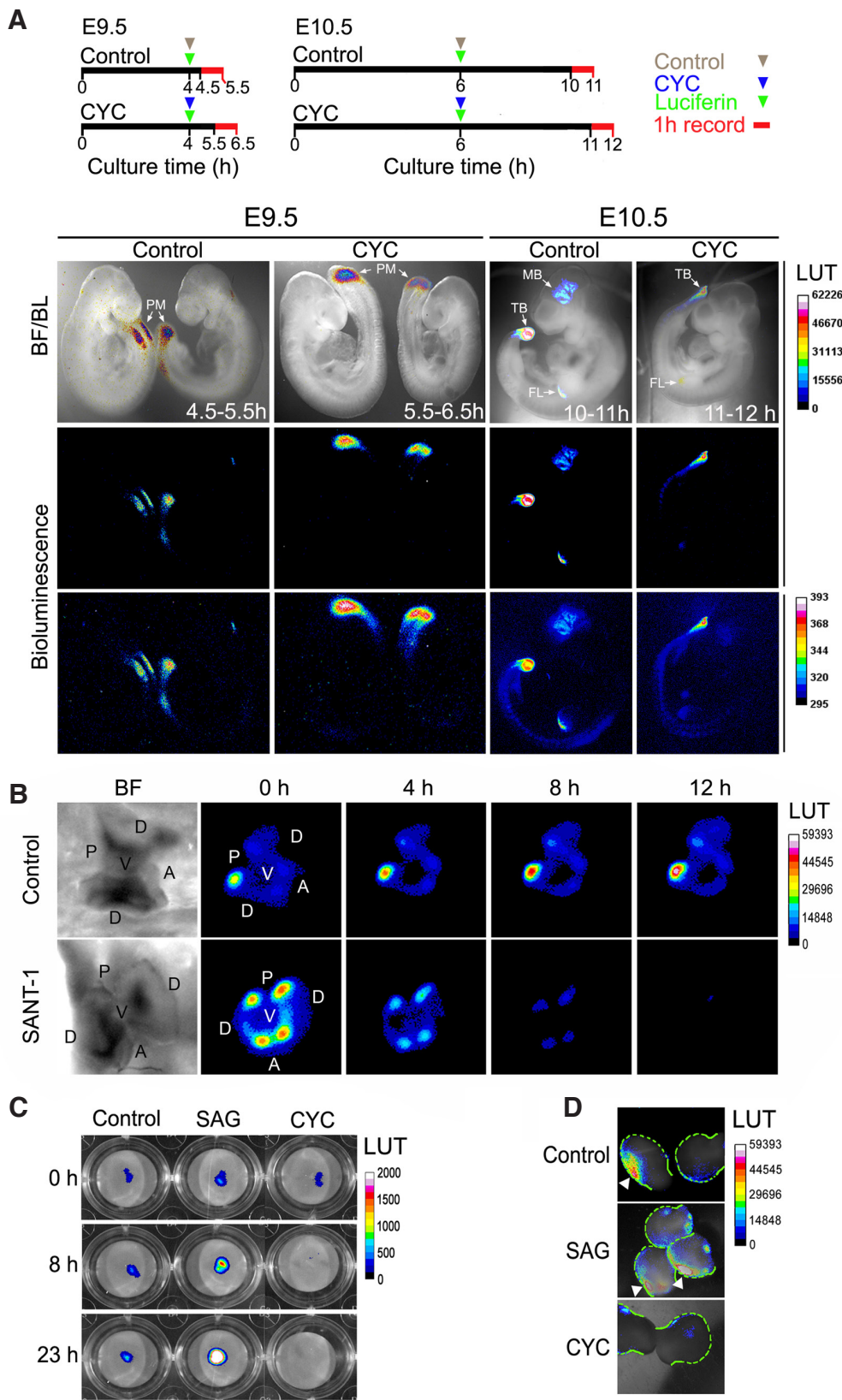


Fig. 4. Bioluminescence imaging in developing limbs of Tg(Gli-Luc) embryos. The forelimb (FL) and the hind limb (HL) area of developing E10.5 (A) and E11.5 (B) Tg(Gli-Luc) embryos was selected for closer analysis of changes in bioluminescence pattern and intensity. Each image is the projected temporal average of 15 images. Note that bioluminescence emerged at a posterior domain and divides into dorsal and ventral subdomains that increased in intensity over time. In addition, a posterior to anterior spread of bioluminescence was obvious, suggesting that a signaling gradient was being detected. The green line depicts relevant contours of the limb detected in bright-field (BF) images. AER, apical ectodermal ridge (dotted green line); A, anterior; P, posterior. Red triangles represent the signal gradient at the indicated time.



bioluminescent signal did not develop in the presence of cyclopamine, except for the strong signal in the posterior region observed at any developmental stage tested (Fig. 2). Specifically, the signal in limbs and midbrain was markedly reduced in embryos treated with cyclopamine, whereas, although the strong bioluminescence in the posterior area was not completely eliminated by cyclopamine, the extension to the anterior presomitic mesoderm was not detected (Fig. 5A; see also Fig. 2). This latter observation could be due to a very high Shh activity occurring in this area or to additional non-canonical GliA activity triggers (Pietrobono *et al.*, 2019).

Gli-Luc reports restricted domains of high GliA activity in the developing midbrain

The bioluminescence intensity in the midbrain of E10.5 embryos was particularly high and, thus, we selected this stage for a detailed analysis of Shh signaling dynamics. Interestingly, bioluminescence emerged from a ventral anterior area of the midbrain, in which the signal progressively increased and then mildly extended posteriorly, mainly within the ventral region (Fig. 3A and Suppl. Video 4). As bioluminescence

Fig. 5. Bioluminescence is Shh-dependent in embryos and in cultured midbrain explants and limbs. (A) E9.5 or E10.5 embryos were cultured in the presence or absence of cyclopamine (CYC) according with the protocol depicted in diagram lines; note that although Control and CYC samples were treated in parallel, there was a 30 min lag in bioluminescence determination between both groups. Overlapped bright-field and bioluminescence (BF/BL; top row) and bioluminescence (middle row) images of E9.5 and E10.5 Tg(Gli-Luc) embryos treated with DMSO (Control) or with cyclopamine (CYC) and recorded for the indicated time are shown; bottom row images are at a compressed intensity scale. All images are the average time projection of 6 images. (B) Midbrains of homozygous Tg(Gli-Luc) were cultured in the presence or absence of SANT-1, another Hh signaling inhibitor as CYC, and bioluminescence images taken at the time indicated (A, anterior; P, posterior; D, dorsal; V, ventral). (C,D) Dissected limbs of E10.5 Tg(Gli-Luc) embryos were treated

with DMSO (Control), the Hh agonist SAG and CYC and bioluminescence images (overlapped with BF images) captured with the In-Vivo Xtreme instrument at the time indicated (C) or recorded for 6 h with the system established here (D; arrowheads, ZPA). Note the extinction of bioluminescence in samples treated with CYC or SANT-1 and the continuous increase in bioluminescence, for up to 23 h, in limbs treated with SAG.

signal decreased in the anterior area, it is apparent that another bioluminescence focus emerged in the posterior ventral midbrain, which also progressively increased in intensity and then disappeared at nearly the same time as the signal in the anterior region (Fig. 3A and Suppl. Video 4). To further examine the above pattern, GliA activity-related bioluminescence was followed during mesencephalic neural differentiation in explants of E10.5 midbrain. Explant cultures could not reproduce the bioluminescence intensity observed in whole embryos, which emerged and disappeared at a much slower rate (12 vs. 24 h) (Fig. 3B and Suppl. Video 5). However, as expected, GliA activity emerged lateral to the midline with a bioluminescence pattern similar to that observed in whole embryos. In particular, it was evident that GliA activity emerged earlier in the anterior than in the posterior region as independent activity foci; note that these bioluminescent foci were ablated by the Hh antagonist SANT-1 (Fig. 5B). It is relevant to mention that the mRNA of Shh and its Ptc receptor show an apparent homogeneous distribution along the ventral midbrain (Jeong *et al.*, 2004; Platt *et al.*, 1997); however, the observations presented here and the location of *Gli1* mRNA indicate that strong Shh signaling is restricted to anterior and posterior midbrain domains. In addition, the graded ventral to dorsal spread of bioluminescence from the anterior domain suggests that a signaling gradient is being formed (Fig. 3 A,B). This strong Shh signaling determined by the *Gli-Luc* reporter at E10.5 stage was not associated with the specification of dopaminergic neurons of the substantia nigra that occurs at an earlier stage and could only be part of the Shh signal that contributes to the specification of a set of ventral tegmental area dopaminergic neurons and of other neurons and astrocytes derived from more lateral ventral domains (e.g., Nkx2.2 and Nkx6.1; (Blaess *et al.*, 2011; Hayes *et al.*, 2011)).

High bioluminescent intensity in developing limbs represents the strong Shh signaling activity of the zone of polarizing activity

The other structure where we detected relatively high GliA activity was the developing limb. Here, Shh signaling emerged from the ZPA, where a morphogenetic function gives identity to digits (Harfe *et al.*, 2004). Although it was accepted for many years that a morphogen concentration gradient generated from the ZPA source was the mechanism for digit specification, a study based on genetic manipulations suggests that the time of exposure to Shh is also relevant for the specification of digit mesenchymal cells (Ahn, Joyner, 2004; Harfe *et al.*, 2004). Following bioluminescence in developing fore- and hind-limbs of E10.5 and E11.5 Tg(Gli-Luc) embryos, Shh signaling was observed to emerge within the ZPA domain as a single spot which subsequently divided into two foci, one ventral and one dorsal, whereby bioluminescence increased locally and signal progressively spread anteriorly (Fig. 4 A,B and Suppl. Video 6-9). The gradual spatial and local increase in bioluminescence could be indicative of the active development of the expected Shh signaling gradient that determines digit specification. Considering the highest and lowest values of bioluminescence intensity detected, the dynamic range of the *Gli-Luc* reporter in limbs of Tg(Gli-Luc) embryos is of up to 10-fold signaling difference. All bioluminescence detected in limbs is Shh-dependent as a marked decrease in bioluminescence occurred in the presence of cyclopamine (a Hh signaling inhibitor) whereas a converse increase in the posterior region and the apparent emergence in

the anterior region was observed following treatment with SAG (a Hh signaling agonist) in cultured limbs (Fig. 5 C,D).

Concluding remarks

The present study shows that the Tg(Gli-Luc) transgenic mouse line is a useful model to follow Shh activity in real time during embryogenesis. However, it is apparent that the capacity of the *Gli-Luc* reporter to report Shh activity is context-dependent and may be restricted to relatively high signaling activation. This latter condition likely correlates with the time at which the high levels of GliA are sufficient to activate *Gli-Luc* transcription, but it could also be associated with low levels of GliR, such as Gli3, which commonly accompanies Shh signaling during development (Büscher, Ruther, 1998; Mavromatakis *et al.*, 2011). The genomic context of GBS can also determine differential responsiveness to Shh signaling. For instance, different sets of genes are regulated by Gli in different developing limb domains, which could relate to variations in the GBS but also appears to result from the genomic context surrounding such binding sequences (Lewandowski *et al.*, 2015). Cooperative binding of transcription factors is a common mechanism controlling gene activation that, if required for GliA-mediated transcriptional activation in a specific spatiotemporal context, would not be detected by the *Gli-Luc* reporter used here. For instance, in the ventral midbrain of E9.5 embryos, although the inability to detect bioluminescence was possibly due to the repressive action of Gli2/Gli3 present in this area (Mavromatakis *et al.*, 2011), transcriptional activation might also depend on the cooperative binding of GliA with SoxB1 neural associated transcription factors within the regulatory sequences of relevant target genes (Oosterveen *et al.*, 2012).

In addition to the excellent correlation between areas of observed bioluminescence and known Shh activity in Tg(Gli-Luc) embryos, the *Gli-Luc* reporter also displayed a wide dynamic range detecting up to 10-fold difference in bioluminescence intensity. Presently, the poor quantitative power of regular *in situ* hybridization or immunohistochemistry protocols used in most studies reporting the presence Shh signaling molecules in embryos, and the unknown transcription factor interactions required in some developmental context, as referred to above, impose limitations for any correlation between bioluminescence intensity due to *Gli-Luc* expression and Shh signaling levels. However, even under this panorama, it was interesting to observe that in many instances the bioluminescent signal due to *Gli-Luc* expression was displayed as foci that correspond to sources of Shh protein (Marti *et al.*, 1995), that emerge and extinguish themselves with time and, thus, possibly correspond to signaling centers. The dynamics of these signaling centers was particularly evident in the limb (Fig. 4B and Suppl. Video 8-9) where a spatial gradient could be detected and, in addition, the local graded increase in bioluminescence within the ZPA opens the possibility of a diffusion-independent Hh signaling gradient that evolves with time and might be relevant for digit specification. This implies that Hh signaling level should be added to the time of signaling activity as part of the mechanism by which Shh contributes to the determination of cell identity (Harfe *et al.*, 2004). Although the pattern of bioluminescent foci observed could be coincident with the temporal emergence of centers of high Shh activity (i.e., containing high levels of GliA), the initiation of Hh signaling might not be detected. This could result from the inability of the *Gli-Luc*

reporter to detect low levels of GliA, or the requirement for cooperation with other transcription factors at this stage (Oosterveen *et al.*, 2012). Consistent with this possibility, the transcriptional activity of Gli2, the initial effector of the Hh signaling pathway in several developmental contexts (Bai *et al.*, 2002) is less efficiently detected by the *Gli-Luc* reporter used here (Sasaki *et al.*, 1999).

Detection of cell signaling by following gene activation in real time is an invaluable tool for the molecular understanding of development. As shown here even the use of a simple promoter containing tandem repeats of the binding sequence for a single transcription factor is capable of reporting the dynamics of cell signaling. At least for Shh, coupling novel and more efficient luciferases (e.g., Akaluc; Iwano *et al.*, 2018) with promoters retaining the natural gene context (e.g., that of *Ptch1*; Kogerman *et al.*, 1999) will greatly facilitate the analysis of the complex cell signaling dynamics associated with this key morphogen.

Acknowledgments

We thank Gilda Guerrero-Flores, Aimée Bastidas-Ponce and Graciela Cabeza for their technical assistance. This work was supported by DGAPA/UNAM (PAPIIT grants IN223810, IA200915, IN213416 and IA202317) and CONACYT grants 239891, 132478 and FOINS1723. We thank Dr. Tom Curran for the donation of the *Fvb/NJ Tg(Gli-Luc)* transgenic mouse line.

References

- AHN S, JOYNER AL (2004). Dynamic Changes in the Response of Cells to Positive Hedgehog Signaling during Mouse Limb Patterning. *Cell* 118: 505–516.
- BAI CB, AUERBACH W, LEE JS, STEPHEN D, JOYNER AL (2002). Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* 129: 4753–4761.
- BAIZABAL J-M, COVARRUBIAS L (2009). The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Dev. Biol.* 325: 49–59.
- BLAESS S, BODEAGO, KABANOVA, CHANET S, MUGNIERY E, DEROUICHE A, STEPHEN D, JOYNER AL (2011a). Temporal-spatial changes in Sonic Hedgehog expression and signaling reveal different potentials of ventral mesencephalic progenitors to populate distinct ventral midbrain nuclei. *Neural Dev* 6: 29.
- BÜSCHER D, RUTHER U (1998). Expression profile of Gli family members and Shh in normal and mutant mouse limb development. *Dev Dyn* 211: 88–96.
- HAHN H, CHRISTIANSEN J, WICKING C, ZAPHIROPOULOS PG, CHIDAMBARAM A, GERRARD B, VORECHOVSKY I, BALE AE, TOFTGARD R, DEAN M, WAINWRIGHT B (1996). A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *J Biol Chem* 271: 12125–12128.
- HARAGUCHI R, MO R, HUI C, MOTOYAMA J, MAKINO S, SHIROISHI T, GAFFIELD W, YAMADA G (2001). Unique functions of Sonic hedgehog signaling during external genitalia development. *Development* 128: 4241–4250.
- HARFE BD, SCHERZ PJ, NISSIM S, TIAN H, MCMAHON AP, TABIN CJ (2004). Evidence for an Expansion-Based Temporal Shh Gradient in Specifying Vertebrate Digit Identities. *Cell* 118: 517–528.
- HAYES L, RALLS S, WANG H, AHN S (2013). Duration of Shh signaling contributes to mDA neuron diversity. *Dev. Biol.* 374: 115–126.
- HAYES L, ZHANG Z, ALBERT P, ZERVAS M, AHN S (2011). Timing of Sonic hedgehog and Gli1 expression segregates midbrain dopamine neurons. *J Comp Neurol* 519: 3001–3018.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ R, CASTRO-OBREGÓN S, COVARRUBIAS L (2009). Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development* 136: 3669–3678.
- IWANO S, SUGIYAMA M, HAMA H, WATAKABE A, HASEGAWA N, KUCHIMARU T, TANAKA KZ, TAKAHASHI M, ISHIDA Y, HATA J, *et al.*, (2018). Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. *Science* 359: 935–939.
- JEONG J, MAO J, TENZEN T, KOTTMANN AH, MCMAHON AP (2004). Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev.* 18: 937–951.
- JIANG J, HUI C-C (2008). Hedgehog Signaling in Development and Cancer. *Dev. Cell* 15: 801–812.
- KIMURA H, NG JMY, CURRAN T (2008). Transient Inhibition of the Hedgehog Pathway in Young Mice Causes Permanent Defects in Bone Structure. *Cancer Cell* 13: 249–260.
- KOGERMAN P, GRIMM T, KOGERMAN L, KRAUSE D, UNDÉN AB, SANDSTEDT B, TOFTGARD R, ZAPHIROPOULOS PG (1999). Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol* 1: 312–319.
- LEWANDOWSKI JP, DU F, ZHANG S, POWELL MB, FALKENSTEIN KN, JIH, VOKES SA (2015). Spatiotemporal regulation of GLI target genes in the mammalian limb bud. *Dev. Biol.* 406: 92–103.
- MARTI E, TAKADA R, BUMCROT DA, SASAKI H, MCMAHON AP (1995). Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development* 121: 2537–2547.
- MARTÍ E, BOVOLENTA P (2002). Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci.* 25: 89–96.
- MAVROMATAKIS YE, LIN W, METZAKOPIAN E, FERRI ALM, YAN CH, SASAKI H, WHISETT J, ANG S-L (2011). Foxa1 and Foxa2 positively and negatively regulate Shh signalling to specify ventral midbrain progenitor identity. *Mech. Dev.* 128: 90–103.
- MCDERMOTT A, GUSTAFSSON M, ELSAM T, HUI C-C, EMERSON CP, BORYCKI A-G (2005). Gli2 and Gli3 have redundant and context-dependent function in skeletal muscle formation. *Development* 132: 345–357.
- OOSTERVEEN T, KURDIJAS, ALEKSEENKO Z, UHDE CW, BERGSLAND M, SANDBERG M, ANDERSSON E, DIAS JM, MUHR J, ERICSON J (2012). Mechanistic Differences in the Transcriptional Interpretation of Local and Long-Range Shh Morphogen Signaling. *Dev. Cell* 23: 1006–1019.
- PIETROBONO S, GAGLIARDI S, STECCA B (2019). Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothed. *Frontiers Genet.* 10: 556.
- PLATT KA, MICHAUD J, JOYNER AL (1997). Expression of the mouse Gli and Ptc genes is adjacent to embryonic sources of hedgehog signals suggesting a conservation of pathways between flies and mice. *Mech. Dev.* 62: 121–135.
- RIBES V, BALASKAS N, SASAI N, CRUZ C, DESSAUD E, CAYUSO J, TOZER S, YANG LL, NOVITCH B, MARTI E, BRISCOE J (2010). Distinct Sonic Hedgehog signaling dynamics specify floor plate and ventral neuronal progenitors in the vertebrate neural tube. *Genes Dev.* 24: 1186–1200.
- SAITO K, CHANG Y-F, HORIKAWA K, HATSUGAI N, HIGUCHI Y, HASHIDA M, YOSHIDA Y, MATSUDA T, ARAI Y, NAGAI T (2012). Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nature Comm.* 3: 1262.
- SASAKI H, NISHIZAKI Y, HUI C, NAKAFUKU M, KONDOH H (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 126: 3915–3924.
- THORNE N, INGLESE J, AULD DS (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chem. Biol.* 17: 646–657.

Further Related Reading, published previously in the *Int. J. Dev. Biol.*

Role of Hox genes in regulating digit patterning

Rocío Pérez-Gómez, Endika Haro, Marc Fernández-Guerrero, María F. Bastida and María A. Ros
Int. J. Dev. Biol. (2018) 62: 797-805
<https://doi.org/10.1387/ijdb.180200mr>

Sonic hedgehog in vertebrate neural tube development

Marysia Placzek and James Briscoe
Int. J. Dev. Biol. (2018) 62: 225-234
<https://doi.org/10.1387/ijdb.170293jb>

Temporal and spatial expression patterns of Hedgehog receptors in the developing inner and middle ear

Jeong-Oh Shin, Harinarayana Ankamreddy, Naga Mahesh Jakka, Seokwon Lee, Un-Kyung Kim and Jinwoong Bok
Int. J. Dev. Biol. (2017) 61: 557-563
<https://doi.org/10.1387/ijdb.170155jb>

Unusual pattern of Sonic hedgehog expression in the polydactylous mouse mutant Hemimelic extra-toes

Isabelle Blanc, Antoine Bach and Benoît Robert
Int. J. Dev. Biol. (2002) 46: 969-974
<http://www.intjdevbiol.com/web/paper/12455636>

Sonic hedgehog: a common signal for ventral patterning along the rostrocaudal axis of the neural tube.

J Ericson, J Muhr, T M Jessell and T Edlund
Int. J. Dev. Biol. (1995) 39: 809-816

