

# Modelos murinos preclínicos para la búsqueda de nuevos biomarcadores histopatológicos de la carcinogénesis cervical humana

*Preclinical murine models for the search for new histopathological biomarkers of human cervical carcinogenesis*

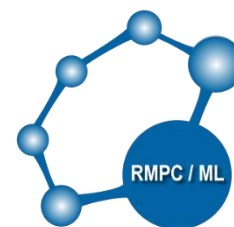
**Catalina Flores-Maldonado<sup>1</sup>, Enoc Mariano Cortés-Malagón<sup>2,3</sup>, Rafael García-Rascón<sup>4</sup>, Julia Dolores Toscano-Garibay<sup>4</sup>, Gerardo Rubén Contreras<sup>1</sup>, Juan Manuel Gallardo<sup>5</sup>, Carmen Palacios-Reyes<sup>6</sup>, José Bonilla-Delgado<sup>4\*</sup>**

## RESUMEN

La infección por virus del papiloma humano de alto riesgo es el principal agente causal de neoplasias y cáncer cervical. Elucidar los mecanismos que subyacen a la carcinogénesis cervical permitirá el avance de nuevas vacunas, así como el descubrimiento de biomarcadores diagnósticos y terapéuticos. En este sentido, los modelos murinos utilizados en investigación básica son una herramienta invaluable, tanto para el uso de nuevos agentes terapéuticos, así como la caracterización de nuevas vías de señalización poco descritas que sean relevantes durante el proceso carcinogénico. En la presente revisión, exploramos los modelos preclínicos actuales y enfatizamos las fortalezas y debilidades de estos modelos para brindar actualizaciones sobre nuevas oportunidades para investigar las muchas incógnitas que quedan en la investigación del cáncer cervicouterino.

## ABSTRACT

High-risk human papillomavirus infection is the primary causal agent of neoplasia and cervical cancer. Elucidating the mechanisms underlying cervical carcinogenesis will allow the advancement of new vaccines and the discovery of diagnostic and therapeutic biomarkers. In this sense, murine models used in basic research are an invaluable tool, both for the use of new therapeutic agents and the characterization of new, poorly described signaling pathways that are relevant during the carcinogenic process. In the present review, we explore current preclinical models, emphasizing the strengths and weaknesses of these models to provide updates on new opportunities to investigate the many remaining unknowns in cervical cancer research.



## ARTÍCULO ORIGINAL

Revista Mexicana  
de **Patología Clínica**  
y Medicina de Laboratorio

Rev Mex Patol Clin Med Lab. 2024;  
Volumen 71, Número 2

1. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav). Ciudad de México 07360. México.
2. División de Investigación. Hospital Juárez de México. Ciudad de México 07760. México.
3. Laboratorio de Genética. Hospital Nacional Homeopático. Ciudad de México 06800, México.
4. Unidad de Investigación. Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca. IMSS-Bienestar. Ixtapaluca 56530, México.
5. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas. Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ciudad de México 06720. México.
6. Departamento de Ciencias Médicas. División de Ciencias de la Salud. Universidad de Guanajuato, Campus León. Guanajuato 37000, México.

## CONTACTO

**José Bonilla-Delgado.**

Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca. IMSS-Bienestar Carr. Federal México-Puebla Km. 34.5, 56530, Ixtapaluca, EDOMEX, México.

## PALABRAS CLAVE

HPV, modelos murinos, carcinogénesis, biomarcadores

## KEYWORDS

HPV, murine models, carcinogenesis, and biomarkers



## ABSTRACT

High-risk human papillomavirus infection is the primary causal agent of neoplasia and cervical cancer. Elucidating the mechanisms underlying cervical carcinogenesis will allow the advancement of new vaccines and the discovery of diagnostic and therapeutic biomarkers. In this sense, murine models used in basic research are an invaluable tool, both for the use of new therapeutic agents and the characterization of new, poorly described signaling pathways that are relevant during the carcinogenic process. In the present review, we explore current preclinical models, emphasizing the strengths and weaknesses of these models to provide updates on new opportunities to investigate the many remaining unknowns in cervical cancer research.

## INTRODUCCIÓN

Según el Observatorio Mundial del Cáncer (GLOBOCAN), en su última edición de 2022, el cáncer de cervicouterino (CC) es el cuarto cáncer más común, y es la tercera causa de mortalidad por cáncer entre las mujeres. En países desarrollados como Estados Unidos, la implementación de programas de detección, y el acceso a vacunas, han reducido su puesto al duodécimo en términos de tasas de incidencia y mortalidad. Sin embargo, en países en vías de desarrollo, como México, el CC ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad.<sup>1,2</sup>

La infección por virus del papiloma humano de alto riesgo (HR-HPVs) es el principal factor etiológico del CC. Los HPV constituyen una vasta familia de virus de DNA de cadena doble que pueden causar lesiones neoplásicas en piel, así como en mucosas mono- y multi-estratificadas.<sup>3</sup> Aunque las neoplasias del cuello uterino causadas por el HPV tipo 16 (HPV16) son las lesiones de mayor interés clínico, actualmente existe una creciente tendencia hacia los cánceres orales, y, aunque a la fecha existen dos vacunas profilácticas contra el HPV16, la validación final de su eficacia

contra lesiones orales, así como su efectividad cruzada contra otros genotipos de HPV de alto riesgo, requerirá una extensa recopilación de datos durante décadas.<sup>4</sup>

La infección por HR-HPVs ocurre de manera natural en muchas especies de mamíferos, aunque también se han podido infectar de manera inducida, o mediante la introducción de construcciones génicas por transgénesis. Gracias a ello, en la actualidad contamos con distintos modelos murinos que han servido no solo como modelos preclínicos de laboratorio, sino también como modelos que emulan la carcinogénesis cervical humana.<sup>5</sup> En concreto, se han estudiado los virus del papiloma humano de roedores, lagomorfos, caninos, bovinos y equinos como modelos de la enfermedad por HPV, lo que ha contribuido a la investigación sobre el diagnóstico, el tratamiento, e incluso la evaluación de vacunas.<sup>6</sup> Se están desarrollando nuevos modelos animales utilizando ratones de laboratorio que siguen mejorando nuestra comprensión de las infecciones de las mucosas en sitios clínicamente importantes.

### **Modelos murinos transgénicos**

Los primeros modelos de ratón transgénico consistieron en la expresión de la región temprana del papilomavirus bovino (BPV-1) y los papilomavirus humanos cutáneos, HPV-5, y HPV-18; estos modelos fueron capaces no solo de formar lesiones cutáneas, sino también amplificar su construcción viral.<sup>7,8</sup> Posteriormente, se han investigado exhaustivamente numerosos modelos de ratones transgénicos que expresan oncogenes virales de HPV en tejidos de cérvix y piel bajo el control de la citoqueratina 14 humana (K14) 9-12. De estos modelos, han surgido hallazgos significativos con respecto a los efectos de los oncogenes virales in vivo, particularmente en ubicaciones anatómicas cruciales como el cuello uterino y el epitelio anal.<sup>9</sup>

Jeffrey M. Arbeit, M.D., de la Universidad de California-San Francisco, empleó los modelos murinos con construcciones expresadas bajo el control de K14, y presentó importantes estudios con este tipo de modelos para evaluar el impacto del HPV y los estrógenos para desarrollar CC. El modelo de su equipo de investigación, ratones transgénicos K14-HPV16, implica la expresión de toda la región temprana de HPV16 en los queratinocitos basales del epitelio escamoso

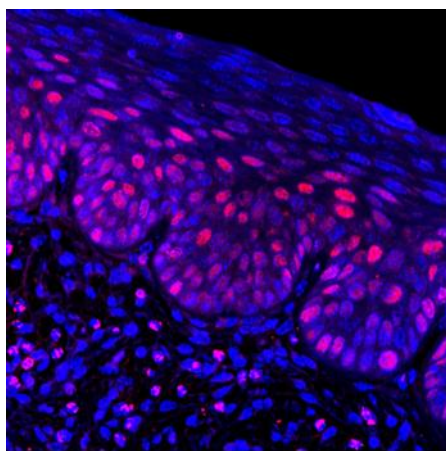
a través del casete de expresión de queratina-14 humana. El ochenta por ciento de estos ratones experimentan cánceres de piel espontáneos entre los 8 y 12 meses de edad, pero no muestran carcinogénesis cervical por sí solos.<sup>13</sup>

Para iniciar la carcinogénesis cervical, a ratones transgénicos hembra de 1 mes de edad, se les administran pellets de liberación continua que contienen 17-B-estradiol a intervalos de 2 meses durante un máximo de 6 meses. Los ratones transgénicos desarrollan lesiones similares a la neoplasia intraepitelial cervical 1 (NIC-1) después de 1 mes, y progresan a lesiones similares a NIC-3 a los 3 meses y evolucionan a carcinoma in situ o cánceres invasivos a los 4 meses de tratamiento. Los cánceres invasivos aparecen en la vulva, la vagina, el cuello uterino externo y en la zona de transformación cervical, ubicada en el canal cervical superior cerca de la inserción de cada cuerno uterino en ratones.

La reducción gradual de la dosis de estrógeno identificó un nivel más bajo de estrógeno que afecta preferentemente la carcinogénesis de la zona de transformación. Investigaciones adicionales establecieron que el gen E7 es el más importante y adecuado para la neoplasia inducida por estrógenos.<sup>13</sup>

En estudios con ratones con el marco de lectura abierto E7 (ratones K14-E7), los investigadores descubrieron que la proliferación del epitelio escamoso cervical era de 2 a 3 veces mayor que en ratones que portaban solo el gen E6 o en ratones no transgénicos. La relación entre el estrógeno y el desarrollo del cáncer de cuello uterino varió, dependiendo de la cepa de ratón utilizada. Algunas cepas mostraron una mayor susceptibilidad a la carcinogénesis en comparación con otras. Estos hallazgos respaldan la investigación epidemiológica que sugiere una variación en la tasa de infección por HPV y el desarrollo de lesiones cervicales en mujeres que toman anticonceptivos orales, como observaron tanto Franco como Herrero.<sup>14</sup>

Los ratones transgénicos K14E7 tratados con estrógenos han sido ampliamente utilizados en nuestro laboratorio, y han emulado muchos de los biomarcadores ya descritos en pacientes tales como: p16, MCM-2 -7, Ki67, PCNA; pero de manera novedosa, B-catenina y Cldn-4.<sup>15,16</sup> La vía de B-catenina está poco entendida en CC, pero se ha descrito posteriormente en pacientes, y se ha demostrado que tiene especial importancia en lesiones malignas cervicales.<sup>17,18</sup> A continuación, se muestra un ejemplo del tipo de lesión en tejido ectocervical que genera este tipo de modelos, la imagen muestra una lesión de bajo grado y al marcador PCNA como biomarcador de células inmaduras.



**FIGURA 1.** Lesión ectocervical generada por un tratamiento estrogénico 17-B-Estradiol 0.05 mg/mes en el modelo murino K14E7

### Modelos murinos avatar

Los modelos de ratón con trasplante de tumor, o avatar, se han utilizado para evaluar diversas estrategias inmunoterapéuticas destinadas a curar enfermedades y cánceres relacionados con el HPV19. Los primeros modelos de trasplante de tumor, consistieron en inocular en el dorso de ratones líneas celulares que expresan diferentes oncogenes virales del VPH para explorar métodos mejorados de presentación de antígenos<sup>20</sup>, comprender la función de las células T CD8 en el manejo de tumores<sup>20,21</sup>, evaluar inhibidores de puntos de control que reducen el agotamiento de las células T<sup>22,23</sup> y aumentar la efectividad de las vacunas.<sup>24-26</sup>

Los modelos de xenoinjerto de ratón fueron el enfoque experimental pionero para cultivar cepas de HPV en un entorno de laboratorio.<sup>27</sup> Genotipos de HPV como 11, 16, 40, 83 y 6 se cultivaron de manera exitosa en xenoinjertos de prepucio humano en el dorso de ratones atímicos y **SCID Severe Combined Immunodeficiency Disease**<sup>28-30</sup> Además, se obtuvieron conocimientos clave sobre el tropismo tisular de HPV11 utilizando muestras de tejido de varios sitios anatómicos. En los últimos tiempos, estos modelos han sido poco estudiados, probablemente debido a avances como los sistemas de cultivo en balsas organotípicas<sup>31</sup>, o las tecnologías de pseudovirus.<sup>32,33</sup> Sin embargo, siguen siendo importantes para estudiar el tropismo viral y producir grandes cantidades de viriones nativos para el análisis estructural.

## CONCLUSIONES

---

Los modelos animales de CC son valiosos recursos in vivo para avanzar en la comprensión de los principios fundamentales de la biología del HPV. Las limitaciones específicas de los tejidos y las especies, junto con la estrecha relación entre la diferenciación de los queratinocitos y el ciclo de vida viral, aún requieren de una mayor exploración a nivel molecular y celular. Para comprender plenamente el papel de los factores de restricción virales del huésped y la inmunidad innata, es esencial la investigación en curso utilizando modelos preclínicos de papilomavirus manipulables genéticamente.

### Reconocimientos

Los autores desean agradecer al Dr. Patricio Gariglio por sus aportaciones críticas al manuscrito.

## REFERENCIAS

1. Chesson HW, Dunne EF, Hariri S, Markowitz LE. The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. *Sex Transm Dis.* Nov 2014;41(11):660-4. doi:10.1097/OLQ.0000000000000193
2. GLOBOCAN. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/en>
3. Belnap DM, Olson NH, Cladel NM, et al. Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids. *J Mol Biol.* Jun 7 1996;259(2):249-63. doi:10.1006/jmbi.1996.0317
4. Booy FP, Roden RB, Greenstone HL, Schiller JT, Trus BL. Two antibodies that neutralize papillomavirus by different mechanisms show distinct binding patterns at 13 Å resolution. *J Mol Biol.* Aug 7 1998;281(1):95-106. doi:10.1006/jmbi.1998.1920
5. Rector A, Van Ranst M. Animal papillomaviruses. *Virology.* Oct 2013;445(1-2):213-23. doi:10.1016/j.virol.2013.05.007
6. Peh WL, Middleton K, Christensen N, et al. Life cycle heterogeneity in animal models

- of human papillomavirus-associated disease. *J Virol.* Oct 2002;76(20):10401-16. doi:10.1128/jvi.76.20.10401-10416.2002
7. Kondoh G, Li Q, Pan J, Hakura A. Transgenic models for papillomavirus-associated multistep carcinogenesis. *Intervirology.* 1995;38(3-4):181-6. doi:10.1159/000150430
8. Hanahan D, Wetzel E, Skowronski J, Sippola-Thiele M, Lindgren V, Howley P. Tumorigenic latency and separable stages during fibrosarcoma development in transgenic mice carrying papillomavirus genomes. *Princess Takamatsu Symp.* 1989;20:289-96.
9. Thomas MK, Pitot HC, Liem A, Lambert PF. Dominant role of HPV16 E7 in anal carcinogenesis. *Virology.* Dec 20 2011;421(2):114-8. doi:10.1016/j.virol.2011.09.018
10. Damian-Morales G, Serafin-Higuera N, Moreno-Eutimio MA, et al. The HPV16 E7 Oncoprotein Disrupts Dendritic Cell Function and Induces the Systemic Expansion of CD11b(+)Gr1(+) Cells in a Transgenic Mouse Model. *Biomed Res Int.* 2016;2016:8091353. doi:10.1155/2016/8091353
11. Griep AE, Herber R, Jeon S, Lohse JK, Dubielzig RR, Lambert PF. Tumorigenicity by human papillomavirus type 16 E6 and E7 in transgenic mice correlates with alterations in epithelial cell growth and differentiation. *J Virol.* Mar 1993;67(3):1373-84. doi:10.1128/JVI.67.3.1373-1384.1993
12. Schaper ID, Marcuzzi GP, Weissenborn SJ, et al. Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8. *Cancer Res.* Feb 15 2005;65(4):1394-400. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3263
13. 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 U S A.* Apr 2 1996;93(7):2930-5. doi:10.1073/pnas.93.7.2930
14. Wolf JK, Franco EL, Arbeit JM, et al. Innovations in understanding the biology of cervical cancer. *Cancer.* Nov 1 2003;98(9 Suppl):2064-9. doi:10.1002/cncr.11682
15. Bonilla-Delgado J, Bulut G, Liu X, et al. The E6 oncoprotein from HPV16 enhances the canonical Wnt/beta-catenin pathway in skin epidermis in vivo. *Mol Cancer Res.* Feb 2012;10(2):250-8. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0287
16. Cortes-Malagon EM, Bonilla-Delgado J, Diaz-Chavez J, et al. Gene expression profile regulated by the HPV16 E7 oncoprotein and estradiol in cervical tissue. *Virology.* Dec 2013;447(1-2):155-65. doi:10.1016/j.virol.2013.08.036
17. Bhattacharjee R, Das SS, Biswal SS, et al. Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. *Crit Rev Oncol Hematol.* Jun 2022;174:103675. doi:10.1016/j.critrevonc.2022.103675
18. Aghbash PS, Hemmat N, Baradaran B, et al. The effect of Wnt/beta-catenin signaling on PD-1/PDL-1 axis in HPV-related cervical cancer. *Oncol Res.*

2022;30(3):99-116. doi:10.32604/or.2022.026776

19. Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* Jan 1 1996;56(1):21-6.
20. Cheng WF, Hung CF, Lin KY, et al. CD8+ T cells, NK cells and IFN-gamma are important for control of tumor with downregulated MHC class I expression by DNA vaccination. *Gene Ther.* Aug 2003;10(16):1311-20. doi:10.1038/sj.gt.3301982
21. Beyranvand Nejad E, van der Sluis TC, van Duikeren S, et al. Tumor Eradication by Cisplatin Is Sustained by CD80/86-Mediated Costimulation of CD8+ T Cells. *Cancer Res.* Oct 15 2016;76(20):6017-6029. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0881
22. Liu Z, Zhou H, Wang W, Fu YX, Zhu M. A novel dendritic cell targeting HPV16 E7 synthetic vaccine in combination with PD-L1 blockade elicits therapeutic antitumor immunity in mice. *Oncoimmunology.* Jun 2016;5(6):e1147641. doi:10.1080/2162402X.2016.1147641
23. Mkrtychyan M, Chong N, Abu Eid R, et al. Anti-PD-1 antibody significantly increases therapeutic efficacy of *Listeria monocytogenes* (Lm)-LLO immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2013;1:15. doi:10.1186/2051-1426-1-15
24. Peng S, Qiu J, Yang A, et al. Optimization of heterologous DNA-prime, protein boost regimens and site of vaccination to enhance therapeutic immunity against human papillomavirus-associated disease. *Cell Biosci.* 2016;6:16. doi:10.1186/s13578-016-0080-z
25. Song L, Yang MC, Knoff J, Wu TC, Hung CF. Cancer immunotherapy employing an innovative strategy to enhance CD4+ T cell help in the tumor microenvironment. *PLoS One.* 2014;9(12):e115711. doi:10.1371/journal.pone.0115711
26. Soong RS, Song L, Trieu J, et al. Toll-like receptor agonist imiquimod facilitates antigen-specific CD8+ T-cell accumulation in the genital tract leading to tumor control through IFNgamma. *Clin Cancer Res.* Nov 1 2014;20(21):5456-67. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0344
27. Kreider JW, Howett MK, Wolfe SA, et al. Morphological transformation in vivo of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata. *Nature.* Oct 17-23 1985;317(6038):639-41. doi:10.1038/317639a0
28. Bonne W, DaRin C, Borkhuis C, de Mesy Jensen K, Reichman RC, Rose RC. Isolation and propagation of human papillomavirus type 16 in human xenografts implanted in the severe combined immunodeficiency mouse. *J Virol.* Jun 1998;72(6):5256-61. doi:10.1128/JVI.72.6.5256-5261.1998
29. Brown DR, McClowry TL, Bryan JT, Stoler M, Schroeder-Diedrich JM, Fife KH. A human papillomavirus related to human papillomavirus MM7/LVX82 produces distinct histological abnormalities in human foreskin implants grown as athymic



- mouse xenografts. *Virology*. Sep 15 1998;249(1):150-9. doi:10.1006/viro.1998.9294
30. Christensen ND, Koltun WA, Cladel NM, et al. Coinfection of human foreskin fragments with multiple human papillomavirus types (HPV-11, -40, and -LVX82/MM7) produces regionally separate HPV infections within the same athymic mouse xenograft. *J Virol*. Oct 1997;71(10):7337-44. doi:10.1128/JVI.71.10.7337-7344.1997
  31. Ozbun MA, Patterson NA. Using organotypic (raft) epithelial tissue cultures for the biosynthesis and isolation of infectious human papillomaviruses. *Curr Protoc Microbiol*. Aug 1 2014;34:14B 3 1-18. doi:10.1002/9780471729259.mc14b03s34
  32. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. *Methods Mol Med*. 2005;119:445-62. doi:10.1385/1-59259-982-6:445
  33. Pyeon D, Lambert PF, Ahlquist P. Production of infectious human papillomavirus independently of viral replication and epithelial cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 28 2005;102(26):9311-6. doi:10.1073/pnas.0504020102