

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



Efecto del 17β -estradiol (E_2) en el modelo murino K14E7 sobre la expresión de miR-210 en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical

Por:

Juan Diego Hernández Villanueva

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México
Junio de 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL

Efecto del 17β -estradiol (E_2) en el modelo murino K14E7 sobre la expresión de miR-210 en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical

Por:

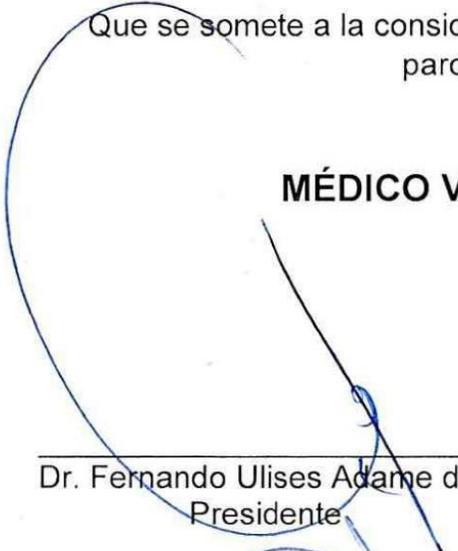
JUAN DIEGO HERNÁNDEZ VILLANUEVA

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:



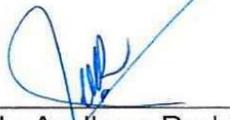
Dr. Fernando Ulises Adame de León
Presidente



M.C. María Guadalupe Sánchez Loera
Vocal



Dra. Ma. de los Ángeles de Santiago
Miramontes
Vocal



MC. Gerardo Arellano Rodríguez
Vocal Suplente



MVZ. J. Guadalupe Rodríguez Martínez
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Coordinación de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México
Junio de 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL

Efecto del 17β -estradiol (E_2) en el modelo murino K14E7 sobre la expresión de miR-210 en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical

Por:

JUAN DIEGO HERNÁNDEZ VILLANUEVA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dr. Fernando Ulises Adame de León
Asesor Principal

M.C. María Guadalupe Sánchez Loera
Coasesor

M.C. Olivia García Morales
Coasesor

MVZ. J. Guadalupe Rodríguez Martínez
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México
2018



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

AGRADECIMIENTOS

A Dios por dejarme culminar una etapa más en mi vida, darme salud y sobre todo las fuerzas para sacar adelante este proyecto y así lograr uno de mis más grandes sueños.

A Mis Padres Aurora Villanueva Santiago y Venancio Hernández Ángeles por todo su cariño, amor y comprensión, por el gran esfuerzo que realizaron para que pudiera culminar con mis estudios, a pesar de todas las adversidades que se presentaron durante todo el trayecto de mi carrera son un gran ejemplo para mí y los quiero muchísimo, gracias por la gran oportunidad que me brindaron.

A Mis Hermanos que siempre estuvieron apoyándome y que nunca me dejaron solo gracias por todos sus consejos.

A Mis Tíos por su apoyo incondicional y por procurarme siempre.

A Mis Amigos El MVZ. Antonio Lugo Trejo y a su gran familia por el gran apoyo y por todos sus consejos y amigos de la carrera que siempre me estuvieron apoyando Edgar Jesús Macías Ortiz, Karla Quetzalli Ramírez Uranga.

Al Doctor Rodolfo Ocadiz-Delgado por el gran apoyo que me brindo cuando estuve redactando mi tesis. Gracias por las revisiones y por todos los buenos consejos.

A Mis Asesores M.C. Olivia García Morales, Dr. Patricio Gariglio Vidal, Dr. Fernando Ulises Adame De León

DEDICATORIA

A Mis Padres por su gran esfuerzo, por todos los consejos y por qué siempre estuvieron cuando más lo necesite.

A Mi Familia que gracias a todos ellos que fueron parte fundamental durante todo el proceso para llevar a cabo este logro.

Al Doctor Rodolfo Ocadiz-Delgado por su gran apoyo en la redacción y los buenos consejos que me brindo.

Al Doctor Ramiro González Avalos por sus buenos consejos y el gran apoyo que me brindo.

A Mi Universidad por darme una formación y convertirme en una persona de bien y por brindarme su enseñanza, gracias UAAAN UL.

ÍNDICE	pág.
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
Justificación.....	3
Objetivo general	4
Objetivos específicos.....	4
Hipótesis.....	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Papilomavirus (HPV).....	6
2.2 Papilomavirus y cáncer	8
2.3 Oncoproteínas virales E5, E6 y E7.....	10
2.4 Estrógenos y cáncer cervical	12
2.5 Los estrógenos sobre regulan a E6 / E7 en células de cáncer cervical.....	15
2.7 Biogénesis de los miRNAs.....	16
2.8 Modelos no transgénicos asociados a cáncer por HPV	19
2.9 Modelos de ratones transgénicos asociados a cáncer por HPV	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Características y propagación de ratones transgénicos HPV16 K14E7	20
3.2 Fenotipo de ratones K14E7 y ratones FvB/n.....	21
3.3 Tratamiento hormonal.....	22
3.4 Análisis Histopatológico de Tejidos y Tumores	22
3.5 Detección de la proteína PCNA como marcador de proliferación celular en tejido cervical de ratones mediante Inmunohistoquímica	23
3.6 Aislamiento y purificación de RNA total.....	23
3.7 Rendimiento de RNA	23
3.8 Síntesis de cDNA para el análisis cuantitativo por RT-PCR en Tiempo Real (RTqPCR).....	24
3.9 Cuantificación relativa del mRNA de Bcl-2 mediante RTqPCR.....	25
3.3.1 Análisis de miR-210 y SNO202 por PCR Cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR)	26

4. RESULTADOS.....	28
5. DISCUSIÓN.....	37
6. CONCLUSIONES.....	39
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	40
8. GLOSARIO.....	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Funciones relacionadas con las proteínas virales del HPV Fuente: zur Hausen, 2002.	8
Cuadro 2. Cuantificación de RNA.	24
Cuadro 3. Condiciones para síntesis de cDNA.....	25
Cuadro 4. Condiciones para determinar los niveles de expresión (mRNA) de Bcl-2 mediante RTqPCR.....	26
Cuadro 5. Primers usados para la expresión de Bcl-2	26
Cuadro 6. Condiciones para la síntesis de la cDNA para miR-210 y SNO202	27
Cuadro 7. Primers usados para la expresión de miR-210 y SNO202.....	27
Cuadro 8. Condiciones para la RT-qPCR a 40 ciclos de amplificación.	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genoma del Virus del Papiloma Humano (HPV) Fuente: zur Hausen, 2002.	7
Figura 2. Infección del HPV y desarrollo de cáncer Fuente: Woodman, et al. 2007	10
Figura 3. Interacción de la proteína E7 con Rb Fuente: Münger, <i>et al.</i> 2002.	12
Figura 4. Metabolismo de 17 β -estradiol Fuente: Gariglio, <i>et al.</i> 2009.	13
Figura 5. Biogénesis de los miRNAs. Fuente: Pedroza, <i>et al.</i> 2014.	18
Figura 6. Fenotipo de ratones FvB/n.	21
Figura 7. Fenotipo de ratones K14E7.....	22
Figura 8. Análisis citológico de células epiteliales del ciclo estral murino.....	28
Figura 9. Determinación en etapa de estro, del ciclo estral mediante citología. Amplificación 40X.	28
Figura 10. Expresión relativa de Greb1 (gen sensible a E2) en el cuello uterino de ratones de 1,5 meses después de la inducción hormonal a corto plazo. D: Diestro; E: Estro; E2I: 24 h inducido por E2. Los resultados sugieren una alta correlación entre la expresión de Greb1 y el entorno hormonal. El experimento se realizó al menos por triplicado.	29
Figura 11. Características histopatológicas del tejido cervical obtenidas de ratones de 1.5 meses de edad antes y después de la inducción hormonal a corto plazo. Exocérvix. D: Diestro; E: Estro; E2I: Estro inducido por 24 h E2; ii: infiltrado inflamatorio. Tinción con hematoxilina-eosina. Amplificación: 40X. Para ratones en diestro e inducida por E2 = 3. Para ratones en estro = 12.	30

Figura 12. Características histopatológicas del tejido cervical obtenidas de ratones de 1.5 meses de edad antes y después de la inducción hormonal a corto plazo. Endocérvix. D: Diestro; E: Estro; E2I: Estro inducido por 24 h E₂; ii: infiltrado inflamatorio. Tinción con hematoxilina-eosina. Amplificación: 40X. Para ratones en diestro e inducida por E₂ = 3. Para ratones en estro = 12.31

Figura 13. Detección del marcador de proliferación celular PCNA mediante inmunohistoquímica en cérvix de ratones de 1.5 meses antes y después de la inducción hormonal a corto plazo. Las flechas vacías ejemplifican la señal nuclear de la proteína PCNA (coloración café-rojiza). D: Diestro; E: Estro; E2I: Estrógeno inducido por 24 h 17b-estradiol. Amplificación: 40X. Para ratones en diestro e inducida por E₂ = 3. Para ratones en estro = 12.32

Figura 14. Niveles relativos de proliferación celular (PCNA) en el cuello uterino obtenido de ratones de 1.5 meses de edad. D: Diestro; E: Estro; E2I: 24 h 17b Estrógeno inducido por estradiol. Para ratones en diestro e inducida por E₂ = 3. Para ratones en estro. El experimento se realizó al menos por triplicado.33

Figura 15. Niveles de expresión de miR-210 en ratones de 1.5 meses de edad. .34

Figura 16. Niveles de expresión de miR-210 de 1.5 meses de edad.35

Figura 17. Niveles de expresión de mRNA relativo a Bcl-2.....35

Figura 18. Comparación de los niveles de expresión de miR-210 y Bcl-2.....36

RESUMEN

Tomando en cuenta la necesidad de identificar posibles marcadores tempranos en el proceso de la carcinogénesis cervical que permitan disminuir el gran número de muertes derivadas de cáncer, ha sido necesario que investigadores de todo el mundo implementen sus esfuerzos y conocimientos en la búsqueda de estos marcadores.

Actualmente se pretende identificar y de ser posible asociar qué alteraciones en la expresión de los microRNAs (miRNAs) o de proteínas implicadas en su biogénesis están directamente relacionadas con la aparición de diferentes tipos de cáncer y de esta forma, emplear estas moléculas como marcadores sanguíneos de predicción y de diagnóstico de procesos tumorales. Por ello, el diagnóstico o predicción basado en miRNAs es un método que puede incrementar en gran medida las posibilidades de detección temprana (con alta precisión) de patologías tan prevalentes en nuestra sociedad como son cáncer de mama, colón, pulmón, próstata y sobre todo cáncer cervicouterino, que actualmente se sabe es la segunda causa de muerte en mujeres a nivel mundial.

Además, los miRNAs permiten detectar aquellos patrones de expresión en sangre que científicamente se asocian a una recuperación más o menos rápida tras una operación quirúrgica, o una respuesta más o menos favorable frente a un tratamiento farmacológico, permitiendo diferenciar la respuesta de los pacientes frente a distintos tratamientos, optimizando así los beneficios y permitiéndonos ofrecer la conocida medicina personalizada.

Las aplicaciones de los miRNAs no se limitan a la detección con potencial diagnóstico o predictivo. Al actuar como verdaderos puntos de control de la

expresión génica, será posible desarrollar terapias que permitan la introducción de miRNAs en células tumorales a modo de moléculas terapéuticas que redirijan la traducción proteica de una célula maligna hacia una expresión de genes supresores de tumores y una represión de genes oncogénicos causantes de la enfermedad que reduzca su malignidad, mejorando así la respuesta del paciente.

Las evidencias sugieren que la combinación de esta nueva terapia con los fármacos tradicionales podría llegar a conseguir grandes avances en la mejora de la calidad y esperanza de vida de los pacientes. Aunque la investigación de miRNAs aún está siendo desarrollada y no hay resultados concretos que permitan la aplicación de estas terapias, son numerosos los ensayos clínicos que están demostrando que son una herramienta prometedora en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades.

Existen diversos factores responsables de la expresión de los miRNAs, algunos de éstos y quizá los más importantes en el caso del cáncer cervicouterino se centran en el virus del papiloma humano de alto riesgo y la constante exposición a hormonas, como lo es el (E₂), los cuales aceleran el desarrollo de cáncer cervicouterino. Por tal motivo en esta investigación se espera profundizar en el estudio de estos importantes factores. En el presente estudio nos enfocamos a estudiar un miRNA que ha mostrado cambios en su expresión en la carcinogénesis cervical como lo es el miR-210. Diversas publicaciones han mostrado que miR-210 puede comportarse como un posible supresor de tumor, arretando el ciclo celular en la fase G₁ a G_S. Por tanto, se evaluaron las etapas tempranas de la carcinogénesis en un modelo murino que expresa la oncoproteína E7 del HPV16 utilizando un tratamiento hormonal con E₂ durante 24 h (inducción a corto plazo).

Como se mencionó anteriormente, se decidió estudiar el efecto de la oncoproteína E7 del HPV de alto riesgo y del E₂. Para este proyecto, se contó con un modelo de ratón transgénico que expresa la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano de alto riesgo tipo 16 (ratones K14E7), de manera que se trabajó con 4 grupos de ratones: K14E7 tratados y sin tratar con (E₂), y ratones FvB/n (control silvestre) igualmente tratados y sin tratar, todos de 1.5 meses de edad. El tratamiento se realizó durante 24 horas y se determinaron los niveles de expresión de miR-210 en el cérvix.

De esta manera se logró identificar que los niveles en la expresión de miR-210 son regulados a la alza por el E₂. A los 1.5 meses de edad en ratones FvB/n. De manera interesante, en ratones K14E7 tratados hormonalmente se observó una disminución de la expresión de miR-210, lo que concuerda con la sobre-expresión del gen antiapoptótico Bcl-2, un blanco de este miRNA. En concordancia, encontramos que el tratamiento hormonal y la presencia de E7 incrementaron los niveles de proliferación celular en el epitelio cervical de los ratones K14E7. Nuestros resultados sugieren que, en etapas tempranas, la expresión de la oncoproteína E7 y la inducción con E₂ en una sola dosis es capaz de alterar la expresión de miR-210 disminuyendo su expresión en ratones inducidos. Con base en estos resultados así como la determinación de los niveles de expresión de otros miRNAs en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical podría ser utilizada como un método temprano de diagnóstico molecular del cáncer.

Palabras claves: Virus del papiloma humano (HPV), 17 β -estradiol E₂, miRNAs, Oncoproteínas, miR-210.

1. INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano de alto riesgo (HR-HPV) ha sido asociada al desarrollo de cáncer, principalmente con el cáncer cervicouterino (CaCu) (IARC, 2008; Ferlay *et al.*, 2008). Este es un problema de salud mundial. En México, el CaCu es considerado uno de los cánceres más frecuentes en mujeres, ocupando el segundo lugar después del cáncer de mama (IARC, 2008; Ferlay *et al.*, 2008). A pesar de los esfuerzos para prevenir la infección por el virus del Papiloma Humano esta enfermedad sigue representando un serio problema de salud y socioeconómico (IARC, 2008; Ferlay *et al.* 2008).

En la última década se ha determinado que los miRNAs juegan un papel muy importante en el proceso del desarrollo del cáncer (Lorio *et al.*, 2005). Estas pequeñas moléculas de aproximadamente 22 nucleótidos regulan negativamente la expresión de genes a través de la unión a secuencias complementarias en la región 3' UTR de los mRNAs (Esquela y Slack, 2006). Muchos miRNAs han sido descritos como oncogenes o supresores de tumor de acuerdo a los niveles de expresión en el tumor y a los blancos que ellos regulan; importantemente, a través de estas pequeñas moléculas se ha podido discriminar entre tejido normal y canceroso (Myklebust *et al.*, 2011). Previamente, se ha demostrado que, en cáncer cervical, miR-15b es regulado positivamente por la oncoproteína E7 del papilomavirus humano tipo 16 (HPV-16) (Myklebust *et al.*, 2011). Por lo que se observa una alta expresión de miR-15b en cáncer cervicouterino (Li *et al.*, 2011), dando como resultado la detención del ciclo celular por la inhibición de las ciclinas D y E como genes blanco, que se correlaciona con el aumento en la expresión de genes inducidos por el factor de transcripción E2F. Tales como MCM7, MSH6, ciclinas y

cdks, entre otros, que favorecen la proliferación celular (Myklebust *et al.*, 2011). Desde hace varios años, los miRNAs han surgido como una nueva clase de biomarcadores moleculares, porque con frecuencia están desregulados en el cáncer, uno de los miRNA identificados en estos perfiles, es el miR-210, es un miRNA regulado por hipoxia y un objetivo de factor 1 alfa (HIF1-alfa) inducible por hipoxia. Como la hipoxia es una característica importante de los tumores sólidos, el papel de miR-210 en la progresión del cáncer se ha estudiado ampliamente y se demostró que miR-210 se sobre expresa en numerosos tipos de cáncer, incluidos cáncer de páncreas, cáncer de mama, pulmón, cabeza y cuello o actuando como supresores de tumores u oncogenes. miR-210 tiene múltiples funciones en las células cancerosas pero también en las células normales, y está involucrado en la angiogénesis, el control de la diferenciación de células madre, la regulación del ciclo celular, la reparación del daño del ADN, el metabolismo mitocondrial y la respuesta inmune (Bar *et al.*, 2107). Con base en lo anterior, y dada la alta estabilidad de los miRNAs circulantes (séricos), recientemente se proponen que estas moléculas son posibles marcadores tumorales, los cuales podrían ser utilizados como diagnóstico temprano del cáncer.

Los estrógenos actúan principalmente sobre los órganos reproductivos, el sistema nervioso central, el sistema vascular y el tejido adiposo. El estrógeno tiene dos funciones en la carcinogénesis mamaria. El E₂ es la forma más bioactiva de estrógenos endógenos. En primer lugar, el E₂ circulante se somete a una hidroxilación mediada por el citocromo p450 para producir las catecolaminas, estrógenos 2 hidroxil E₂ y 4-hidroxil E₂ en los órganos diana. Estos metabolitos desempeñan un papel clave en la inducción de daño en el ADN y las mutaciones

resultantes. En segundo lugar, E₂ estimula la proliferación de células que albergan esas mutaciones desencadenando así la acumulación de células cancerosas.

Estos procesos de iniciación y promoción son ampliamente aceptados como un efecto directo de E₂ que conduce al cáncer de mama. Sin embargo, los mecanismos precisos no están completamente dilucidados (Jinno *et al.*, 2018).

En forma paralela desde hace algunos años se realizan estudios encaminados a combatir el cáncer cervicouterino y se cuenta con un modelo murino de carcinogénesis cervical (ratones transgénicos K14E7) el cual, después de ser tratado durante 6 meses con E₂ (7 meses de edad), desarrolla cáncer invasor en más del 80% de los casos (Ibarra, *et al.*, 2012; Cortés, *et al.*, 2013). Debido al interés en definir marcadores moleculares para el diagnóstico temprano del cáncer, en el presente proyecto se estudiaron animales transgénicos jóvenes (1.5 meses de edad) tratados con una sola dosis de E₂ por 24 horas (inducción a corto plazo), con el objetivo de analizar la expresión de miR-210 en tejido cervical. Esta información será valiosa para establecer, junto con otros marcadores moleculares, nuevas estrategias de diagnóstico molecular temprano del CaCu.

Justificación

El cáncer cervicouterino (CaCu) representa un problema de salud para la humanidad, ya que es el cáncer más común después del de mama; en México el CaCu ha sido en la última década el cáncer más frecuente entre la población femenina.

Sin embargo, dada la alta incidencia de CaCu en nuestro país, es necesario estudiar este padecimiento a nivel molecular para poder implementar nuevas formas diagnósticas tempranas que ayuden a combatir este serio problema de salud.

Un avance importante en dicho estudio será la evaluación de moléculas que participan en el proceso de desarrollo del CaCu como son los miRNAs y sus blancos, en especial miR-210, como posible marcador molecular para el diagnóstico temprano de dicho padecimiento.

Objetivo general

Determinar los niveles de expresión de miR-210 en el modelo murino K14E7 utilizando una dosis única de E₂ por 24 horas a los 1.5 meses de edad y establecer un posible sinergismo entre ambas condiciones, en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical.

Objetivos específicos

- Confirmar el efecto del E₂ mediante los niveles de expresión de Greb1.
- Determinar si existen cambios histopatológicos en el tejido cervical en ratones FvB/n y K14E7 de 1.5 meses de edad tratados y no tratados con E₂.
- Determinar los niveles de proliferación celular en el epitelio cervical en ratones FvB/n y K14E7 de 1.5 meses de edad tratados y no tratados con E₂.
- Determinar la expresión de miR-210 en ratones FvB/n y K14E7 de 1.5 meses de edad tratados y no tratados con E₂.
- Determinar, mediante PCR cuantitativa en tiempo real, los niveles de expresión de miR-210 en muestras de cérvix de ratones de 1.5 meses de edad tratados y no tratados con E₂.
- Determinar la expresión de Bcl-2, un blanco de miR-210.

Hipótesis

Si la inducción rápida con E₂, conduce al aumento de la proliferación celular y la disminución de la apoptosis, entonces se afectarán los niveles de expresión de miR-210.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Papilomavirus (HPV)

Los papilomavirus (HPV) son virus ADN de doble cadena (dsADN), de 52-55 nm de diámetro, sin envoltura y con una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros que envuelven el genoma. Pertenece a la familia Papillomaviridae (Steben y Duarte, 2007). Los viriones contienen al menos dos proteínas de la cápside: la proteína mayor (L1) o principal (el 80% del virión) de 559 kilodaltons (kDa) y la proteína menor (L2) de 76 kDa (zur Hausen, 2002). Las proteínas de la cápside del HPV están altamente conservadas. El genoma se puede dividir en tres porciones principales: una región temprana (E) de 4 kb que codifica proteínas no estructurales, una región tardía de 3 kb (L) que codifica para las dos proteínas de la cápside y una proteína no codificante de 1 kb región larga de control (LCR) que contiene una variedad de elementos, que regulan la replicación viral y la expresión génica (Duggan *et al.* 1998; Münguer *et al.*, 2004). El resto del genoma se agrupa en el marco de lectura abierta (ORF). Entre éstas se distinguen dos regiones funcionalmente diferentes (Figura 1), las denominadas E “early” o de expresión temprana (segunda región) las L “late” o de expresión tardía y las de región larga de control (tercera región) (Man, 1998). Las regiones “E” están formadas por varias secuencias (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) que codifican proteínas responsables de las funciones de transformación celular, replicación y de la persistencia del ADN integrado en las células a las que infecta.

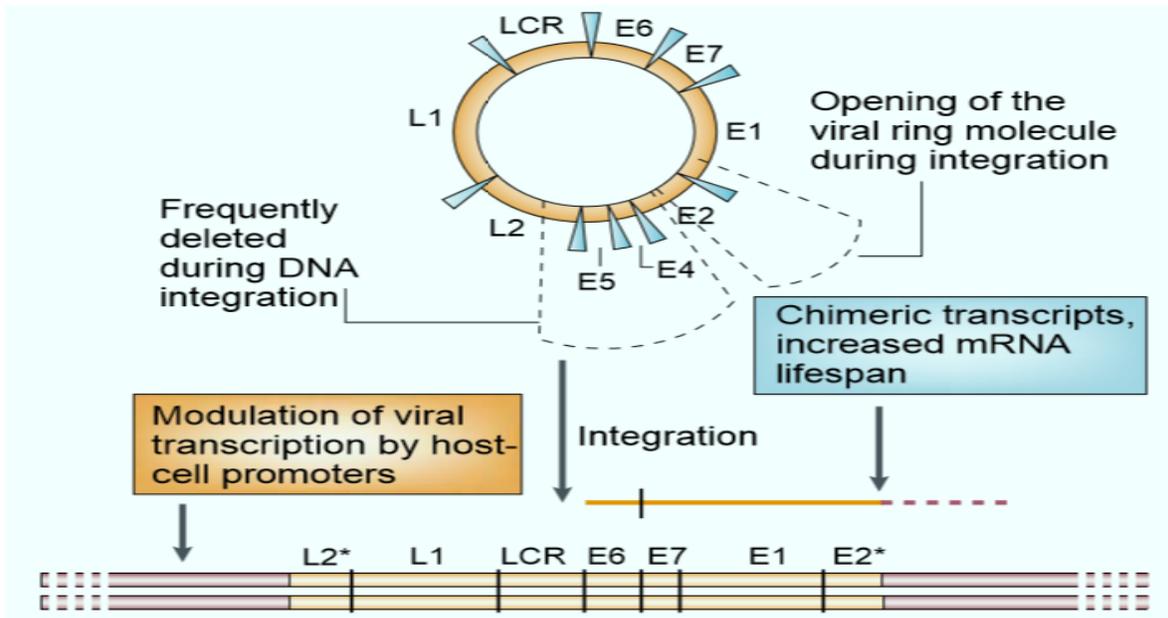


Figura 1. Genoma del Virus del Papiloma Humano (HPV) Fuente: zur Hausen, 2002.

La región tardía L están formadas por dos secuencias (L1 y L2), responsables de la codificación de las proteínas de la cápside en la fase final del ensamblaje viral (Guzmán *et al.* 1998). La L1 codifica para proteína principal de la cápside (región altamente conservada entre los diferentes tipos de HPV y la L2 para proteínas secundarias antígeno-específicas (zur Hausen, 2002) (Cuadro 1).

Especial interés tienen las regiones E6/E7, que poseen un importante papel en los mecanismos de transformación celular. Estas regiones están siempre expresadas en los cánceres asociados al HPV (Guzmán *et al.*, 1998).

Las oncoproteínas E6 y E7 se unen a las proteínas supresoras de tumores p53 y pRb, respectivamente inactivando su función, mecanismo que puede explicar al menos en parte la intervención de los HPV en el proceso de oncogénesis (Guzmán *et al.*, 1998).

Gen	Función relacionada
E1	Inicio de la replicación del ADN (helicasa).
E2	Regulación transcripcional, replicación del ADN.
E4	Proteínas asociadas al nucleoide (NS) tardías
E5	Proteína transformante relacionada con factores de crecimiento, ej. Factor de crecimiento derivado de plaquetas (por sus siglas en inglés PDGF)
E6	Proteína transformante, se une a p53 dirigiendo su degradación
E7	Proteína transformante se une a Rb, secuestrándola
L1	Proteína mayor de la cápside
L2	Proteína menor de la cápside

Cuadro 1. Funciones relacionadas con las proteínas virales del HPV Fuente: zur Hausen, 2002.

2.2 Papilomavirus y cáncer

Los estudios científicos en las últimas décadas han proporcionado evidencia definitiva de que el cáncer de cuello uterino es una enfermedad de transmisión sexual que resulta de la infección con ciertos tipos oncogénicos de alto riesgo del virus del papiloma humano. El ADN del HPV se encuentra en el 99% de los cánceres cervicales invasores en todo el mundo (Ibeanu, 2011). El cáncer es causado por la proliferación descontrolada y la supervivencia inadecuada de las células dañadas, lo que da como resultado la formación de tumores (Esquela y Slack. 2006). Varios tipos de HPV han sido aislados de tumores malignos (zur Hausen, 2002), específicamente de CaCu y de cáncer anogenital; sin embargo, también ha sido detectado en casos de cáncer de piel, cavidad oral y nasal (zur Hausen, 2002. Holly, 1996). El factor etiológico central para el desarrollo de cáncer de cuello uterino es

la infección persistente con tipos de HPV oncogénicos de alto riesgo (Ibeanu, 2011). Dentro de los factores de riesgo estudiados se citan: promiscuidad, inicio temprano de relaciones sexuales, el embarazo precoz por la inmadurez de las células del cuello uterino, la multiparidad, otras infecciones de transmisión sexual, deficiencias nutricionales (Bonilla *et al.*, 2017). Además, la exposición prolongada a estrógenos (por ejemplo anticonceptivos orales) duplica el riesgo de neoplasia y malignidad por HPV (Arbeit *et al.*, 1996). También están considerados otros agentes de transmisión sexual como *Chlamydia trachomatis* (Muñoz y Bosch, 1997). Los HPVs más reconocidos por su capacidad transformante son el tipo 16 y el 18 (Meschede, *et al.* 1998), ya que se han identificado como el agente causal de al menos el 90% de los cánceres de cérvix (zur Hausen, 2002) y se encuentran ligados al 50% de los otros cánceres anogenitales, es por ello que son considerados de alto riesgo (zur Hausen, 2002); de ellos, el HPV-16 representa la mayor proporción (50%), seguido por el HPV-18 (12%), HPV-45 (8%) y HPV-31 (5%) (Muñoz *et al.*, 1997).

Ciertas observaciones indican que en la infección inicial el HPV está presente de forma episomal, pero en la mayoría de las lesiones avanzadas y tumores invasivos el HPV está integrado al genoma del hospedero (Duggan, 1998); por lo tanto, la integración del DNA del HPV al genoma está correlacionada con el incremento en la expresión de genes virales y el avance del desarrollo celular (Figura 2) (Woodman *et al.*, 2007); otras observaciones corroboran la hipótesis de que la integración provee un selectivo incremento de los precursores de carcinoma de epitelio cervical (Jeon *et al.*, 1995).

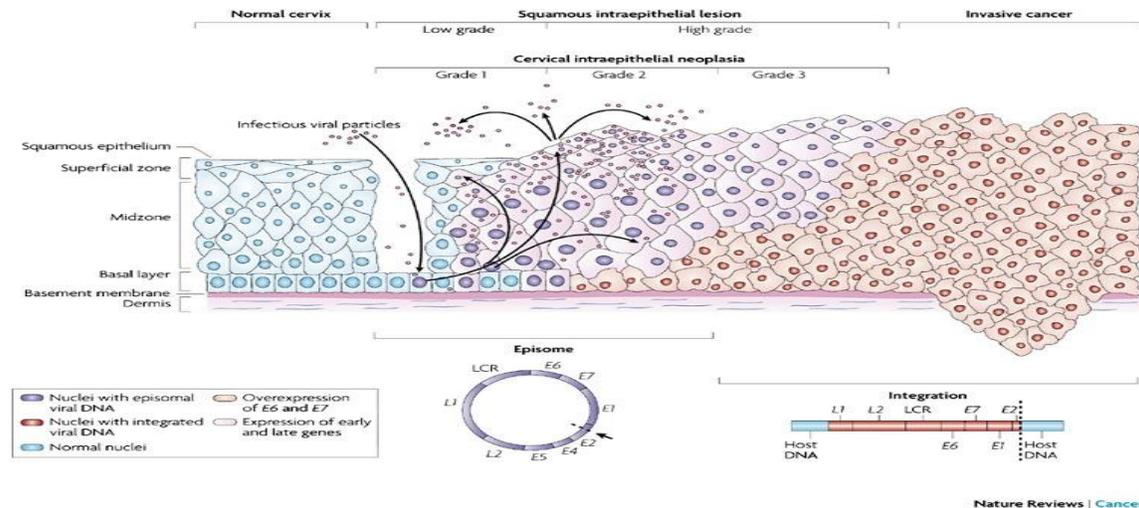


Figura 2. Infección del HPV y desarrollo de cáncer Fuente: Woodman, et al. 2007

2.3 Oncoproteínas virales E5, E6 y E7

Los oncogenes más importantes de HPV son los genes E6 y E7 que codifican oncoproteínas que causan la transformación de la célula huésped. La transcripción de los oncogenes E6 y E7 siempre se ha observado en los carcinomas de cuello uterino, siendo la primera indicación del papel principal de estos genes virales en el cáncer de cuello uterino mediado por el HPV. Las propiedades oncogénicas de E6 y E7, así como sus efectos sobre la proteína p53 y Rb (pRb), han proporcionado la base general para investigaciones adicionales del papel del HPV en la carcinogénesis en el cuello uterino infectado por el HPV (Ganguly *et al.*, 2017. Por otro lado, E5 parece ser importante en el curso temprano de la infección, se estimula el crecimiento celular mediante la formación de un complejo con el receptor del factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas receptor- β pero E5 no es obligatoria en eventos tardíos de la carcinogénesis mediada por HPV (zur Hausen, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que la principal función transformante de HPV-18 está localizada en los productos de los

genes E6 y E7 (Bedell *et al.*, 1987). El gen de la proteína E7 del HPV-16 codifica para una fosfoproteína nuclear multifuncional de 98 aminoácidos que presenta similitud estructural y funcional con los antígenos E1A de adenovirus y T de papovavirus (Pahel *et al.*, 1993). La proteína E7 ha sido localizada en la fracción soluble del citoplasma y posee una vida media de 1 hora (Smotkin y Wettstein, 1987), esta proteína coopera con el oncogén RAS, además puede cooperar con E6 para lograr la eficiente immortalización de queratinocitos humanos primarios (Pahel *et al.*, 1993). La proteína E7 purificada se une ávida y específicamente a la proteína retinoblastoma (pRB); pRb es fosforilada (ppRB) por el complejo quinasa/dependiente de ciclinas (CDKS) y esta fosforilación causa la liberación del factor E2F *in vitro* (Figura 3) (Álvarez *et al.*, 1998). Se cree que la interacción de E7 con Rb sea un paso para la carcinogénesis (Gulliver *et al.*, 1997), al igual que su unión con proteínas celulares y ciertas proteínas virales transformantes (E1A, T) (Stirdivant, *et al.* 1992). Asimismo E7 es capaz de aumentar la actividad ATPasa de la subunidad 4 (4S) del proteosoma 26S, y se cree que la degradación de Rb por el proteosoma 26S es a través de la interacción de E7 con la subunidad 4S (Berezutskaya, 1997), otras investigaciones demuestran que la proteína E7 del HPV-18 une al zinc a través de un cys-xx-cys repetido en la región C terminal de la proteína, estos motivos juegan un importante papel en la transformación pero no contribuyen a la unión de E7 con Rb (Mc Intyre *et al.*, 1993), E7 además de modificar la expresión de Rb, interactúa con otras proteínas reguladoras del crecimiento celular, especialmente en la transición de la fase G₁ a la fase S, entre estas proteínas se encuentran; p107, p130, desacetilasas de histonas (HDAC), factores de transcripción AP-1, proteínas de unión a caja TATA (TBP), Ciclinas, Cinasas

Dependientes de Ciclinas (cdks) e inhibidores de éstas, de manera que E/ desregula el ciclo celular y conduce al incremento de la proliferación celular, immortalización y finalmente transformación (Peiyue, 2014). El HPV codifica también para una proteína E6 la cual está ligada al desarrollo del cáncer (Stoppler *et al.*, 1997. Pei, 1996); esta proteína es capaz de unirse a p53 que es un gen supresor de tumor, induciendo su degradación (Storey, 1998; Jeon *et al.*, 1995) a través del camino de la ubiquitina (zur Hausen, 2002). E6 y E7 juntas desarrollan alteraciones en la expresión de la Ciclina A, Ciclina B y cdc-2, los incrementos en la expresión de éstos y la eliminación de p53 seguidas de la expresión de E6 y E7 pueden ser importantes en el desarrollo de células immortalizadas (Pei, 1996).

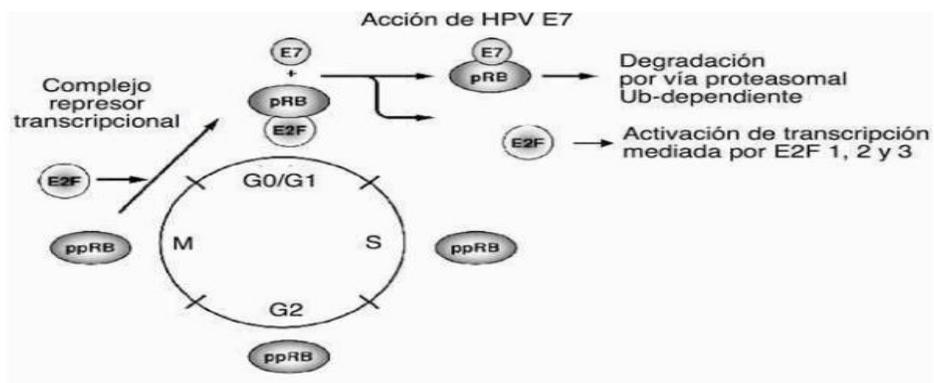


Figura 3. Interacción de la proteína E7 con Rb Fuente: Münger, *et al.* 2002.

2.4 Estrógenos y cáncer cervical

Los estrógenos son un grupo de compuestos esteroides, cuya función principal es actuar como hormonas sexuales femeninas. Los estrógenos son extremadamente importantes en el ciclo estral. Los tres principales estrógenos de origen natural en las mujeres son el estradiol, estriol y estrona (Figura 4). Cada uno contiene un anillo fenólico con un grupo hidroxilo en el carbono 3 y una β -OH o cetona en la posición

superficie cervical externa llegando a ser reepitelializado principalmente por epitelio escamoso estratificado. En un pequeño número de casos, la reepitelización es seguida por el desarrollo de las lesiones precancerosas de varios grados (Gariglio *et al.*, 2009).

Varios estudios han demostrado un vínculo entre la exposición hormonal y el riesgo de CaCu. Un importante estudio ha indicado que las mujeres que consumen estrógeno que contiene OC (anticonceptivos orales, por sus siglas en inglés) por 6 años o más han aumentado el riesgo de desarrollar ambos adenocarcinomas y SCC (Carcinoma de células escamosas). Los niveles séricos de E₂ fueron significativamente mayores en mujeres que usan OC con un mayor riesgo de neoplasia cervical (Gariglio *et al.*, 2009).

Interesantemente, el daño del ADN inducido por metabolitos de estrógeno puede conducir a la carcinogénesis cervical (Newfield *et al.*, 1998). Los metabolitos de estrógeno, como la 16 α -estrona es altamente estrogénico (Induce la proliferación epitelial) y se ha demostrado ser tumorigénico en ratones, mientras que la 2-hidroxiestrona se ha asociado con una disminución del riesgo de cáncer así como un efecto antiproliferativo. La 16 α -hidroxiestrona se une covalentemente a los receptores de estrógeno (RE), prolongando así el efecto del estrógeno (Gariglio *et al.*, 2009).

La sobreexpresión de la aromatasa, un posible cofactor etiológico en los cánceres sensibles a las hormonas, se sabe que aumenta la actividad de los estrógenos en tejido de mama (Santner *et al.*, 1997). Se informó que el 35% de CaCu en humanos expresan aromatasa, sin embargo, se detectó su expresión en muestras de tejidos cervicales precancerosos o normales. La sobreexpresión induce la expresión de la

Ciclina D1, del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) y oncogenes de HPV (Gariglio *et al.*, 2009).

Por lo tanto, es posible que los niveles elevados de estrógenos (E₂ o 16 α -hidroxi-estrone) así como los niveles elevados de la aromatasa puedan ser los primeros eventos en el desarrollo de neoplasia cérvico-vaginal en los seres humanos, suponiendo que los niveles de RE suficientes están presentes en las células madre de la Zona de Transformación (Gariglio *et al.*, 2009).

2.5 Los estrógenos sobre regulan a E6 / E7 en células de cáncer cervical

La estimulación del crecimiento mediada por estrógenos de las células CaCu HR-HPV-positivos por estrógeno parece estar relacionada con el aumento de la expresión de los genes de E6 y E7. Por ejemplo, en células SiHa el E₂ estimula el crecimiento y la transcripción de oncogenes virales E6/E7. La expresión del oncogén viral a través de HPV16-LCR se sobre regula de 2 a 3 veces bajo tratamiento con 10⁻⁷ M de estriol, E₂, y varias progestinas incluyendo pregnenolona, 17 α -hidroxi-progesterona, noretinodrel y acetato de ciproterona (Gariglio *et al.*, 2009).

2.6 miRNAs

Los miRNAs son RNAs monocatenarios constituidos por alrededor de 21-23 nucleótidos. Son considerados RNAs no codificantes, que pueden inhibir la expresión de genes a través de la represión transcripcional y degradación de mRNA

canónico. Los miRNAs están presentes en animales, plantas y eucariotas unicelulares (Pedroza *et al.*, 2014).

Los miRNAs pueden secretarse de las células, estar presentes en la circulación o ser absorbidos por otras células. La presencia de miRNAs circulantes se ha demostrado en diversas enfermedades, y los perfiles varían con el grado de progresión de la enfermedad. Dado que los miRNAs desprotegidos son sensibles a la degradación por RNasas presentes en la sangre, se cree que los miRNA circulantes existentes están empaquetados en microvesículas, exosomas y cuerpos apoptóticos o unidos a proteínas de unión a RNA tales como argonauta 2 o complejos de lipoproteínas, y son por lo tanto altamente estables. Recientemente ha surgido evidencia de que los miRNAs circulantes se derivan directamente del tejido tumoral, por lo que se correlacionan con la progresión y recurrencia del tumor. La circulación de miRNAs en muestras de sangre podría ser una herramienta de diagnóstico para pacientes con cáncer (Faenza *et al.*, 2017).

2.7 Biogénesis de los miRNAs

La biosíntesis de los miRNAs involucra la generación de transcripciones largas en forma de horquilla por la RNA polimerasa II (RNA pol II); los genes miRNA se transcriben inicialmente para producir una primera transcripción larga que se somete a procesamiento sucesivo tanto en el núcleo como en el citoplasma por una ribonucleasa tipo III conocida como DROSHA (en el núcleo) y DICER (en el citoplasma) (Pedroza *et al.*, 2014). Diversos genes de miRNAs están localizados en regiones no codificantes intergénicas pero también pueden ser encontrados dentro de regiones exónicas e intrónicas, en cualquier orientación sentido o antisentido y además pueden ser transcritas independientemente a partir de sus propios

promotores. Los miRNAs que se encuentran dentro de regiones intrónicas de proteínas codificantes o genes no codificantes (pseudo-genes) han sido denominados “mirtrons” (Pedroza *et al.*, 2014). Los miRNAs son agrupados en familias dependiendo de la similitud en su secuencia y su función y pueden ser encontrados como unidades solas u organizados en racimos en el genoma. Ha sido estimado que un solo miRNA puede regular negativamente cientos o inclusive miles de genes diana. Sin embargo la función y dianas celulares de la mayoría de los miRNAs queda por determinar (Pedroza *et al.*, 2014). La vía canónica de la biogénesis de miRNA es iniciada por la RNA pol II; produciendo un transcrito largo primario llamado miRNA primario (pri-miRNA) (Pedroza *et al.*, 2014). Los miRNAs son transcritos de una unidad de transcripción simple como un pri-miRNA policistrónico. Los pri-miRNAs se parecen a un mRNA canónico, debido a que ambos tienen estructura 5'-cap (7MGpppG) así como colas poliadeniladas (poli A) 3' (Pedroza *et al.*, 2014). Después de sintetizados los pri-miRNAs son transportados al citoplasma, ahí son procesados por otra enzima RNAsa III conocida como DICER (“dicing process”); que en coordinación con la proteína dsRNA-binding TRBP2, corta fuera de la horquilla y genera una doble cadena de RNA formada por una guía (miRNA) y una cadena transitoria (miRNA) la cual es degradada por la proteína Argonata 2 (AGO2), requerida para el silenciamiento inducido por genes miRNA. Dicer, proteínas AGO y miRNA maduro al unirse dan lugar a la creación de un “miRNA-induced silencing complex” (miRISC), que actúa como una guía para entregar el complejo a un mRNA diana. Entonces el microRNA maduro hibrida a un sitio complementario en la región 3' sin traducir (3' UTR) de un mRNA diana (Pedroza *et al.*, 2014).

Los miRNA controlan la expresión génica y regulan una amplia gama de procesos biológicos dirigiéndose a los RNA mensajeros (mRNA) e induciendo la represión traduccional o la degradación del RNA. Algunos miRNAs muestran una complementariedad clara con su mRNA diana y conducen a su degradación (Faenza *et al.*, 2017). Los miRNA maduros regulan negativamente la expresión génica por complementariedad entre un miRNA dado y su gen diana; sin embargo, el mecanismo involucrado depende del nivel de complementariedad entre el miRNA y su mRNA diana. El silenciamiento génico puede lograrse mediante la degradación o inhibición de la traducción del mRNA. La represión traduccional de las transcripciones se produce cuando los miRNA se unen a sus blancos con una complementariedad imperfecta, Esta interacción imperfecta de miRNA: mRNA significa que un solo miRNA puede potencialmente centrarse en decenas o cientos de mRNA. Cuando un miRNA se une a sus dianas de mRNA con una alta complementariedad, la degradación del mensajero se induce con la participación del complejo RISC (Pedroza *et al.*, 2014).

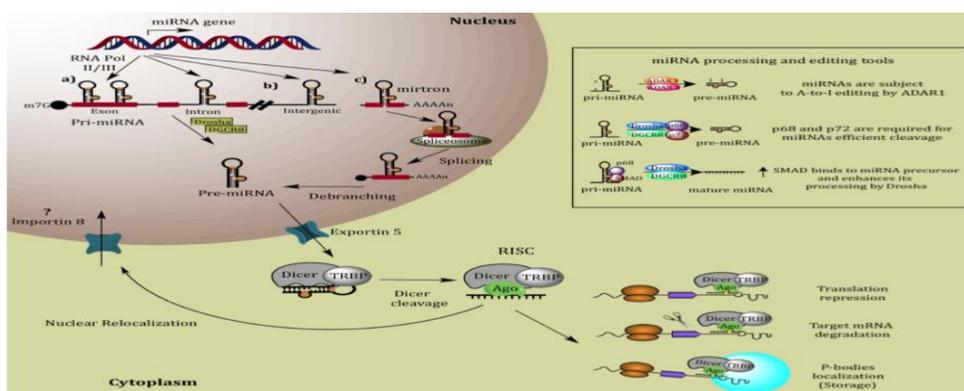


Figura 5. Biogénesis de los miRNAs. Fuente: Pedroza, *et al.* 2014.

2.8 Modelos no transgénicos asociados a cáncer por HPV

En 1966 se seleccionaron dos cepas de ratones no transgénicos (CCH/N y HSFR/N) para la sensibilidad y resistencia, respectivamente, para probar la histamina después de la vacunación contra la tosferina. A principios de la década de 1970 un grupo de ratones de la octava generación endogámica de HSFS/N fueron encontrados para llevar el alelo *Fv1^b* para la sensibilidad a la cepa B del virus de la leucemia. Los ratones homocigotos fueron endogámicos para la cepa FvB/n, sin una selección adicional para la sensibilidad de histamina (<http://www.informatics.jax.org/>)

La cepa es útil para la producción de ratones transgénicos en un fondo genético totalmente endogámico, tienen un rendimiento reproductivo vigoroso con grandes camadas. La cepa ha sido descrita en al menos 44 marcadores loci en 15 cromosomas (<http://www.informatics.jax.org/>)

2.9 Modelos de ratones transgénicos asociados a cáncer por HPV

La actividad de los oncogenes E6 y E7 ha sido estudiada *in vivo* a través de la generación y caracterización de ratones transgénicos E6 y E7. Cuando se expresan en varios tejidos por diferentes promotores transcripcionales, E6 y E7 juntos pueden inducir varios tipos de tumores, (Song *et al.*, 2000). Para definir el papel individual de E6 y E7 en la carcinogénesis cervical se generaron ratones transgénicos E6 (K14E6) y E7 (K14E7) en el que cada gen fue dirigido en su expresión a los epitelios usando el promotor transcripcional de la queratina 14 humana (hK14) (Song *et al.*, 2000). E6 y E7 puede inducir hiperplasia en la piel y tumores en la piel. Sin embargo, el espectro de tumores aparecido derivado de ratones transgénicos E6 y E7 ha diferido. E6 primero induce tumores malignos, mientras que E7 primero induce

tumores benignos en la piel (Song *et al.*, 2000). Sobre la base de estas observaciones, planteamos la hipótesis que E6 y E7 juegan distintos papeles en la carcinogénesis por HPV. Para determinar cómo contribuye E6 y E7 en la carcinogénesis inducida por el HPV, estudiaron E6 y E7 en el contexto de un modelo multietapa para carcinogénesis en la piel en el cual el proceso de carcinogénesis es dividido en tres etapas: iniciación, promoción y progresión (Song *et al.*, 2000). El HPV16 E7 oncoproteína y E2 son factores importantes para la inducción de lesiones premalignas y cáncer de cuello uterino (Cortés *et al.*, 2013).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la expresión de miR-210 en ratones transgénicos y no transgénicos se trabajó bajo un esquema que se compone de 4 grupos de ratones, formados de la siguiente manera; dos grupos de ratones K14E7, uno tratado con E2 y uno sin tratar; de igual manera, dos grupos de ratones FvB/n, uno tratado con E2 y uno sin tratar, los tratamientos se administraron a partir de 1.5 mes de edad una sola dosis de 833 ng/ml por 24 horas.

La determinación de los niveles de expresión de miR-210 en cérvix de ratones K14E7 y FvB/n tratados y sin tratar con hormonas se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) utilizando sondas Taqman.

3.1 Características y propagación de ratones transgénicos HPV16 K14E7

La construcción de los ratones transgénicos HPV16 (K14E7) bajo el promotor de la citoqueratina humana 14 (K14), la propagación de estos ratones, la expresión de los oncogenes virales y su fenotipo han sido previamente descritos (Arbeit *et al.*, 1996; Herber *et al.*, 1996). Estos ratones han sido desarrollados por el grupo del Dr.

Paul F. Lambert (McArdle Laboratory of Research, University of Wisconsin Medical School, USA). El transgén está compuesto por un promotor de 2 kilobases de la citoqueratina humana 14, el cual regula la expresión de la región temprana E7 del HPV16, los ratones utilizados para este estudio tienen un fondo genético correspondiente a la cepa FvB/n. Este fondo ha mostrado ser permisivo para la carcinogénesis (Hennings *et al.*, 1993).

3.2 Fenotipo de ratones K14E7 y ratones FvB/n

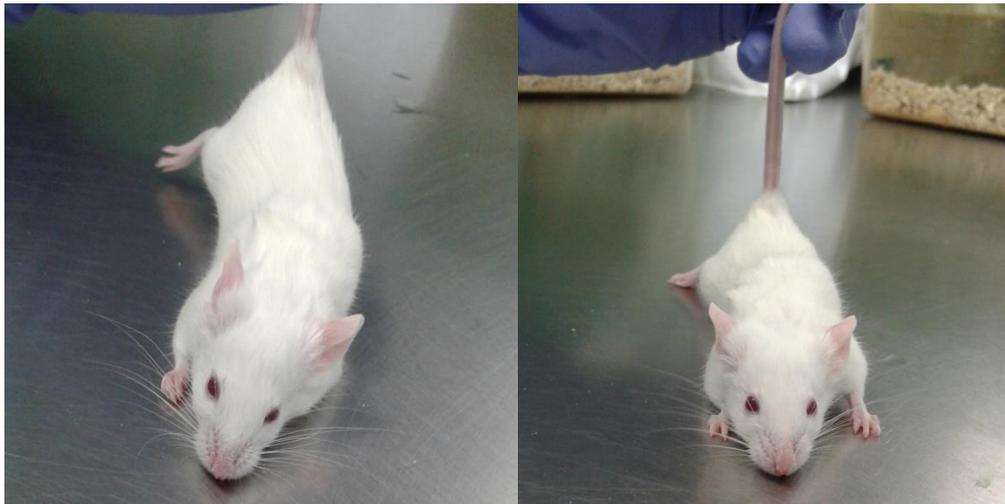


Figura 6. Fenotipo de ratones FvB/n.

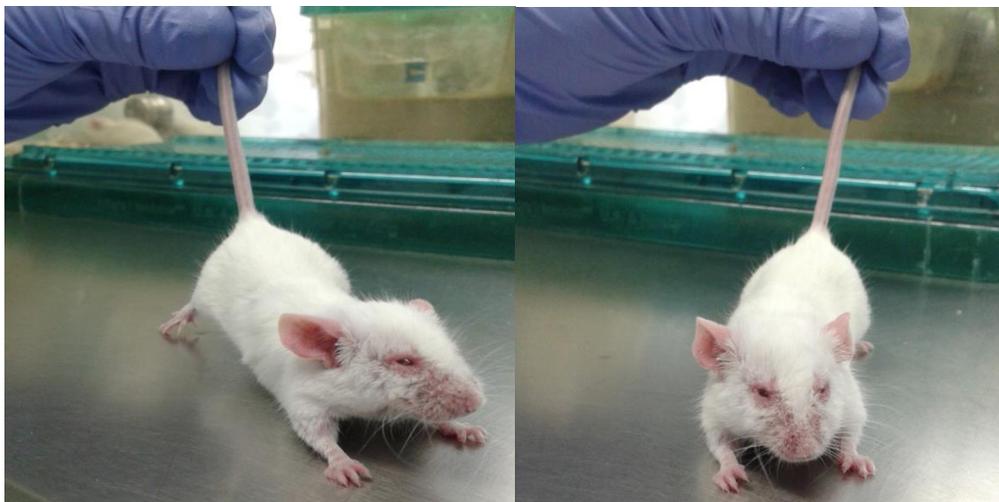


Figura 7. Fenotipo de ratones K14E7.

Como se observa en las figuras anteriores los ratones FvB/n muestran mejor pelaje, ojos rojos, piel delgada y promedio de vida mayor; mientras que el fenotipo de los K14E7 es totalmente lo contrario, éstos muestran cataratas en los ojos, el pelaje más opaco y escaso, piel de orejas y nariz engrosada y además un promedio de vida menor.

Los animales fueron mantenidos en la UPEAL-CINVESTAV-IPN, México de acuerdo con los estándares de la AAALAC ("Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International"). Todos los experimentos y procedimientos fueron aprobados por el Comité de Investigación de la UPEAL (UPEAL-CINVESTAV-IPN, México; NOM-062-ZOO-1999).

3.3 Tratamiento hormonal

Ratones hembra vírgenes controles y transgénicos, de 1.5 meses de edad en etapa Diestro, fueron tratadas por vía intraperitoneal con una dosis única de 833 ng de E₂ (Sigma-Aldrich, USA) en una suspensión utilizando aceite de ajonjolí estéril. Como controles se utilizaron ratones FvB/n y K14E7 sin tratar con estrógenos.

3.4 Análisis Histopatológico de Tejidos y Tumores

Todos los tejidos cervicales provenientes de los ratones mencionados, fueron cuidadosamente analizados por un patólogo experto (Dr. Rogelio Hernández; ICMNSZ-SS). Después de una tinción con Hematoxilina-Eosina, se determinó la existencia de alteraciones morfológicas como condiciones pre neoplásicas y características histopatológicas del cérvix (hiperplasia, cistitis quística, grados de atipia del epitelio, infiltrado inflamatorio, etc.).

3.5 Detección de la proteína PCNA como marcador de proliferación celular en tejido cervical de ratones mediante Inmunohistoquímica

Como criterio de proliferación celular se detectó el marcador de proliferación PCNA mediante ensayos de inmunohistoquímica (Ocadiz *et al.*, 2012; Nava *et al.* 2016). Se realizaron cortes de 5 micras a partir de los tejidos incluidos en parafina, para posteriormente fijarlas en portaobjetos. Para esta determinación se utilizó el kit provisto por la compañía BioSB (USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de bloquear los sitios inespecíficos, los tejidos se incubaron con el anticuerpo monoclonal que reconoce a PCNA (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.). Se identificó la unión del anticuerpo primario por medio de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. Finalmente, la proteína fue detectada por medio de una reacción colorida (Elias *et al.*, 1989; Ocadiz *et al.*, 2012). Todas las laminillas fueron analizadas digitalmente (Image ProPlus ver 4.5, U.S.A.).

3.6 Aislamiento y purificación de RNA total

El RNA total fue aislado y purificado a partir de tejido cervical murino utilizando el reactivo TRIzol de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, USA), las muestras se cuantificaron por espectrofotometría en un equipo MBA 2000 adquirido de la compañía Perkin Elmer.

3.7 Rendimiento de RNA

Las muestras de RNA proporcionaron una concentración promedio de 100-6400 ng/ μ l.

		CUANTIFICACION DE RNA	
	RATON	CICLO ESTRAL	CANTIDAD DE RNA
1	FVB	DIESTRO	2140 ng/ μ
2	FVB	DIESTRO	1960 ng/ μ
3	FVB	ESTRO	2400 ng/ μ
4	FVB	ESTRO	4850 ng/ μ
5	FVB	INDUCIDO	5420 ng/ μ
6	FVB	INDUCIDO	124 ng/ μ
7	E7	DIESTRO	2690 ng/ μ
8	E7	DIESTRO	2750 ng/ μ
9	E7	ESTRO	158 ng/ μ
10	E7	ESTRO	6440 ng/ μ
11	E7	INDUCIDO	2550 ng/ μ
12	E7	INDUCIDO	2160 ng/ μ

Cuadro 2. Cuantificación de RNA.

3.8 Síntesis de cDNA para el análisis cuantitativo por RT-PCR en Tiempo Real (RTqPCR)

Para la síntesis de cDNA se utilizaron tres microgramos de RNA total en una reacción de 20 μ l (volumen final): La mezcla de reacción contenía buffer 5X para síntesis de la primera cadena [Tris-HCl 250 mM (pH 8.3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM], dNTPs 0.5 mM, ditiotreitól 5 mM, 15 U de inhibidor de RNasas (Invitrogen, USA), 2.5 μ g de oligo(dT)₁₂₋₁₈ y 100 U de la retrotranscriptasa SuperScript II. La reacción se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del fabricante con modificaciones menores (2 horas a 42°C; Invitrogen, USA).

PCR		
Transcripción reversa		
Hold	Hold	40 Ciclos
30 min a 48°C	10 min a 95 °C	Desnaturalización 15/seg a 95°C. Hibridación 1 min a 60°C.

Cuadro 3. Condiciones para síntesis de cDNA.

3.9 Cuantificación relativa del mRNA de Bcl-2 mediante RTqPCR.

La cuantificación relativa de Bcl-2, uno de los mRNA blanco de miR-210, fue llevada a cabo mediante RTqPCR utilizando un equipo 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Los primers fueron diseñados para reconocer secuencias intrónicas y fueron sintetizados por la empresa Invitrogen (USA) (Ocádiz, *et al.* 2012). Se realizó la amplificación en condiciones óptimas para la amplificación de cada secuencia utilizando el kit de amplificación SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) (Ocádiz *et al.*, 2012). Para una reacción de 25 µl se utilizaron 12.5 µg de la mezcla de SYBR Green la cual contenía: 1.25 U de Taq ADN polimerasa, buffer de reacción, mezcla de dNTPS y MgCl₂ 1 mM (concentración final), colorante SYBR Green, 0.5 mM de cada primer, 1 µg de templado (cADN) y agua ultrapura. Todos los ensayos se realizaron por duplicado en una sola corrida. Para normalizar las diferencias entre la cantidad de cADN añadido a las reacciones, se utilizaron los niveles de expresión del gen constitutivo HPRT.

PCR		
Desnaturalización	Alineación/Amplificación	Elogación
95° C	60°C	72°c
15 seg.	60 seg.	10 seg.

Cuadro 4. Condiciones para determinar los niveles de expresión (mRNA) de Bcl-2 mediante RTqPCR.

Bcl-2	S-ttcagagcccaggcaccatg
	AS-gaatctgtttgctctcatc

Cuadro 5. Primers usados para la expresión de Bcl-2

3.3.1 Análisis de miR-210 y SNO202 por PCR Cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR)

La cuantificación relativa de miR-210 y SNO202 (miRNA control de expresión constitutiva) fue llevada a cabo mediante RT-qPCR, utilizando un equipo StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Previamente se habían establecido las condiciones óptimas para la amplificación de cada secuencia utilizando el kit de amplificación “TaqMan miRNA PCR Master Mix”, mediante una curva de estandarización. Los primers y sondas de miR-15b y SNO202 para los ensayos TaqMan miRNA se adquirieron en la compañía Applied Biosystems (www.lifetechnologies.com). La cuantificación de la expresión de miR-15b y SNO202 se calculó por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
30	16
30	42
5	85
∞	4

Cuadro 6. Condiciones para la síntesis de la cDNA para miR-210 y SNO202

miR-210	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
Stem-loop	ACCCGGCAGUGCCUCCAGGCGCAGGGCAGCCCCUGC CCACCGCACACUGCGCU
Sequence	AGACCCACUGUGCGUGUGACAGCGGCUGAUCUGUGC CUGGGCAGCGCGACCC
SNORNA202	GCTGTACTGACTTGATGAAAGTACTTTTGAACCCTTTTC
Control sequence	CATCTGATG

Cuadro 7. Primers usados para la expresión de miR-210 y SNO202.

PCR		
Desnaturalización	Alineación/Amplificación	Elogación
95° C	60°C	72°c
15 seg.	60 seg.	10 seg.

Cuadro 8. Condiciones para la RT-qPCR a 40 ciclos de amplificación.

4. RESULTADOS

Los siguientes resultados muestran el efecto de la oncoproteína E7 y el 17β -estradiol en ratones de 1.5 meses de edad

Tratamiento hormonal de ratones

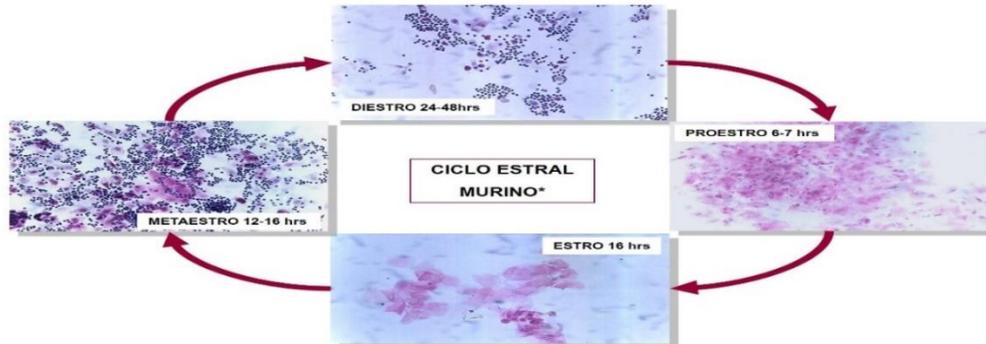


Figura 8. Análisis citológico de células epiteliales del ciclo estral murino.

En la figura 8 podemos observar que en etapa de estro podemos ver una cantidad de células epiteliales queratinizadas (escamas sin núcleo) debido a la regeneración de células, metaestro podemos observar muchos polimorfonucleares, en diestro hay menos polimorfonucleares y en proestro habrá una cantidad de células nucleadas.

Análisis citológico de células epiteliales en ratones control.

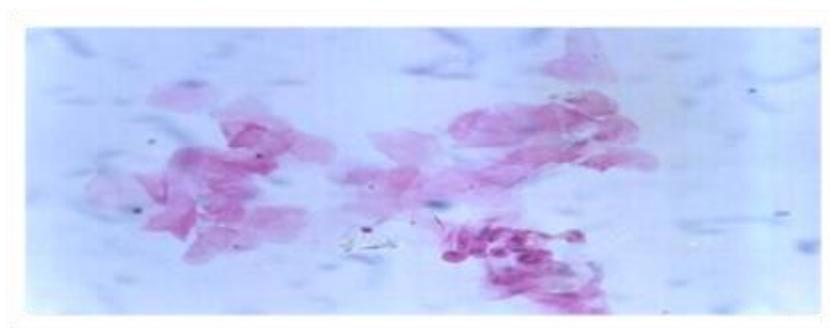


Figura 9. Determinación en etapa de estro, del ciclo estral mediante citología. Amplificación 40X.

La Figura 9. Muestra cómo se observan las células epiteliales, en etapa estro del ciclo estral. Se tienen células grandes sin núcleo, donde ya no hay células polimorfonucleares. Las células grandes sin núcleo son todas las células que se están regenerando en el epitelio, entonces se verán como una capa de escama por el cambio que están sufriendo las células y podremos encontrar incremento de células polimorfonucleares en proestro.

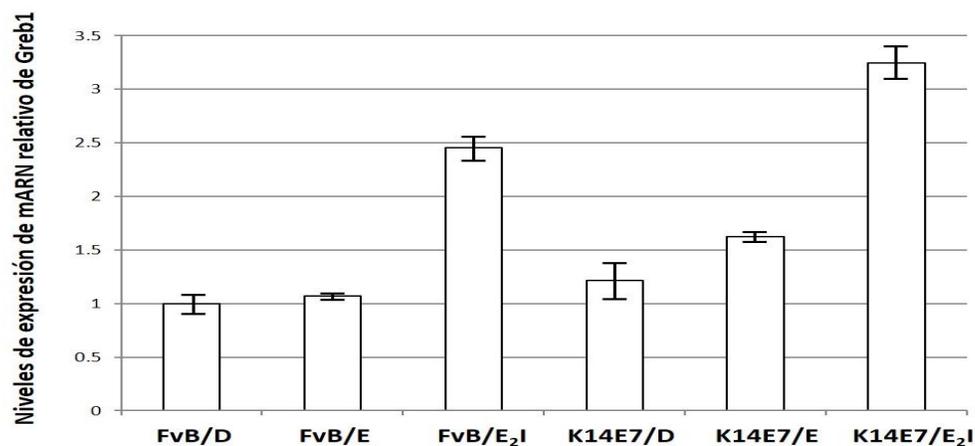


Figura 10. Expresión relativa de Greb1 (gen sensible a E2) en el cuello uterino de ratones de 1,5 meses después de la inducción hormonal a corto plazo. D: Diestro; E: Estro; E2I: 24 h inducido por E₂. Los resultados sugieren una alta correlación entre la expresión de Greb1 y el entorno hormonal. El experimento se realizó al menos por triplicado.

La Figura 10. Muestra la tendencia de expresión de Greb1 que es nuestro control que muestra que todo nuestro tratamiento fue correcto. Podemos observar que en ratones FvB inducidos con la hormona hay una expresión alta de Greb1 en comparación con los que están en etapa de diestro y estro esto es ratones FvB. En ratones K147 podemos observar que hay una sobre expresión muy alta en comparación con ratones FvB/n.

Resultados del análisis de histopatológico en ratones de 1.5 meses de edad.

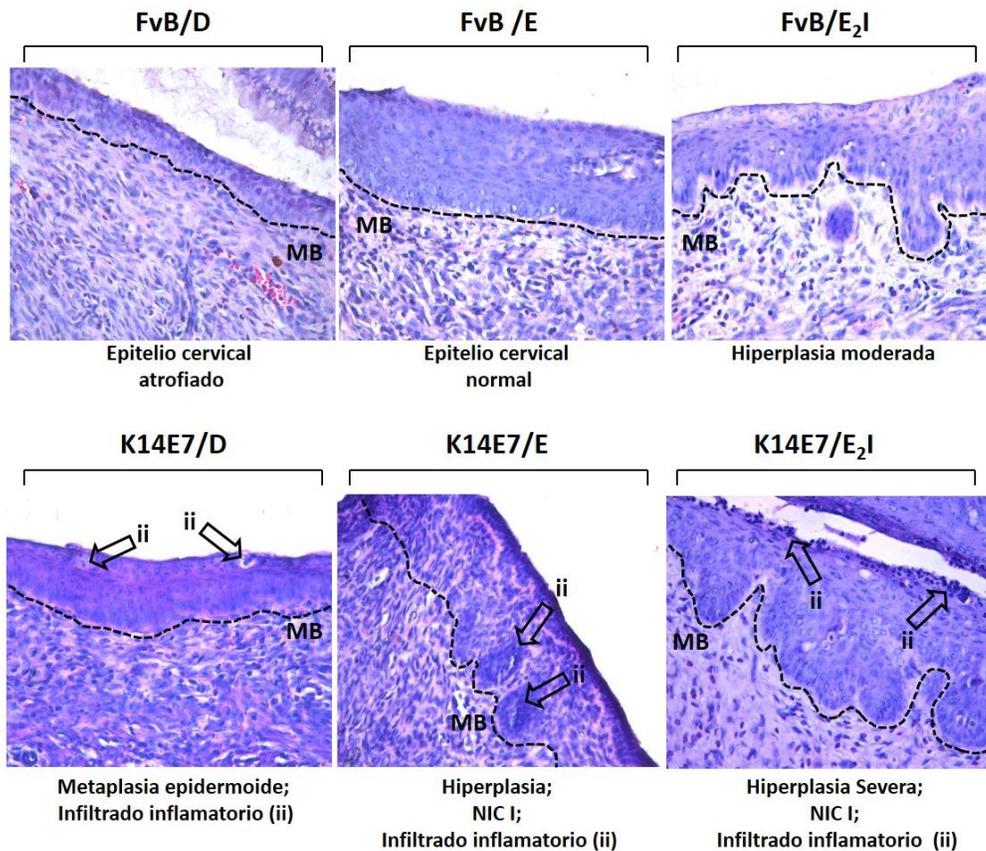


Figura 11. Características histopatológicas del tejido cervical obtenidas de ratones de 1.5 meses de edad antes y después de la inducción hormonal a corto plazo. Exocérnix. D: Diestro; E: Estro; E₂I: Estro inducido por 24 h E₂; ii: infiltrado inflamatorio. Tinción con hematoxilina-eosina. Amplificación: 40X. Para ratones en diestro e inducida por E₂ = 3. Para ratones en estro = 12.

En la Figura 11. Podemos observar diferentes características histológicas en ratones FvB/n en etapa de diestro podemos ver un epitelio normal, en etapa de estro vemos un epitelio normal por la cantidad de células que se están en constante regeneración y en el ratón inducido con (E₂) hay una hiperplasia moderada. En

ratones K14E7 podemos ver que hay una metaplasia epidermoide y un infiltrado inflamatorio esto se debe a que el ratón transgénico es portador del gen E7, en el K14E7 en etapa de estro encontramos una hiperplasia e infiltrado inflamatorio, en el ratón K14E7 inducido con E₂ podemos ver una hiperplasia severa además de un infiltrado inflamatorio por lo que esto sugiere que una dosis exógena de estrógenos en etapas tempranas hay daño a la homeostasis del epitelio. En forma importante, el tratamiento con hormona exógena sugiere el desarrollo de NIC1 en el ratón K14E7.

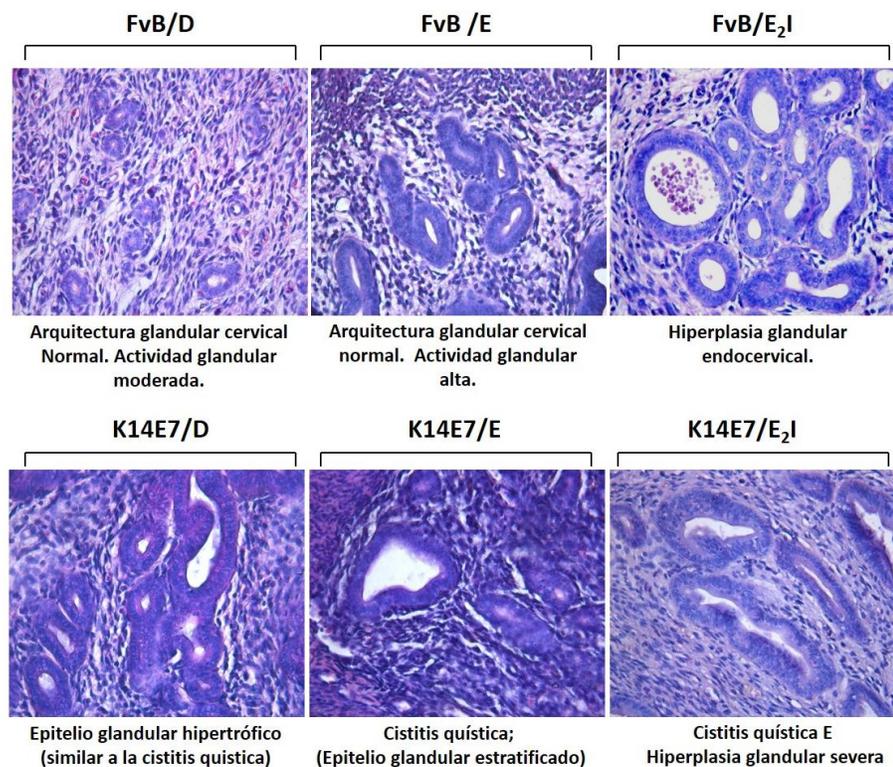


Figura 12. Características histopatológicas del tejido cervical obtenidas de ratones de 1.5 meses de edad antes y después de la inducción hormonal a corto plazo. Endocérvix. D: Diestro; E: Estro; E2I: Estro inducido por 24 h E₂;

ii: infiltrado inflamatorio. Tinción con hematoxilina-eosina. Amplificación: 40X. Para ratones en diestro e inducida por E2 = 3. Para ratones en estro = 12.

En la Figura 12. Ratones FvB/n y ratones K14E7, se muestran las alteraciones histológicas inducidas por el entorno hormonal en el endocérnix. Se observan alteraciones en la arquitectura de la glándula cervical siendo moderado en los ratones silvestres mientras que en los ratones transgénicos es mucho más marcado (cistitis quística e hiperplasia glandular severa).

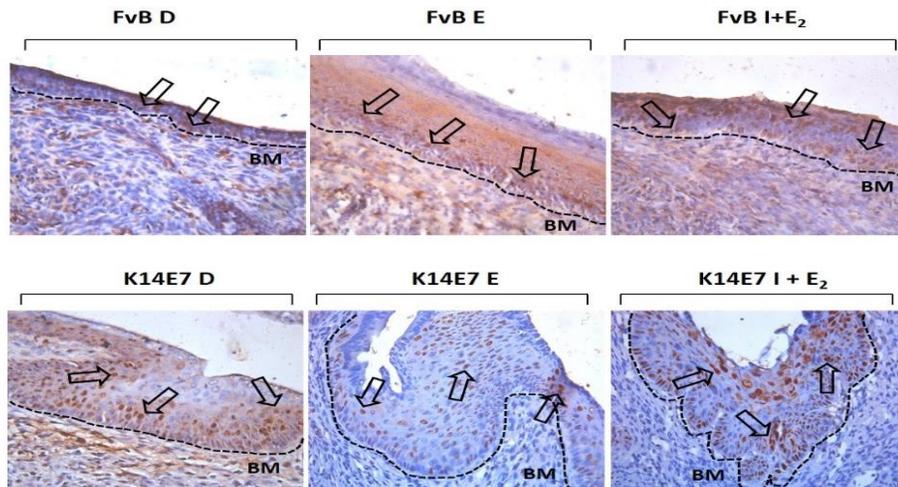


Figura 13. Detección del marcador de proliferación celular PCNA mediante inmunohistoquímica en cervix de ratones de 1.5 meses antes y después de la inducción hormonal a corto plazo. Las flechas vacías ejemplifican la señal nuclear de la proteína PCNA (coloración café-rojiza). D: Diestro; E: Estro; E2I: Estrógeno inducido por 24 h 17β-estradiol. Amplificación: 40X. Para ratones en diestro e inducida por E2 = 3. Para ratones en estro = 12.

En la Figura 13 se observa que los ratones K14E7 tratados hormonalmente muestran el mayor nivel de proliferación celular en comparación con los ratones FvB/n (silvestres).

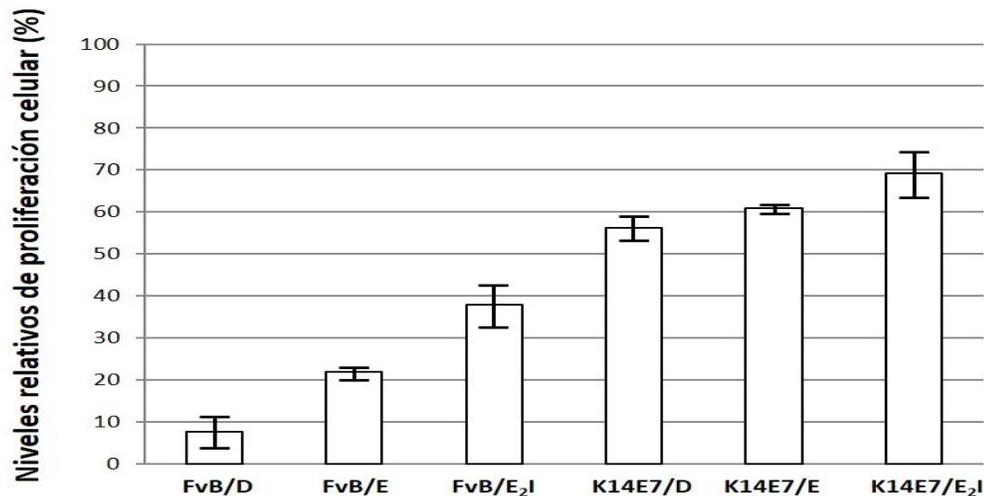


Figura 14. Niveles relativos de proliferación celular (PCNA) en el cuello uterino obtenido de ratones de 1.5 meses de edad. D: Diestro; E: Estro; E2I: 24 h 17b Estrógeno inducido por estradiol. Para ratones en diestro e inducida por E₂ = 3. Para ratones en estro. El experimento se realizó al menos por triplicado.

La gráfica 14. Niveles relativos de proliferación celular, en esta grafica podemos observar que en ratones FvB en estro en comparación con los ratones FvB en diestro hay un ligero aumento de proliferación celular, donde podemos observar mayor aumento del nivel de expresión de proliferación celular es en FvB inducidos con E₂ esto es ratones FvB. En ratones K14E7 en etapa de diestro hay mayor aumento, pero en ratones K14E7 en estro se nota un ligero aumento, pero en el

ratón inducido con la horma hay una sobreexpresión mucho mayor de proliferación celular en comparación con los ratones FvB/n.

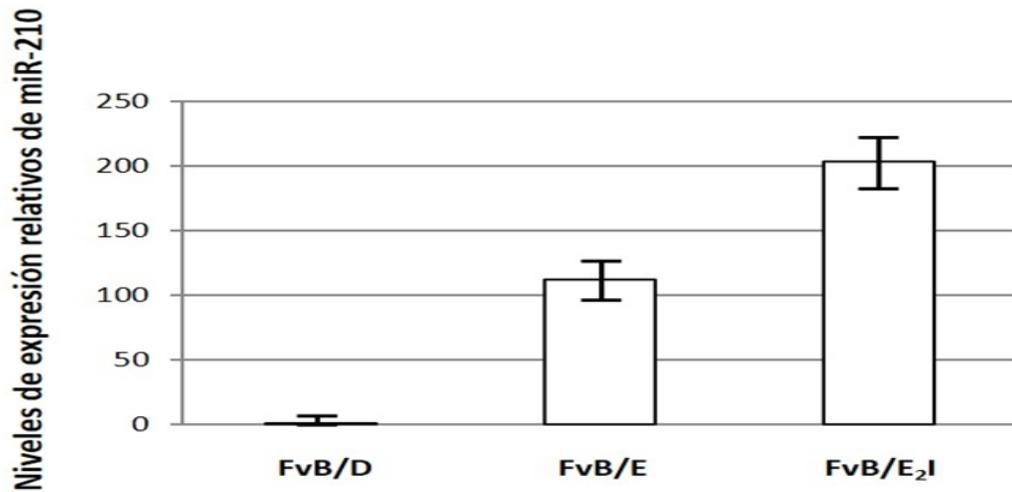


Figura 15. Niveles de expresión de miR-210 en ratones de 1.5 meses de edad.

Como podemos observar figura 15 que en ratones FvB en estro hay un aumento de expresión de miR-210 en comparación con ratones FvB en diestro que es mi control, pero en ratones FvB inducidos con hormona hay una sobre expresión mucho mayor de miR-210.

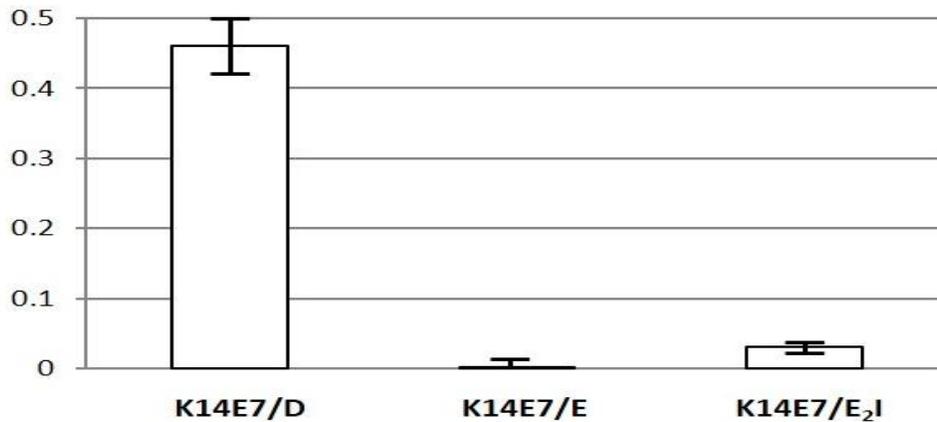


Figura 16. Niveles de expresión de miR-210 de 1.5 meses de edad.

Como podemos observar en la figura 16 es lo contrario a la figura 14, aquí los niveles de expresión en ratones K14E7 en diestro el nivel de expresión de miR-210 es muy bajo, en el ratón K14E7/E vemos que disminuye drásticamente la expresión de miR-210, en el ratón K14E7 inducido vemos que quiere aumentar su expresión pero es un mínimo no es tan notorio en comparación con el ratón K14E7 en diestro.

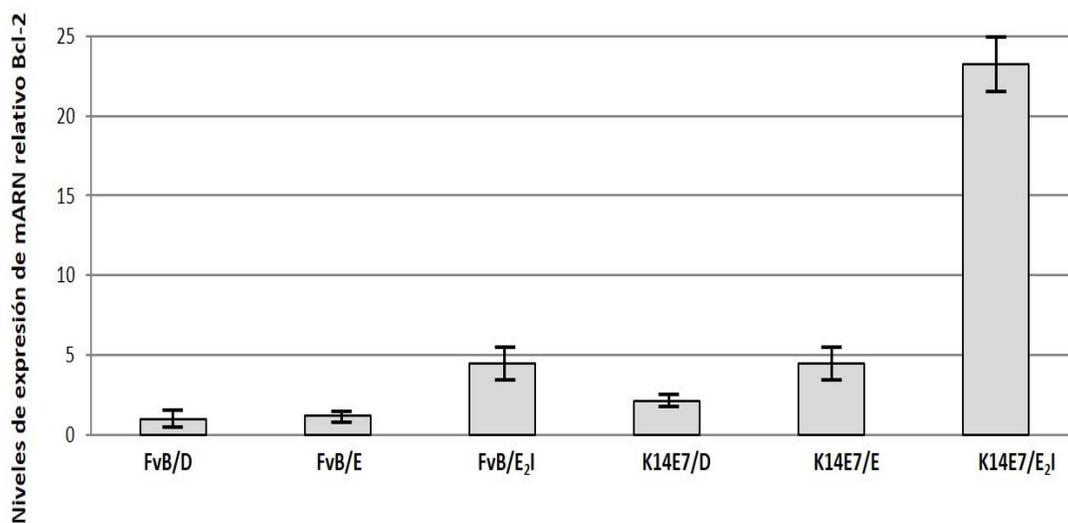


Figura 17. Niveles de expresión de mRNA relativo a Bcl-2

Podemos ver que en la figura 17 en ratones FvB inducidos hormonalmente hay un aumento de la expresión de Bcl-2, en ratones K14E7 en estro hay un aumento en comparación con el ratón FvB inducido casi es muy similar entre estos dos, pero en ratones K14E7 inducidos hay una sobre expresión mayor de Bcl-2 comparación con los demás ratones.

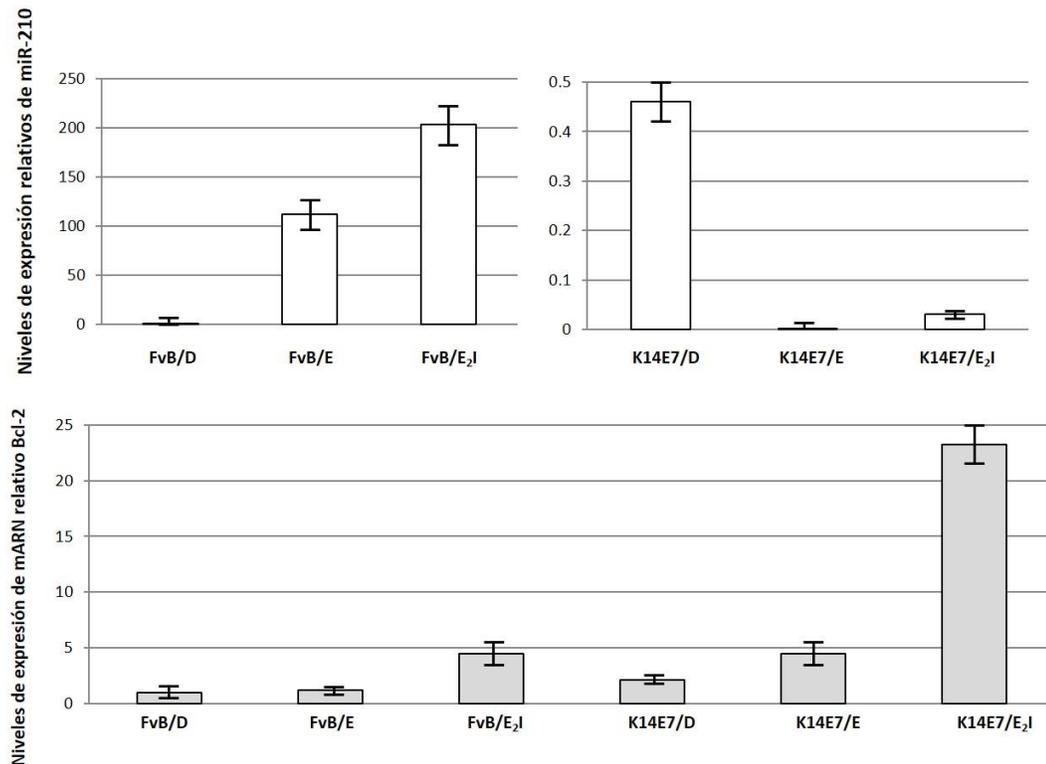


Figura 18. Comparación de los niveles de expresión de miR-210 y Bcl-2.

Podemos observar que en la figura 18 en ratones FvB/E hay un incremento de miR-210 pero se mantiene el nivel de Bcl-2, en ratones FvB inducidos hay una mayor expresión de miR-210, en ratones FvB inducidos solo incremento 4 veces la expresión de Bcl-2. En ratones K14E7 en estro miR-210 disminuye su expresión drásticamente y en ratones K14E7 en estro Bcl-2 aumenta en forma similar al ratón

FvB inducido. En K14E7 inducidos a pesar del tratamiento con estradiol miR-210 mostro niveles muy bajos de expresión, permitiendo que Bcl-2 se sobre exprese.

Comportamiento de miR-210 a los 1.5 meses de edad bajo el efecto de la oncoproteína E7 y el E₂ podría existir una correlación entre ambas, sería cuestión realizar una investigación a fondo para observar que correlación hay entre ambas.

5. DISCUSIÓN

Las diferencias en los perfiles de miRNAs entre las células normales y las células cancerosas han sido identificadas en varios tipos de cáncer (Myklebust, 2011). Los cambios en el genoma que conduce al cáncer, por ejemplo, mutaciones, deleciones, inserciones o amplificaciones, pueden resultar en alteraciones del perfil de expresión de uno o varios miRNAs produciendo células malignas llevándolas a cáncer, tal y como estudiamos en este trabajo. Ahora se sabe que las expresiones de los miRNAs están transcripcionalmente reguladas de manera similar a los genes codificantes de proteínas, por ejemplo, por factores de transcripción, como E2F, importantes para activar diversos mecanismos de proliferación celular. Previamente se ha demostrado que la oncoproteína E7 modifica la expresión de muchos genes por la inactivación de RB y liberación del factor de transcripción E2F (Münger y Howley, 2002). Otro factor importante se centra en el uso de hormonas en este modelo experimental. Esta inducción produjo cambios en el epitelio cervical encontrándose además que disminuyó la expresión de miR-210 presentando un efecto incluso mayor al de la oncoproteína E7 (ver Figura 17).

Según Gariglio *et al.*, (2009), los estrógenos estimulan la proliferación de epitelio escamoso estratificado del exocérvix, mientras que los progestágenos estimulan el epitelio columnar; además, bajo estimulación estrogénica, se desarrollan defectos

epiteliales en la superficie cervical externa. Con base en lo anterior, es posible que los estrógenos como el E₂ puedan ser los primeros factores en el desarrollo de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) tal y como se observa en las (Figuras 7) especialmente en los ratones FvB/n y E7 tratados, e incluso es posible que el daño del DNA inducido por metabolitos de estrógeno puede conducir a la carcinogénesis cervical.

Como se muestra en la Figura 9 los ratones control FvB/n y E7 se sacrificaron en etapa de estro, etapa en la cual se tienen células escamosas sin núcleo (células cornificadas), se sabe que en esta etapa existe acumulación de estrógenos y las células se encuentran en proliferación y diferenciación, lo cual favorece la expresión de algunos miRNAs como es el mir-210 de acuerdo a lo observado en el ratón FvB/n en Estro y después de la inducción.

Tomando en cuenta cada uno de estos factores, los estrógenos y la oncoproteína E7, así como un posible sinergismo entre ambos, los resultados obtenidos muestran que la expresión de miR-210 a los 1.5 meses de edad de tratamiento respectivamente, tiene diferencias significativas.

Bajo las mismas condiciones la dosis aplicada a los 1.5 meses de edad los resultados apoyan la hipótesis planteada en la cual la expresión de miR-210 se ve disminuida, con mayor prevalencia en los ratones inducidos con E₂, por las razones discutidas anteriormente.

6. CONCLUSIONES

Los ratones se trataron a los 1.5 meses de edad con una sola dosis de E2 durante 24 horas y se lograron obtener satisfactoriamente las muestras de cérvix así como la extracción y purificación de RNA de ratones de 1.5 meses de edad.

El tratamiento hormonal fue confirmado mediante la determinación de la expresión de Greb1, un gen que responde positivamente al E2.

Los niveles de expresión de miR-210 a los 1.5 meses de edad se vieron modificados, se observó un aumento en la expresión en los ratones control. Con los resultados obtenidos se plantea a miR-210 como un posible supresor tumoral, se propone que en etapas tempranas la oncoproteína E7 y el E2 se puede observar diversos cambios en ratones inducidos y entonces a mayor tiempo de exposición a la oncoproteína E7 y el E2 mayor será el avance del desarrollo de carcinogénesis cervical.

Por lo tanto se concluye que una vez realizada esta investigación y conociendo alguno de los daños provocados a nivel molecular por la oncoproteína E7 así como el uso indiscriminado de hormonas éstos pueden modificar la expresión de miRNAs involucrados en el control del ciclo celular. Finalmente, miR-210 y otros miRNAs podrían ser propuestos como posibles marcadores moleculares de diagnóstico temprano del CaCu así como posibles blancos terapéuticos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alvarez S. L. Cullinan A. Siwkowski A. Hampel A. DiPaolo J. 1998. Inhibition of HPV-16E6/E7 immortalization of normal keratinocytes by hairpin ribozymes. Proc. Natl. Acad. Sci., 1189-1194.
- Arbeit J. M. Howley P. M. Hanahan D. 1996. Chronic strogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. Proc. Natl Acad. Sci., 2930-2935.
- Bar I. Merhi A. Sater A. F. Addi B. A. Sollennita S. Canon L. J. Delree. 2017. The microRNA miR-210 is expressed by cáncer cells but also by the tumor microenvironment in triple-negative breast cáncer. Journal of histochemistry y cytochemistry. 16:335-346.
- Bedell M. A. Jones K. H. Laimins L. A. 1987. The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and Rat-1 cells . J. Virol, 3635-3640.
- Berezutskaya E. Bagchi S. 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26s proteosoma. J. Biol. Chem. (272):30135-30140.
- Bonilla V. W. Rotela F. V. Ortiz M. Y. 2017. Virus del papilloma humano/revisión. 1:72-76.
- Cortés M. E. Bonilla D. J. Díaz C. J. Hidalgo M. A., Romero C. S. Uren A. Celik H. McCormick M. Mungia M. J. A. Ibarra S. E. Escobar H. J. Lambert P. F. Mendoza V. D. Bermudez C. R. M. Gariglio P. 2013. Gene Expression Profile Regulated by the HPV16 E7 Oncoprotein and Estradiol in Cervical Tissue. *Virology*. 155-65.
- Coppola F. Nader A. Aguirre R. 2005. Metabolismo de los estrógenos endógenos y cáncer de mama. Rev Med Uruguay. 21:15-22

- Duggan K. M. Brown M. Stacey S. Stern P. 1998. Papillomavirus Vaccines. *Frontiers in Bioscience*, 1192-1208.
- Esquela K. A. Slack F.J. (2006). microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews/Cancer*. (6):259-69.
- Holly A. E. (1996). Cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer, and HPV. *Annual Reviews. Public Health*. 69-84.
- Elias J. M. Margiotta M. Gaborc D. 1989. Sensitivity and detection efficiency of the peroxidase antiperoxidase (PAP) Avidin-Biotin peroxidase complex (ABC), and peroxidase labeled avidin-biotin (LAB) methods. *AM J Clin Pathol* 92:62-67.
- Faenza I. Bavelloni A. Ramazzotti G. Poli A. Piazzini M. Focaccia E. Blalock W. 2017. MiRNA-210: A current overview/review. *Anticancer research*. 37: 6511-6521.
- Ferlay J. Shin H. Bray F. Forman D. Mathers C. Parkin D. 2008. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. *International Journal of Cancer*, 2993-2917.
- Gariglio, P., Gutiérrez, J., Cortés, E., & Vázquez, J. 2009. The Role of Retinoid Deficiency and Estrogens as Cofactors. *Archives of Medical Research*. 449-465.
- Ganguly P. Sen P. Ganguly N. 2017. Modulation of DNA methylation by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer/review. *Oncology letters*. 15: 11-22.
- Gulliver, G., Herber, R., Liem, A., Lambert, P. 1997. Both conserved region CR1 and CR2 of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene are required for induction of epidermal hyperplasia and tumor formation in transgenic mice. *J. Virol*.
- Guzmán R. L. Alcocer G. J. Madrid. M. V. 1998. Perspectivas para el Desarrollo de Vacunas e Inmunoterapia Contra el Cáncer Cervicouterino. *México: Salud Publica*. 1: 38-45.

- Herber, R., Liem, A., Pitot H. Lambert P. F. 1996. Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J. Virol.* 70, 1873-1881.
- Hennings H. Glick A. B. Lowry D. T. Krsmanovic L. S. Sly L. M. Yuspa S. H. 1993. FVB/N mice: An inbred strain sensitive to the chemical induction of squamous cell carcinomas in the skin. *Carcinogenesis.* 14:2353–2358.
- IARC (2008). World cancer report 2008. Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- Ibarra S. E. Díaz C. J. Cortés M. E. Uribe F. L. Hidalgo M. A. Lambert , P. Gariglio P. (2012). Differential Gene Expression Between Skin and Cervix Induced by the E7 Oncoprotein in a Trnsgenic Mouse Model. *Virology*, 337-45.
- Ibeanu A. O., 2011. Molecular pathogenesis of cervical cancer/review. *Cancer biology y therapy.* 295-306.
- Li Y. Wang F. Xu J. Ye F. Shen Y. Zhou J. Lu w. Wan X. Ma D. Xie X. (2011). Progressive miRNA Expression Profiles in Cervical Carcinogenesis and Identification of HPV-Related Target Genes for miR-29. *The Journal of Pathology*, 484-495.
- Lorio, M. V. Ferracin M. Liu C. G. Veronese A. Spizzo R. Sabbioni S. Magri E. Pedriali M. Campiglio M. Menard S. Palazzo J. P. Rosenberg A. Musiani P. Volinia S. Nenci I. Calin G. A. Querzoli P. Negrini M. Croce C. M. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 65, 7065–7070.
- Jeon S. Allen B. L. Lambert P. F. 1995. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Virol.* 2989-2997.

- Jinno H. Yoshinori O. Akira A. Koji U. 2018. Metabolomic analysis uncovered an association of serum phospholipid levels with estrogen-induced mammary tumors in female ACI/seg rats. *Toxicology letters*. 288: 65-70.
- Man S. (1998). Human Cellular Immune Responses Against Human Papillomaviruses in Cervical Neoplasia. Obtenido de <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>
- Mcintyre M. C. Frattini M. G. Grossman S. R. Laimins L. A. 1993. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact cys-x-y-cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J. Virol.* Vol. 67:3142-3150.
- Meschede W. Zumbach, K. Brespenning J. Scheffner M. Benitez B. L. Luande J. Gissmann L. Pawlita M. (1998). Antibodies against early proteins of human papillomavirus as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiology*, 475-80.
- Münger K. M Howley P. 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Research*. 213–228.
- Münger K. Baldwin A. Edwards K. M. Hayakawa H. Nguyen C. L. Owens M. Grace M. Huh K. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*, 11451-60.
- Muñoz N. Bosch F. X. 1997. Cervical evidence and perspectives for prevention cancer and human papillomavirus: epidemiologic. Mexico: *Salud publica*. Vol. 39 :274-282.
- Myklebust, M., Bruland, O., Fluge, O., Skarstein, A., Balteskard, L., & Dahl, O. (2011). MicroRNA-15b is induced with E2F-Controlled Genes in HPV-Related Cancer. *British Journal of Cancer*, 1719-1725.
- Nava O. J. Gómez G. Y. Ocadiz D. R. Garcia E. V. Bonilla D. J. Lagunas M. A. Olalla T. J. Lambert F. P. Garcia C. A. Gariglio P. 2016. The HPV16 E7 oncoprotein increases

the expression of Oct3/4 and stemness-related genes and augments cell selfrenewal. Vol. 499:230-242.

Newfield L. Bradlow H. L. Sepkovic D. W. Auborn K. 1998. Estrogen metabolism and the malignant potential of human papillomavirus immortalized keratinocytes. *Proc Soc Exp Biol Med*; 322-326.

Ocadiz-Delgado R. Castañeda S. E. Indra A. K. Hernandez P. R Flores G. P Cruz C. J. L. Recillas T. F. Pérez I. G. Covarrubias L. Gariglio P. 2012. RXR α deletion and E6E7 oncogene expression are sufficient to induce cervical malignant lesions in vivo. *Cancer Lett.* 317(2):226-36.

Pahel G. Aulabaugh A. Short S. Barnes J. Painter G. Ray P. Phelps W. C. 1993. Structural and functional characterization of the HPV16 E7 protein expressed in bacterial. *J. Bio. Chem.* Vol. 34: 26018-26025.

Peiyue J. Ying Y. 2013. Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*; 7: 3-7.

Pei X. F. 1996. The human papillomavirus E6/E7 genes induce discordant changes in the expression of cell growth regulatory proteins. *Carcinogenesis*.1395-1401.

Pedroza T. A. López. U. E. García C. V. Jacobo H. N. Herrera A. L. Peralta Z. O. López C. C. Cantú D. Fernández R. J. Cerna C. J. F. Pérez P. C. (2014). MicroRNAs in Cervical Cancer: Evidences for a miRNA Profile Deregulated by HPV and Its Impact on Radio-Resistance. *Molecules*, 6263-6281.

Santner S. J. Pauley R. J. Tait L. Kasetta J. Santen J. R. 1997. Aromatase activity and expression in breast cancer and benign breast tissue stromal cells. *J Clin endocrinol Metab.* 200-208.

- Song S. Liem A. Miller J. A. y Lambert P. F. 2000. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. *Virology*, 267:141-150.
- Steben, M., Duarte Franco, E. 2007. Human papillomavirus infection. Epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic Oncology*. 1-5
- Smotkin D. Wettstein F. O. 1987. The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J. Virol*, 1686-1689.
- Stirdivant S. M. Huber H. E. Patrick D. R. Defeo J. D. McAvoy E. M. Garsky V. M. Oliff A. Heimbrook D. C. 1992. Human papillomavirus type 16 E7 protein inhibits DNA binding by the retinoblastoma gene product. *Mol. Cell. Biol*, 1905-1914.
- Stoppler H. Hartmann D. P. Sherman L. Schlegel R. 1997. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity the maintenance of telomere length. *J. Biol. Chem.* Vol. 272:13332-13337.
- Storey, A. 1998. p53 allele predisposes to human papillomavirus-associated cancers. *Nature*. 4:325-325.
- Woodman C. B. Collins S. I. Young L. S. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature*, 11-22.
- zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature*, 342-50.

8. GLOSARIO

miRNA: Son ARN pequeños de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud que participan en la regulación de muchos procesos celulares y, su alteración está asociada con el desarrollo de diferentes patologías, especialmente cáncer.

Gen: El gen es la unidad física básica de la herencia. Los genes se transmiten de los padres a la descendencia y contienen la información necesaria para precisar sus rasgos. Los genes están dispuestos, uno tras otro, en estructuras llamadas cromosomas. Un cromosoma contiene una única molécula larga de ADN, sólo una parte de la cual corresponde a un gen individual

ADN: (ácido desoxirribonucleico) es el nombre químico de la molécula que contiene la información genética en todos los seres vivos.

ARN: El ácido ribonucleico (ARN) es una molécula similar a la de ADN. A diferencia del ADN, el ARN es de cadena sencilla.

Proteína: Son moléculas formadas por aminoácidos que están unidos por un tipo de enlaces conocidos como enlaces peptídicos.

Sobreexpresión: En el campo de la biología, elaboración de demasiadas copias de una proteína u otra sustancia. La sobreexpresión de ciertas proteínas u otras sustancias puede influir en la formación de un cáncer.

Oncogén: Gen que participa en el crecimiento de las células normales pero su forma ha tenido una mutación (cambio). Los oncogenes pueden hacer crecer las células cancerosas. Las mutaciones de los genes que se convierten en oncogenes pueden ser heredadas o pueden resultar de la exposición a sustancias del ambiente que causan cáncer.

Gen supresor tumoral: Un gen supresor de tumores dirige la producción de una proteína que es parte del sistema que regula la división celular. La proteína supresora tumoral juega un papel en la división celular de mantenimiento de bajo control. Cuando ocurre una mutación, el gen supresor de tumor ya no es capaz de desempeñar su trabajo, y como resultado un crecimiento celular descontrolado puede ocurrir. Esto puede contribuir al desarrollo de un cáncer.

Genes diana o blanco: es la secuencia de ADN reconocida por una enzima con actividad hidrolasa específica, llamada enzima de restricción, que es capaz de hidrolizar dicho polímero dependientemente de la secuencia nucleotídica y del grado de modificación de aquél, como puede ser su nivel de metilación.

Estrógenos: Tipo de hormona producida por el cuerpo que ayuda a desarrollar y mantener características sexuales femeninas y el crecimiento de los huesos largos. Los estrógenos también pueden producirse en el laboratorio. Pueden usarse como un tipo de control de la natalidad y en el tratamiento de síntomas de menopausia, trastornos menstruales, osteoporosis y otras afecciones.

Transgénico: (organismo genéticamente modificado u OGM) es un ser vivo creado artificialmente con una técnica que permite insertar a una planta o a un animal genes de virus, bacterias, vegetales, animales e incluso de humanos.

Murino: Uso de cepas especiales de ratones para estudiar una enfermedad o afección humana, y la manera de prevenirla y tratarla.

Oncoproteína: Una proteína que está codificada por un oncogene viral que se ha integrado en el genoma de una célula eucariota y que participa en la regulación o síntesis de proteínas relacionadas con el crecimiento de células tumorígenas.

HPV de alto riesgo: Tipo de virus que causa la formación de tejido anormal (por ejemplo, verrugas) y otros cambios en las células. La infección durante largo tiempo por ciertos tipos de virus del papiloma humano a veces causa cáncer de cuello uterino. Es posible que el virus del papiloma humano también desempeñe una función en otros tipos de cáncer, como los cánceres de ano, vagina, vulva, pene y orofaringe.

Cáncer: Nombre dado a las enfermedades en las que hay células anormales que se multiplican sin control y pueden invadir los tejidos cercanos. Las células de cáncer también se pueden diseminar hasta otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático.

NIC (CIN): (Neoplasia cervical intraepitelial). Es un crecimiento anormal y precanceroso de células escamosas en el cuello uterino.

Ciclo estral: Se define como el período comprendido desde la aparición de un estro hasta el comienzo del siguiente.

Ciclo celular: El ciclo celular es una serie ordenada de eventos en donde la célula crece, duplica su material genético y se divide para dar lugar a dos células hijas.