



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“ANÁLISIS FUNCIONAL DEL ONCOGEN E6 DE VARIANTES DEL VPH
TIPO 18”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

Q.C. ERICK NATIVIDAD DE LA CRUZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. MARCELA LIZANO SOBERÓN

MÉXICO, D.F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres y hermanos

Aunque separarme de ustedes fue uno de los momentos más difíciles de mi vida, el tiempo que he pasado lejos me ha enseñado que un hombre siempre valora el honor y el amor por la familia por encima de la riqueza. Mis padres no solo me enseñaron a caminar y a trabajar duro para obtener lo que deseamos, de ustedes aprendí el significado del amor por los hijos y aunque el tiempo pase y aprenda algo nuevo cada día, ustedes siempre tendrán algo que enseñarme.

Los momentos que he compartido con mis hermanos, donde nos divertíamos juntos son recuerdos que atesoro en mi corazón.

A mi esposa

El significado que tiene mi vida no sería posible sin ti, has estado en muchos momentos de mi vida y en otros no y es gracias a tu ausencia que he aprendido cuanto valoro el tiempo que estamos juntos y lo que soy cuando estoy junto a ti. Tu paciencia es algo que mucha gente podría admirar.

A mi pequeño bebe

Jugar juntos me ha dado más alegría de la que creo haber tenido en mi vida desde que era niño, verte dormir tan plácidamente me hace pensar que nada importa más que tenerte a mi lado, eres el regalo más grande que Dios me ha dado.

A mis abuelos que ya no están

Conforme crecí mis visitas fueron menos frecuentes y a pesar de que trataba de estar más cerca de ustedes, el tiempo que pasaba a su lado era poco. Ahora que ya no están, solo viven en mi mente y en mi corazón, su ausencia es algo que llevo día a día.

A la Dra. Marcela

Por todo lo que aprendí a su lado y no solo ciencia, también a ser una mejor persona, la alegría que irradia es algo que espero que nunca pierda.

A mis amigos

A todos mis amigos con los cuales compartí muchos momentos de alegría y que me animaban a terminar esta etapa de mi vida. Adriana, Adela, Alma, Aurora y Marco.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de doctorado otorgada durante el desarrollo de este proyecto con número de registro **169956** y a los recursos del proyecto **60722** del CONACyT.

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Biomédica del Instituto Nacional de Cancerología.

INDICE

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 2. | RESUMEN..... | 6 |
| 3. | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 7 |
| 4. | ANTECEDENTES..... | 8 |
| 4.1. | CÁNCER CÉRVICO-UTERINO..... | 8 |
| 4.2. | EL PAPEL DEL VPH EN EL DESARROLLO DEL CACU..... | 8 |
| 4.3. | EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO..... | 10 |
| 4.4. | LOS ONCOGENES VIRALES..... | 10 |
| 4.4.1. | La oncoproteína E6..... | 11 |
| 4.4.2. | La proteína E6*..... | 14 |
| 4.4.3. | La oncoproteína E7..... | 15 |
| 4.5. | CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VPH..... | 16 |
| 4.5.1. | La Familia Papillomaviridae..... | 16 |
| 4.5.2. | Variación intratipo en los genes del VPH..... | 18 |
| 4.6. | LAS VARIANTES DEL VPH EN EL RIESGO DE DESARROLLO DE CÁNCER CERVICAL..... | 21 |
| 4.6.1. | Diferencias funcionales de la variación intratipo del virus del papiloma..... | 23 |
| 5. | OBJETIVO GENERAL..... | 25 |
| 6. | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 25 |
| 7. | HIPÓTESIS..... | 26 |
| 8. | MATERIAL Y METODOS..... | 27 |
| 8.1. | Muestras Biológicas..... | 27 |
| 8.2. | Caracterización de los cambios nucleotídicos de los genes E6 y E7 de variantes del VPH tipo 18..... | 27 |
| 8.3. | Cultivo Celular..... | 27 |
| 8.3. | Construcción de los vectores de expresión con los aislados de E6 de VPH-18..... | 28 |
| 8.4. | Transfección celular con los plásmidos con las variantes de E6 del VPH-18..... | 30 |
| 8.5. | Expresión de transcritos del gen E6 de variantes del VPH-18 en líneas celulares y tumores de CaCU..... | 31 |
| 8.6. | Extracción de proteínas y western blot de E6, p53 y Bax..... | 31 |
| 8.7. | Ensayo de degradación <i>in vitro</i> de p53..... | 32 |
| 8.8. | Ensayo de formación de colonias en agar suave..... | 32 |
| 8.4. | Generación de tumores en ratones desnudos Balb/Un..... | 32 |
| 8.5. | Mutagénesis dirigida sobre el marco de lectura de E6..... | 33 |
| 9. | RESULTADOS..... | 34 |
| 9.1. | Amplificación y caracterización de los cambios en las variantes de los oncogenes E6 y E7 de VPH-18..... | 34 |
| 9.2. | Análisis de la expresión de las variantes del oncogen E6 de VPH-18 en las líneas celulares transfectadas y tumores de CaCU..... | 35 |
| 9.3. | Niveles de expresión de la proteína E6, p53 y Bax en las líneas celulares transfectadas con las variantes del oncogen E6..... | 38 |
| 9.4. | Efecto de la variación intratipo de E6 sobre la degradación <i>in vitro</i> de p53..... | 40 |
| 9.5. | Determinación de la capacidad oncogénica de las variantes de E6 de VPH-18..... | 42 |
| 9.6. | Mutagénesis dirigida de los cambios en la secuencia de las variantes del gen E6..... | 43 |
| 10. | DISCUSIÓN..... | 45 |
| 11. | ANEXOS..... | 52 |
| 12. | REFERENCIAS..... | 77 |
| 13. | LISTA DE ABREVIACIONES..... | 87 |

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la investigación sobre la etiología del Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU) ha presentado un progreso muy importante. En décadas pasadas, diferentes agentes infecciosos como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* y el virus del *Herpes simplex* tipo 2 representaban los principales agentes causales en el desarrollo del CaCU. En el año de 1974, el virologo alemán Harald zur Hausen, fue el primero en proponer la asociación del virus del papiloma humano con el desarrollo del CaCU. Durante una conferencia internacional en Florida, el doctor zur Hausen presentó sus resultados demostrando que el virus del *Herpes simplex* no estaba asociado a la etiología del cáncer cervical. Sin embargo, el hecho de que un investigador de Chicago anunciara que había aislado el 40% del genoma del herpes simple en una muestra de cáncer cervical demeritó sus resultados, catalogándolos como carentes de sensibilidad.⁵⁶

En 1977 mientras zur Hausen dirigía el Instituto de Virología en Freiburg, su equipo de trabajo aisló el material viral de una verruga genital. Desafortunadamente este tipo (VPH-6) no estaba presente en las células de CaCU. Poco tiempo después, se aisló parte de la secuencia del VPH-11, encontrando una relación distante con secuencias de una biopsia de cáncer de cérvix. Hallazgo que ayudó a que Mathias Dürst, lograra clonar un nuevo tipo en una biopsia de CaCU, el VPH-16.²⁵ Este resultado llevó a demostrar que este tipo estaba presente en cerca de la mitad de las biopsias de cáncer cervical, lo que permitió establecer el papel etiológico del VPH en el desarrollo del CaCU. Más tarde, Meisels y Fortin publicaron dos reportes resaltando la presencia de coilocitos en los raspados cervicales, como un indicativo de infección por VPH.¹⁶ Esta idea fue apoyada al observar partículas virales en las lesiones de bajo grado del cérvix. Más de 20 años de investigación sobre el mecanismo de transformación del VPH, llevó a que en el año de 1995, la agencia internacional de investigación en cáncer designara a los tipos 16 y 18 como agentes carcinogénicos y a los tipos 31 y 33, como probables carcinógenos.³⁸

2. RESUMEN

La infección persistente con los VPH de “alto riesgo” constituye el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cérvico-uterino. Sin embargo, los estudios epidemiológicos y moleculares han propuesto que la variación intra-tipo representa un factor de riesgo muy importante en la carcinogénesis cervical. Con respecto a las variantes de VPH-16 se ha propuesto que la modificación en los oncogenes virales, así como en la región larga de control se asocia con infecciones más persistentes y con un mayor riesgo de cáncer. En el caso del VPH-18, se ha observado que las variantes de la rama Africana se encuentran con mayor frecuencia en lesiones premalignas y en el caso de tumores, con tipos histológicos con un mejor pronóstico relativo. Estos hallazgos indicarían que la variante Africana del VPH-18 presenta un comportamiento oncogénico menor con respecto al aislado de referencia.

El análisis de la variación intra-tipo en el oncogen E6 del VPH-18 demostró que los cambios presentes en este gen modifican su patrón de expresión. En el caso del aislado de referencia y la variante Europea expresan mayores niveles de expresión del transcrito completo de E6; sin embargo, la variante Africana expresa mayores niveles del transcrito E6*I. Los ensayos de mutagénesis dirigida sobre la secuencia del gen E6 de referencia mostraron que el cambio la posición C491A está implicado en la mayor expresión del transcrito E6*I observado en la variante Africana. Los cambios en el patrón de expresión observados en las variantes correlacionaron con el patrón de expresión observado en muestras de tumores que contienen las diferentes variantes de VPH-18. Como una consecuencia de la reducción en los niveles del transcrito completo de E6 en las clonas de la variante Africana, los niveles de la proteína E6 se reducen y aumentan los niveles de las proteínas p53 y Bax. La capacidad transformante de las variantes de E6 para generar tumores en ratones desnudos demostró que el aislado de referencia genera tumores de mayor volumen con respecto a los tumores generados con la variante Africana. Estos resultados sugieren que los cambios presentes en el oncogen E6 están implicados en el procesamiento del transcrito, lo que repercute sobre el comportamiento biológico de esta variante.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La persistencia de la infección con el virus del papiloma humano de “alto riesgo” constituye el principal factor de riesgo en el desarrollo del CaCU, principalmente los tipos 16 y 18. Sin embargo, solo una pequeña proporción de las lesiones cervicales infectadas con el virus de alto riesgo avanzan a cáncer, lo cual indica la presencia de factores adicionales. Un factor viral muy importante es la variación intratipo. Se propone que ciertas variantes están implicadas en las diferencias en el comportamiento de las neoplasias. Se propone que los cambios nucleotídicos que presentan las diferentes variantes de VPH podrían alterar procesos de transcripción de genes específicos, replicación viral y transformación celular, lo que a su vez podría repercutir en funciones biológicas y bioquímicas que expliquen la diversidad en fenotipos clínicos.

4. ANTECEDENTES

4.1 CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

El Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU) constituye unos de los principales problemas de salud pública en el mundo. En el ámbito mundial, ocupa el quinto lugar en frecuencia entre las neoplasias y el segundo lugar entre las neoplasias que afectan a las mujeres. De acuerdo al último estimado global, cada año se detectan 493,000 casos nuevos, con una tasa alta de mortalidad de aproximadamente el 50%.⁶⁵ El 83% de los casos se presentan en los países en vías de desarrollo, casi 300,00 casos; mientras que en los países desarrollados, el número de casos es menor de 100,000. El índice de sobrevivencia es menor del 50% en los países en desarrollo, comparado con el 66% de los países desarrollados.⁶⁴

Las regiones más afectadas por el CaCU se encuentran entre las más pobres del mundo. Centro y Sudamérica, el África Sub-Sahariana, partes de Oceanía y Asia tienen el mayor índice de incidencia de CaCU; 30 por cada 100,000 mujeres, comparado con 10 de cada 100,000 de Norteamérica y Europa.⁶⁵ La carencia de un programa efectivo de detección oportuna de condiciones precancerosas, así como las deficiencias del tratamiento de las lesiones premalignas, podrían ser las razones más importantes por lo que se observa una mayor incidencia de CaCU en los países en desarrollo. Algunos autores han propuesto que la variación intratipo es uno de los factores implicados en la alta prevalencia de cáncer cervical en estas regiones.

En México, el CaCU ocupa el primer lugar en frecuencia entre las neoplasias presentes en mujeres y el tercer lugar en mortalidad en la población general.⁶⁷ Esta enfermedad afecta principalmente a las mujeres en edad reproductiva; debido a que el tiempo de progresión de las lesiones premalignas a cáncer invasor es lento, la incidencia de esta neoplasia es muy baja en mujeres menores de 25 años.⁷⁴ La edad promedio de las mujeres mexicanas que presentan esta patología es de 50 años, sin embargo las mujeres entre 44 y 53 años son las más afectadas.⁷⁰

4.2 EL PAPEL DEL VPH EN EL DESARROLLO DEL CACU

La epidemiología del CaCU la ha catalogado como una enfermedad de transmisión sexual, lo que implica la presencia de un organismo infeccioso como principal agente

etiológico.⁷⁴ Actualmente se considera que la infección persistente por el VPH de “alto riesgo” es el principal factor de riesgo para el desarrollo del CaCU.¹¹ El ADN de los VPH de “alto riesgo” se ha detectado en el 99.7% de los carcinomas de células escamosas y en el 94 a 100% de los tumores del cérvix de origen glandular.¹⁹

La infección por el VPH es la enfermedad de transmisión sexual más común. La determinación del ADN de VPH en mujeres asintomáticas, estima que la prevalencia de la infección varía de un 2 a un 44%.¹⁰ Las posibles explicaciones para una variación tan amplia se basan en la diferencia en la edad de las poblaciones analizadas, así como la sensibilidad de las pruebas usadas para la determinación del ADN viral. Se piensa que cerca de un 70% de las mujeres sexualmente activas se infectan al menos una vez en su vida.²⁰ La mayoría de los individuos afectados eliminan la infección sin desarrollar alguna manifestación clínica evidente. De esta forma, solo una pequeña proporción de los individuos infectados progresan a cáncer. La infección con ciertos tipos de VPH parece ser uno de los factores que explican en parte, las diferencias en el comportamiento de las lesiones. Casi 40 tipos de VPH infectan el epitelio del cérvix.⁵⁸ Los estudios epidemiológicos enfocados a determinar la asociación entre la presencia de VPH y el riesgo de desarrollo de cáncer, han identificado que la infección con ciertos tipos de VPH confiere mayor riesgo de evolucionar a CaCU. Quince aislados de VPH se han denominado como tipos de alto riesgo [16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 58, 68, 73 y 82]; 3 tipos, como probables alto riesgo [26, 53 y 66]. Doce tipos, se han catalogado como de bajo riesgo [6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108]; mientras que 3 tipos se han considerado con riesgo indeterminado [34, 57 y 83].⁵⁸

El VPH-16, el cual es el tipo más frecuente en mujeres con citología normal, también es el tipo más común en los tumores escamosos. El VPH-18 es el segundo en frecuencia en los tumores escamosos; sin embargo, en los tumores de origen glandular, el VPH-18 ocupa el primer lugar en frecuencia, seguido del VPH-16.¹⁹ Los tipos 6 y 11, denominados como de bajo riesgo, son los tipos más frecuentes en lesiones benignas en áreas anogenitales conocidas como condiloma acuminado (verrugas genitales). Estos tipos de bajo riesgo también pueden estar presentes en lesiones de bajo grado; sin embargo, no se han observado en lesiones de alto grado.^{33,45}

4.3 EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El VPH es un virus pequeño, no encapsulado, de forma icosaédrica de 55 nm de diámetro, que replica su genoma dentro del núcleo de las células infectadas. La estructura externa del virus consiste de una cápside compuesta de 72 capsómeros, formados por las proteínas L1 y L2.⁴ La proteína L1 constituye el componente principal de la cápside y presenta una secuencia altamente conservada entre los VPHs. La proteína L2 es un componente adicional en la estructura de la cápside y posee una estructura menos conservada entre los VPHs.

Los virus del papiloma tienen una organización genómica similar, consiste en un genoma de ADN de doble cadena circular. En los viriones, el ADN se encuentra asociado con histonas celulares, lo que resulta en una estructura parecida a la cromatina celular.³⁶ El genoma contiene alrededor de 8000 pb que puede ser dividido en general en tres regiones separadas por 2 sitios de poliadenilación (pA). Una región no codificante o región larga de control (RLC), que abarca cerca del 10% del genoma (400 a 1000 pb). Esta región contiene los elementos reguladores para el control de la expresión y replicación viral. La región temprana (E), ocupa más del 50% del genoma viral y contiene los marcos de lectura de las proteínas implicadas en el control de la replicación y de la transcripción (E1, E2 y E8);⁸² así como las proteínas implicadas en la inmortalización y transformación celular (E5, E6 y E7). Por último, una región tardía (L), la cual codifica para las proteínas estructurales de la cápside expresadas durante la infección productiva (L1 y L2).¹⁰² Aun cuando la proteína E4 se encuentra en la región temprana, se expresa en forma tardía y su principal función es la de interactuar y lisar la estructura de queratinas para la liberación de los viriones.⁷¹

El genoma viral contiene en promedio de 8-10 marcos de lectura, localizados en una sola cadena del ADN y se expresan en forma de ARNm policistrónicos. En los VPHs oncogénicos, los transcritos se inician a partir de 2 promotores principales; uno de ellos se encuentra localizado arriba del marco de lectura de E6 y activa la expresión de los genes tempranos antes de que inicie la replicación productiva. En el VPH-16 y 31, este promotor se designa como p97, mientras que en el VPH-18 se denomina p105.¹⁰² El otro promotor, denominado tardío; se activa cuando se inicia la replicación productiva y dirige la

expresión de diferentes inicios de la transcripción localizados alrededor de la posición 742.^{29,62,92}

Figura 1. Estructura de la cápside y genoma del VPH.

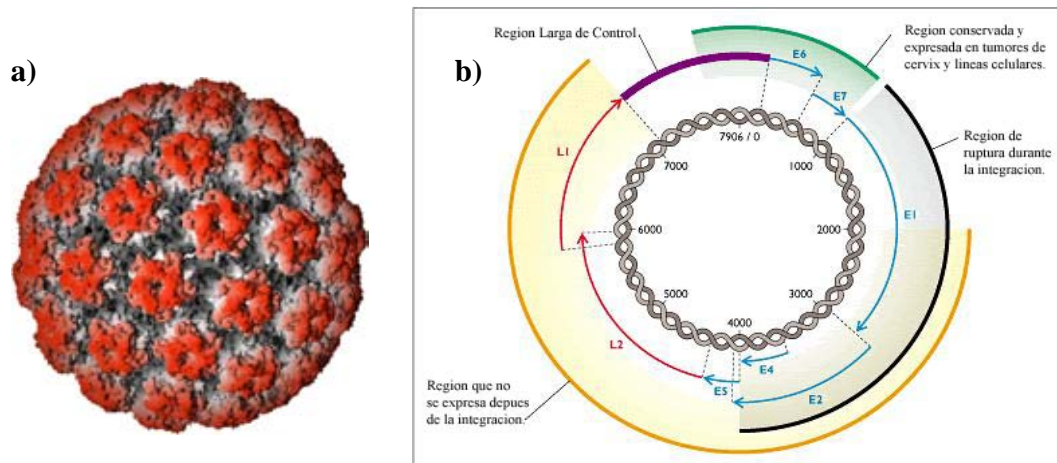


Figura 1. a) Representación esquemática de la estructura de la cápside del virus del papiloma humano, compuesto principalmente por la proteína L1 y en menor proporción de la proteína L2. b) Genoma circular de doble cadena del virus del papiloma humano. Localización de los genes en las diferentes regiones de conforman el genoma viral, así como de la región que controla la replicación y expresión del VPH (RLC).

4.4 LOS ONCOGENES VIRALES

El largo período de latencia entre la infección por el VPH de alto riesgo y el desarrollo de cáncer; así como la baja frecuencia de progresión de las lesiones pre-malignas asociadas con VPH reflejan la naturaleza del CaCU inducido por el VPH. Las propiedades transformantes de los VPHs de alto riesgo residen principalmente en dos genes, E6 y E7. Estos genes son consistentemente expresados en los tumores cervicales y en las líneas celulares de CaCU positivas a VPH.⁷⁶ La expresión de E6 y E7 es esencial para inducir y mantener el estado transformado de las células positivas a VPH.⁷⁹

4.4.1 La oncoproteína E6

La proteína E6 es una proteína relativamente pequeña que contiene aproximadamente 150 aminoácidos. Una característica común de las proteínas E6 es la presencia de cuatro motivos Cys-X-X-Cys, capaces de unir zinc y generar estructuras denominadas “dedos de

Zinc". La integridad de estos dominios es esencial para diversas funciones, tales como activación transcripcional, transformación, immortalización y asociación con proteínas celulares.⁵¹ E6 es fosforilada por una proteína cinasa A (PKA), la cual reconoce residuos de treonina en la región carboxilo de E6.⁴⁴

La localización de E6 ha sido controversial y compleja, en parte debido a sus bajos niveles en las células. La localización de E6 se ha descrito en el núcleo, citoplasma y membranas no nucleares (incluyendo aparato de Golgi) en diferentes tipos celulares.⁵² Algunos estudios muestran que la proteína E6 de los VPHs de alto riesgo se encuentra distribuida tanto en el núcleo como en citoplasma, siendo más abundante en el núcleo; mientras que en los tipos de bajo riesgo, se encuentra en forma predominante en el citoplasma.³⁰ Sin embargo, recientes estudios han observado que la localización de E6 de VPH-18 es un proceso controlado activamente, dependiente del estado de diferenciación de las células o en respuesta a diferentes estímulos.⁸⁴

A pesar de que E6 es una proteína relativamente pequeña, induce cambios muy importantes en el ciclo de vida del virus y en el proceso de immortalización y transformación de la célula. E6 es uno de los genes que se expresan más tempranamente durante la infección por VPH, creando un ambiente más propicio para la producción de nuevas partículas virales al inhibir el proceso de apoptosis, alterar la expresión de otros genes celulares e incrementar el tiempo de vida de la célula.

La característica transformante de E6 está mediada por su interacción con una gran variedad de proteínas celulares.⁵¹ El blanco celular más conocido de E6 es la proteína supresora de tumores p53. El principal mecanismo por el cual, las proteínas E6 de los VPHs de alto riesgo alteran la función supresora de tumores de p53, es a través de promover su degradación para reducir los niveles funcionales de p53. La oncoproteína E6 estimula la degradación de p53 por medio del sistema de degradación proteosómica de Ubiquitina.⁷³ La degradación de p53 es estrictamente dependiente de su unión con E6, se ha observado que las mutaciones en p53 que interfieren con la interacción con E6 generan resistencia a la degradación. Esta es la razón por la cual la afinidad de unión de las diferentes proteínas de E6 con p53 correlaciona con su eficiencia para estimular la degradación de p53.⁶⁸ La proteína E6 de VPH-16 se une y degrada p53 con mayor

eficiencia que la proteína E6 de VPH-18; mientras que proteínas de bajo riesgo que se unen débilmente a p53 son inactivas para su degradación *in vitro*.⁸⁰ Para promover la degradación de p53, E6 requiere de una proteína celular llamada E6AP, una proteína que desempeña la función de ligasa de ubiquitina.⁹¹ E6 se une a p53 y a E6AP simultáneamente y por consiguiente actúa como un puente para permitir la interacción entre la ligasa y p53. En condiciones normales, la degradación de p53 es mediada por el mismo sistema proteolítico; sin embargo, a diferencia de la ligasa empleada por E6, p53 es marcada por la proteína MDM2.⁵³ Este cambio en la ligasa que emplea E6 para la degradación de p53 reduce dramáticamente la vida media de p53 de 3 hrs a 20 min.⁹¹ Ante un daño al ADN, p53 se estabiliza mediante ciertas modificaciones en el dominio carboxilo, tales como fosforilación y acetilación. Las modificaciones postraduccionales impiden que p53 sea ubiquitinado y degradado, debido a que los sitios utilizados para la fosforilación y acetilación, son los mismos sitios empleados por MDM2 para la ubiquitinización.¹⁰¹ El aumento en la degradación de p53 por E6 es la principal causa de la ausencia de su función, ya que la secuencia del gen p53 rara vez se encuentra mutado en tumores cervicales.⁷²

La degradación continua de p53 por E6 puede llevar a la acumulación de mutaciones genéticas en las células infectadas, contribuyendo fuertemente a la acción carcinogénica de los VPHs de alto riesgo. Sin embargo, E6 es una proteína que interactúa con diferentes proteínas celulares implicadas en vías celulares como la apoptosis, vías de señalización y diferenciación celular. Estudios recientes han identificado una nueva clase de proteínas caracterizadas por poseer dominios PDZ, que se unen de forma directa a los sitios de unión a dominios PDZ presentes en el extremo C-terminal de las proteínas E6 de tipos de alto riesgo.⁶⁹ Esta interacción es particularmente interesante, debido a que este sitio de unión a dominios PDZ está formado solamente por cuatro aminoácidos y no está presente en las proteínas E6 de bajo riesgo (XT/SXV).²⁴ Las proteínas PDZ identificadas que interactúan con E6 son: hDlg, un homólogo de la proteína supresora de tumores Dlg de *Drosófila*;⁴³ MAGI-1, una proteína involucrada en la unión celular;²⁸ y hScrib, implicada en el control de las uniones celulares, así como en la proliferación celular.⁵⁹ Debido a que estas proteínas se expresan en sitios de contacto célula-célula, se han relacionado con el control de la división y polaridad celular.

4.4.2 La proteína E6*

Los VPHs difieren marcadamente en sus patrones de transcripción de la región temprana. Como se puede observar en la figura 2, los patrones de transcripción de los VPHs de alto riesgo implican diversas alternativas de ajuste, los cuales generan un patrón complejo de transcritos.¹⁰² La regulación de estos eventos de ajuste durante la infección viral aún no se comprende por completo, en la mayoría de los casos se relaciona tanto con el sitio donador y diferentes sitios aceptores del marco de lectura de los genes tempranos.

En el caso de los VPHs de alto riesgo, los genes E6 y E7 se transcriben como transcritos lineares bicistrónicos y transcritos policistrónicos procesados. Los transcritos procesados se originan del promotor temprano a través de un acoplamiento entre el sitio donador, localizado a 120 pb del codón de inicio y los 4 diferentes sitios donadores. Entre los polipéptidos codificados por el procesamiento alternativo del transcritos de E6 se encuentran cuatro proteínas truncadas, denominadas E6* I, II, III y IV.

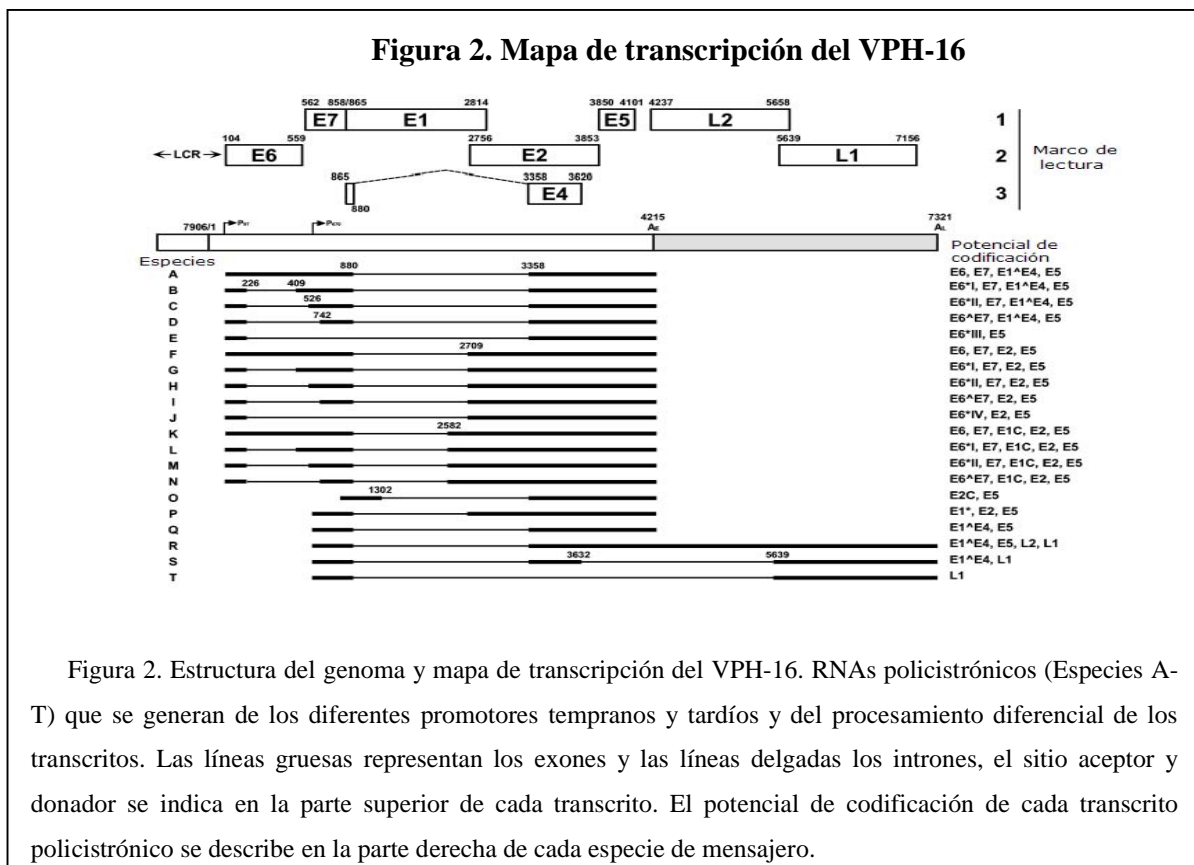


Figura 2. Estructura del genoma y mapa de transcripción del VPH-16. RNAs policistrónicos (Especies A-T) que se generan de los diferentes promotores tempranos y tardíos y del procesamiento diferencial de los transcritos. Las líneas gruesas representan los exones y las líneas delgadas los intrones, el sitio aceptor y donador se indica en la parte superior de cada transcrito. El potencial de codificación de cada transcrito policistrónico se describe en la parte derecha de cada especie de mensajero.

La proteína E6*I se obtiene como resultado del procesamiento del transcrito de E6, que da lugar a un transcrito de menor tamaño. Este transcrito se genera por la unión entre el sitio donador en la posición 233 y el sitio aceptor 416. El transcrito E6*I se traduce en una proteína que pierde la región original C-terminal de la proteína E6 al generarse un codón de paro anticipado, además de perder ambos dominios de “dedos de zinc” de la secuencia original de E6.⁶⁷ La proteína E6* solo se ha detectado en tumores generados en ratones desnudos.⁷⁵ Se ha observado que la proteína E6* traducida *in vitro* es inestable, sugiriendo que los bajos niveles observados en las células se deben a su rápida degradación. Una de las posibles funciones de E6* fue sugerida en estudios donde se muestra que la proteína E6*I de VPH-18 traducida *in vitro* puede inhibir la degradación de p53 por E6.⁶⁷ Estudios en células nulas para p53 mostraron que la coexpresión de E6*I de VPH-18 con p53 en presencia de E6, resulta en la inhibición de la degradación de p53. El principio por el cual E6*I es capaz de inhibir la degradación de p53 inducida por E6 es muy interesante. Al parecer, E6*I es capaz de unirse *in vitro* a E6 y a E6-AP, pero no a p53.⁶⁶ Sin embargo, el análisis mutacional de E6*I de VPH-18 ha mostrado que la actividad antiproliferativa de la expresión de E6*I parece correlacionar principalmente con la habilidad de interactuar con la proteína E6, más que con E6-AP.⁶⁶ Esto sugiere que una de las funciones de E6*I es modular la degradación de p53 durante la replicación viral, lo que reduce el proceso de immortalización e integración al genoma, lo que resultaría en la pérdida de la capacidad de replicación.

4.4.3 La oncoproteína E7

La proteína E7 contiene aproximadamente 100 a.a. De forma similar a E6, E7 contiene un dominio de unión a zinc en la región C-terminal, el cual utiliza para su dimerización o multimerización y un sitio de fosforilación en su región N-terminal, donde es fosforilada por la cinasa caseína II.^{54,5} Diversos ensayos han demostrado que la localización de la proteína E7 dentro de la célula es predominantemente nuclear;³⁰ sin embargo, se han detectado niveles muy bajos en el citoplasma y otros compartimentos celulares, lo cual se relaciona con la capacidad de E7 para interactuar principalmente con blancos celulares implicados en la síntesis del ADN y el control del ciclo celular. E7 interactúa con muchos blancos celulares, tales como pRb, p107, p130, Ciclina A, Ciclina E, desacetilasa de histonas-1 (HDAC-1) y Ap-1.^{26,6,87,55,13,3} Debido a la naturaleza de estas

proteínas, se puede determinar que el principal papel de E7 consiste en alterar el ciclo celular normal de la célula. La expresión de E7 está asociada con un incremento en la síntesis del ADN celular, así como con un aumento en la proliferación celular. Estas características son el resultado de la interacción entre E7 y las proteínas de la familia Rb, incluyendo pRb, p107 y p130.⁶ Estas interacciones interfieren con la habilidad de pRb para inhibir la activación del factor de transcripción E2F, de tal forma que E7 forma un complejo con pRb promoviendo su degradación a través del sistema de ubiquitinización.¹² Esto permite que el factor E2F active la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de ADN, tales como la ribonucleótido reductasa y ADN polimerasa-alfa.⁶³ Además de la degradación de Rb, E7 interactúa con otros inhibidores del ciclo celular, incluyendo p21 y p27.^{90,41,100} De igual forma que E6, la expresión de E7 es necesaria para mantener la proliferación continua en las líneas celulares de cáncer que contienen VPH.⁴⁰

4.5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VPH

4.5.1 La Familia Papillomaviridae

A mediados de los años cincuenta, cuando el virus del papiloma y el virus de la polio empezaron a ser estudiados por microscopía electrónica y análisis básicos de ácidos nucleicos, ambos tipos virales se agruparon en una sola familia, denominada *Papoviridae*. Esta clasificación se basa en las similitudes observadas en estructura de la cápside y en el genoma circular de ADN de doble cadena. Sin embargo, estudios funcionales y de secuencia demostraron que estas similitudes eran demasiado superficiales para establecer una relación. Todos los virus de la polio tienen un genoma de alrededor de 5 kb, mientras que el genoma de los virus del papiloma está cercano a 8 kb. Los poliomavirus tienen 2 unidades de transcripción y en el caso del virus del papiloma la transcripción se presenta en una sola dirección. La diferencia más importante es que los poliomavirus y los virus del papiloma no comparten mucha similitud en la secuencia de nucleótidos y amino ácidos. Hoy en día, estas familias son reconocidas por el comité internacional de taxonomía de los virus como familias separadas, *Papillomaviridae* y *Poliomaviridae*.²² La clasificación actual permite agrupar a todos los tipos de VPH conocidos de acuerdo a sus características filogenéticas en géneros, especies, tipos, subtipos y variantes. A la fecha se han identificado

más de 200 tipos de VPHs diferentes, los cuales pueden ser divididos en aquellos que infectan superficies cutáneas y aquellos que infectan superficies mucosas. A pesar de su variedad, todos los virus de papiloma animal y humano parecen compartir una organización genética similar, aunque con diferencias tanto en las funciones de los genes virales individuales, como en su regulación.

En contraste con otros virus humanos, los virus de papiloma no han sido tipificados por métodos serológicos tradicionales. La carencia de antisueros que permitan distinguir entre los diferentes tipos de HPV, es la principal razón por la cual la clasificación de los tipos virales está basada en el alineamiento de la secuencia nucleotídica. El análisis de la base de datos de la secuencia de los virus del papiloma muestra que el gen L1 es uno de los genes más conservados y por lo tanto es particularmente adecuado para construir la taxonomía de la familia papilomaviridae. Actualmente se acepta por definición que el ADN de cada tipo difiere en por lo menos un 10% de la secuencia nucleotídica del gen L1, de aquélla de cualquier otro tipo viral conocido. Aislados de un tipo cuyas diferencias van del 2 al 10%, son muy raras y son referidas como “subtipo”. Sorprendentemente, solo tres aislados cumplen los criterios que definen un subtipo. El VPH 46, 55 y 64 originalmente descritos como tipos separados, se han definido como subtipos de los VPH 20, 44 y 34 respectivamente.²²

Las variantes de los tipos de VPH difieren en menos del 2% en la secuencia del gen L1 del aislado original, referido como prototipo o genoma de referencia. En regiones con mayor divergencia intratipo como la RLC, las variantes pueden diferir hasta un 5% con respecto al aislado de referencia. La secuencia de la RLC es la región más usada para describir la diversidad intratipo, sin embargo se ha descrito que la región comprendida entre los genes E4 y E5 presenta una mayor variabilidad que la RLC.³⁵ Para identificar a las variantes se obtiene la secuencia de un fragmento de 400 pb de la región larga de control o un fragmento de 450 pb del gen E6 y se determina la presencia de una variante a cada aislado que difiere del prototipo al menos en un nucleótido. Es importante resaltar que el término prototipo no es indicativo de una secuencia ancestral, indica solamente la primera secuencia que se describió de dicho tipo. Esta estrategia se ha aplicado a numerosos tipos de VPH de aislados obtenidos en todo el mundo.^{35,60,96} A través de estos estudios se ha observado que aparentemente existe un número limitado de variantes comunes de cada tipo

y que las variantes muestran mayor divergencia cuando se obtienen de muestras que provienen de grupos étnicos que han evolucionado por mucho tiempo sin contacto alguno, por ejemplo los Africanos e indios Americanos. De estos hallazgos se ha sugerido que cada tipo de VPH ha estado con la especie humana desde nuestros orígenes, evolucionando y diseminándose de forma similar a la migración global del hombre.⁶⁰

4.5.2 Variación intratipo en los genes del VPH

Las proteínas E2, E4, E5, E6 y E7 son importantes para diversas funciones virales, tales como, replicación y transcripción del ADN viral, interacción con el citoesqueleto, immortalización y transformación.⁵⁰ La variación en la secuencia en una o más de estas proteínas puede alterar su función biológica y afectar el resultado clínico de la infección. La caracterización de la variación intratipo en la secuencia nucleotídica dentro de los tipos de VPH representa un acercamiento para la identificación de las variantes, que tienen funciones biológicas diferentes.

Las variantes “intratipo”, se definen como aquellos aislados que muestran una similitud en su secuencia de más del 98% con respecto al tipo viral de referencia en regiones conservadas del genoma, como L1 y L2.⁷ Las regiones no-codificantes muestran una variabilidad ligeramente mayor, con una desviación del 5% de la secuencia de referencia que se considera hipervariable.³⁵ Las secuencias de DNA que codifican dominios conservados en proteínas, permiten comparar a los tipos de VPH y analizar el proceso de especiación, dado que en la taxonomía de los VPH el término “tipo” se considera equivalente al término “especie”. Por otra parte, las secuencias de fragmentos genómicos involucrados en la regulación de la transcripción son altamente variables entre los diferentes tipos de HPV. Sin embargo, estas secuencias contienen un grado de diversidad entre clonas aisladas de un mismo tipo de HPV, suficiente para entender su evolución molecular. Los estudios de variantes permiten entender parte de la historia evolutiva de los virus de papiloma y resultan ser un modo eficiente de conocer el origen y forma de diseminación de estos virus. La gran especificidad y diversidad de tipos sugiere que estos virus están muy bien adaptados y que han estado en íntima asociación con su huésped por mucho tiempo.³⁵ Tal y como se refleja en diversos estudios, donde se observa la distribución de ciertas variantes de VPH-16 provenientes de la referencia Europea como

resultado del proceso de colonización.⁸⁹ El pequeño grado de variación en regiones geográficas, comparado con la gran diversidad entre regiones, es consistente con la idea de una lenta acumulación de mutaciones en períodos de tiempo muy largos, sugiriendo un mínimo índice de mutación y un posible origen ancestral común.

Hoy en día, a través del análisis de una gran cantidad de aislados de VPH obtenidos de diversas partes del mundo, se ha definido cuales son las variantes de los tipos virales más frecuentes; en particular, VPH-16,³⁵ HPV-18,⁶⁰ HPV-6 y HPV-11.³² Además de otros tipos menos frecuentes como el VPH 5 y 8; y más recientemente los tipos 58, 31, 33, 35 y 52.^{23,18,15,2}

Dada la prevalencia del VPH tipo 16 en lesiones pre-invasivas y carcinomas cervicales, la heterogeneidad intratípica del VPH-16 es la más estudiada. A principios de 1990, Ho y sus colaboradores observaron que los aislados del VPH-16 podrían distinguirse por su heterogeneidad nucleotídica y que era posible construir la filogenia viral si todos los genomas intermedios se encontraran. Para este propósito, se analizó un fragmento de la RLC de 301 muestras cervicales positivas a VPH-16 provenientes de los cinco continentes. Se observó la presencia de 48 variantes moleculares caracterizadas por 51 mutaciones puntuales en 48 posiciones nucleotídicas. Todos los aislados encontrados se compararon con la secuencia de referencia obtenida de un paciente alemán con cáncer cervical, el cual fue el primer aislado en ser secuenciado por completo.²² El análisis de la secuencia de la RLC ha demostrado que las variantes de VPH-16 forman 5 ramas filogenéticas principales, las cuales varían en su distribución geográfica y étnica (Figura 3). La nomenclatura de estas ramas refleja el origen geográfico de la mayoría de los aislados contenidos en ellos. Las variantes de dos de estas ramas estaban casi restringidas al continente Africano, por lo cual adquirieron su denominación como Africana-1 (Af1) y Africana-2 (Af-2). Los aislados que formaron la rama Europea (E) se encontraron principalmente en diferentes partes de Europa. Las variantes de esta rama se encontraron también en otros grupos étnicos con frecuencias que varían desde un 60% en el sudeste de Asia hasta un 93% en Norteamérica. Una cuarta rama estaba solamente compuesta de aislados chinos y japoneses, denominándose como rama Asiática (As), los aislados de esta rama se encontraron con muy baja o nula frecuencia en otros continentes. La rama Asiática-americana (AA) se formaba por una fracción de muestras asiáticas y de aislados de poblaciones inmigrantes en

América. Las variantes de esta rama se encontraron solamente en centro y Sudamérica y en Europa estaban restringidas a España. Se ha propuesto ramas filogenéticas menores, como la Norteamericana-1 (NA1).⁹⁶ Estudios adicionales utilizando la secuencia de las regiones E2, E4, E5 y E6 han demostrado una variación intergénica muy fuerte dentro de aislados individuales del VPH-16.^{99,27}

Figura 3. Árboles filogenéticos de las variantes de VPH 16 y 18.

Figura 3. Árboles filogenéticos de las variantes del VPH 16 y 18 obtenidos de diferentes estudios realizados en distintas regiones geográficas del mundo, África (Tanzania), Europa (Alemania y Escocia), Asia (Japón). La construcción de los árboles filogenéticos se determinó a través de comparación de la secuencia un fragmento de 321pb de la RLC. El aislado de referencia del VPH-16, que pertenece a la rama europea, está representado como el aislado G11. Para el VPH-18, el aislado de referencia se localiza en la rama asiático-americana por encontrarse en muestras de Asia y América del sur.⁶⁰

La diversidad intratipo del VPH-18 guarda muchas similitudes con el VPH-16. Mediante un estudio similar al del VPH-16 se determinó la presencia de 3 ramas filogenéticas principales para el VPH-18; la rama Europea (E), Africana (Af) y Asiática-Amerindia (AsAi) (Figura 3).⁶⁰ Este estudio demostró la presencia de 37 variantes, caracterizadas por mutaciones puntuales en 25 posiciones en la secuencia de nucleótidos con respecto al aislado de referencia. El aislado de referencia se obtuvo de una muestra de cáncer cervical de una paciente proveniente del sudeste de Brasil y cuya secuencia se realizó en Alemania.²²

Con estos estudios se ha observado que la diversidad viral no se correlaciona con la ubicación geográfica, sino más bien con la composición étnica de las poblaciones y que la filogenia de las ramas principales del VPH 16 y 18 se asocia con las ramas principales de la evolución de los grupos étnicos humanos.⁶⁰

4.6 LAS VARIANTES DEL VPH EN EL RIESGO DE DESARROLLO DE CÁNCER CERVICAL

Diferentes estudios han indicado que la persistencia viral y el desarrollo de lesiones de alto grado, así como carcinoma cervical están profundamente asociados a la presencia de variantes de VPH. Regiones geográficas con alta prevalencia de algunas variantes de VPH 16 y 18 coinciden con países con alta frecuencia de tumores genitales, por ejemplo: Latinoamérica, África y algunas regiones de Asia. Esta correlación ha motivado numerosos estudios epidemiológicos para determinar si las variantes presentan diferentes propiedades biológicas y patológicas y por lo tanto diferencias en el riesgo de desarrollar cáncer.

Diferentes estudios han mostrado que las variantes no-Europeas de VPH-16 están asociadas con un mayor riesgo de desarrollo de neoplasias cervicales y cáncer anal *in situ*.^{94,93} De manera similar, en un estudio realizado en Brasil se observó que las variantes no-Europeas de VPH 16 y 18 presentan mayor persistencia y riesgo de desarrollar lesiones cervicales.⁸⁹ En dos estudio de casos y controles realizados en México y Costa Rica, se observó una mayor prevalencia de variantes en muestras aisladas de cáncer cervical con respecto a muestras con citología normal.^{8,34} Recientemente se realizó un estudio de seguimiento en mujeres con células escamosas atípicas de significado indeterminado para determinar el riesgo de desarrollar lesiones de alto grado entre variantes del VPH 16 y 18.

En el caso de las variantes de VPH-16, se observó que existe un riesgo mayor para las variantes no-Europeas de generar lesiones de alto grado. En el caso de las variantes de VPH-18, la asociación fue diferente, las variantes de las ramas AsAi y E, presentaron mayor riesgo de desarrollar neoplasias de alto grado que las variantes de la rama Africana.⁹⁵

Para el VPH-18, Hecht et al., (1995) propuso que la variación intratipo en la secuencia del gen E2 estaba asociada a un subtipo con un potencial oncogénico reducido. Esta variante, perteneciente a la rama africana, predominaba en muestras con lesiones premalignas y se encontraba ausente en tumores invasores. En un trabajo realizado por Lizano et al., (1997), se analizó si las variaciones entre los VPH de riesgo oncogénico conocidas pudieran explicar en parte, las diferencias en pronóstico entre diferentes grupos histológicos de carcinomas de cérvix. En este trabajo se encontraron asociaciones importantes de ciertas variantes de los HPV con la edad de las pacientes y los tipos histológicos de los tumores de cérvix. Con relación al VPH-18 se encontraron tres aislados en el análisis de muestras de tumores de origen escamoso, adenoescamoso, adenocarcinoma y carcinoma de células pequeñas. Uno de los hallazgos más interesantes de este estudio fue la asociación, aparentemente exclusiva, entre la variante africana y los tumores de origen escamoso. La variante europea se encontró en los 3 grupos histológicos, excepto en los tumores de células pequeñas. Estos datos sugieren que la variante africana pudiera estar asociada con un comportamiento biológico menos agresivo, dado que los carcinomas escamosos tienen un mejor pronóstico relativo que los tumores de origen glandular y en particular los carcinomas de células pequeñas. En contraste, en los carcinomas de células pequeñas (Carcinomas de cérvix con el peor de los pronósticos), solo se encontró el aislado de referencia, lo que refuerza la idea de una mayor agresividad de esta clona con respecto al aislado africano. En un estudio realizado en Holanda con muestras provenientes de tres países, reforzó la propuesta de variantes africanas con menor capacidad oncogénica. En este estudio se observó la presencia de las variantes africanas de manera casi exclusiva en tumores de tipo escamoso, a diferencia de los adenocarcinomas, donde se observó principalmente la presencia de variantes de la rama Europea y AsAi.²¹ Además de las asociaciones con tipos histopatológicos, se ha determinado la frecuencia de las variantes de VPH en muestras con citología normal y con lesiones de alto y bajo grado.⁴⁸ Se encontró a

la variante de la rama Africana en mayor frecuencia en muestras normales y lesiones premalignas; mientras que la variante Europea, aparece principalmente en lesiones de alto grado. Por otra parte, la distribución de la variante de referencia fue similar en los diferentes grados de lesión. La variabilidad nucleotídica en la secuencia gen E2, la asociación de estas variantes con tipos histológicos específicos, el menor riesgo de desarrollo de lesiones cervicales y su frecuencia en lesiones de bajo grado ha sugerido que las variantes de la rama Africana presentan un potencial oncogénico reducido.

4.6.1 Diferencias funcionales de la variación intratipo del virus del papiloma

Los cambios en la secuencia de los elementos codificantes y/o de las regiones de control podrían explicar en parte, la diversidad patogénica observada en los estudios epidemiológicos de las variantes de VPH 16 y 18. Sin duda, la modificación en la secuencia de aminoácidos en los genes E6 y E7 afecta su habilidad para unirse o interactuar con proteínas celulares y por lo tanto su capacidad inmortalizante y transformante. El estudio de la secuencia del gen E6 en variantes del VPH-16 ha mostrado que los cambios en los aminoácidos detectados en las variantes, se ubican dentro de regiones cruciales para la interacción con p53.⁹⁶ El impacto de los cambios en la secuencia de a.a. de las variantes de E6 se traduce diferencias funcionales, tales como la degradación de p53 y en la habilidad de E6 para inhibir la diferenciación celular. El estudio de la funcionalidad de estos cambios en las variantes, demostró que la proteína E6 de la variante de la rama Asiático-Americana promueve la degradación en mayor grado de p53, además de mantener un mayor nivel de inhibición de la diferenciación en queratinocitos con respecto a la variante Europea de E6. La comparación de la variante AA y E con el aislado de la rama Africana, permitió observar que la proteína E6 degrada con menor eficiencia a la proteína p53 e inhibe menos la diferenciación celular con respecto a las variantes AA y Af.⁸¹

Algunas variantes Europeas del VPH-16 contienen cambios en la secuencia de a.a. de la proteína E6 (L83V). La asociación de esta variante (L83V) con infecciones más persistentes y un mayor riesgo de progresión en lesiones de bajo grado ha propuesto un comportamiento oncogénico más agresivo para esta variante con respecto al aislado de referencia, también perteneciente a la rama Europea.^{49,98} Recientemente, se observó que al comparar esta variante con el prototipo de E6, el aislado L83V aumenta la activación de la

vía de señalización MAPK y potencia la transformación celular en cooperación con la vía Notch-1 con respecto al aislado de referencia.¹⁷ La comparación de la capacidad para promover la degradación de p53 y Bax entre variantes de E6 del VPH-16, demostró niveles similares de degradación de p53 entre el aislado de referencia y la variante L83V. No obstante, el aislado L83V mostró una degradación más eficiente de Bax y unión a mayor grado a la proteína E6BP.⁴⁶ Lo que indicaría que la variación en la secuencia de aminoácidos de E6 del VPH-16 puede alterar la actividad de la oncoproteína y repercutir en su potencial oncogénico.

Diversos estudios han sugerido que la variación en la secuencia de los sitios de unión de diferentes factores de transcripción dentro de la región larga de control, tales como AP-1, SP-1, Oct-1, TEF-1 y YY1, podría alterar la expresión de los oncogenes y la replicación viral. Mediante ensayos con genes reporteros, se observó que la actividad transcripcional de los promotores entre los aislados de la rama Europea era similar. La comparación con las variantes asiático-americanas y norteamericana 1, demostró mayor actividad en los promotores de los aislados de la rama AA y NA-1 en relación al prototipo.⁴² El análisis de los promotores de variantes de las ramas Europea (aislado de referencia), Asiático-americana y Africana demostró diferencias muy importantes en el índice de replicación. Las variantes africanas y europeas mostraron el nivel más bajo de replicación, además de mantener la actividad transcripcional más baja con respecto a las variantes asiático-americanas. La posible explicación de estas diferencias podría ser la alteración del sitio de unión del factor SP-1 en las variantes africanas y la adquisición de un sitio adicional para SP-1 en las variantes americanas.³⁷

Aunque hay pocos estudios sobre la actividad transcripcional de los promotores en variantes de VPH-18. Los ensayos con genes reporteros han demostrado que el promotor de la variante asiático-americana B18-3 mantiene una actividad mayor que algunos aislados de la rama Europea.⁷⁷ Cabe mencionar, que en este estudio no se incluyó ninguna de las variantes de la rama Africana. Determinar las diferencias en la actividad de las variantes de la rama Africana en relación a los aislados asiático-americano y europeo, podría ayudar a explicar el comportamiento biológico menos agresivo propuesto para la variante africana.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los cambios nucleotídicos del oncogen E6 de variantes del VPH-18, en relación a los aspectos funcionales de sus transcritos y proteínas.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar y clonar los genes E6 de las variantes del VPH-18 en vectores de expresión para células eucariontes.
- Realizar transfecciones estables con los plásmidos construidos en las líneas celulares MCF-7, C33A y NIH3T3.
- Analizar la expresión de los transcritos de E6 en las líneas celulares transfectadas con las variantes del VPH-18.
- Comprobar el patrón de expresión del oncogen E6 en tumores de cérvix positivos a las diferentes variantes del VPH-18.
- Determinar los niveles de las proteínas p53 y Bax presentes en las líneas celulares transfectadas con las variantes de E6 de VPH-18.
- Analizar el efecto de la variación intratipo del oncogen E6 de VPH-18 para promover la degradación *in vitro* de p53.
- Determinar la capacidad oncogénica de las variantes de E6 del VPH-18 en ensayos de formación de tumores en ratones desnudos.
- Realizar mutagénesis dirigida sobre la secuencia del gen E6, con el fin de determinar los cambios implicados en los distintos patrones de expresión.
- Determinar los niveles de la proteína p53 en las células transfectadas con las mutaciones realizadas sobre E6 de la clona africana.

7. HIPÓTESIS

Las variantes de VPH tipo 18 encontradas en la población mexicana presentan diferencias funcionales con respecto a la clona de referencia en el gen E6, lo cual podría repercutir en la capacidad oncogénica del virus.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Muestras biológicas

El material biológico para este estudio fue obtenido de biopsias de pacientes con tumores de origen escamoso, adenoescamoso, adenocarcinoma y carcinoma de células pequeñas que acudieron al Instituto Nacional de Cancerología. El ADN de estas biopsias se extrajo mediante métodos convencionales de digestión con proteinasa K y purificación con fenol-cloroformo. Estas muestras fueron identificadas previamente como positivas a VPH-18 y clasificadas como variantes de acuerdo al análisis de fragmentos del gen L1 y de la región larga de control.⁴⁷

8.2 Caracterización de los cambios nucleotídicos de los genes E6 y E7 de variantes del VPH tipo 18

La identificación de los cambios presentes en el marco de lectura de los oncogenes E6 y E7 presentes en las variantes del VPH tipo 18, se determinó mediante la amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 1) y secuenciación directa con el sistema Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech). El radioisótopo de fósforo-33 (Amersham Pharmacia Biotech) para el marcaje de los nucleótidos terminales. La mezcla de la reacción se sometió a 50 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: 95° C por 30 segs, 50° C por 30 segs y 72° C por 1 min. El producto obtenido se desnaturalizó a 70° C por 10 min. La electroforesis del en un gel desnaturalizante de acrilamida al 30% con 8% de urea, a un voltaje de 1800 volts y 70 Watts, por un tiempo de 2.5hrs. El gel de acrilamida se expuso a una placa fotográfica XK-1(Kodak) para obtener la secuencia de los plásmidos. La lectura se determinó de forma manual y las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del compendio del VPH para determinar los cambios de las variantes.⁸⁵

8.3 Cultivo celular

Las líneas celulares MCF-7 (Cáncer de mama), C33A (Cáncer de cérvix) y NIH-3T3 (Fibroblastos de ratón) se cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero bovino fetal, a una temperatura de 37°C al 5 % de CO₂.

8.4 Construcción de los vectores de expresión con los aislados de E6 de VPH-18

Las variantes del oncogen E6, así como la clona de referencia se clonaron en vectores de expresión en células eucariontes. El proceso de clonación de insertos de ADN en vectores de expresión se describe a continuación: La amplificación del marco de lectura de las variantes de E6 de VPH-18, se realizó a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el uso de oligonucleótidos específicos (Tabla 1). Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 495 pb (del nucleótido 105 al 581), con diferentes sitios de restricción dependiendo del vector de expresión a usar. Se utilizaron los vectores de expresión pcDNA 3.1 (Invitrogen) y pxj40 (Proporcionado por el Dr. E Manser); ambos vectores contienen un promotor de citomegalovirus y genes de resistencia a diferentes antibióticos (Ampicilina y Geneticina), además de diferentes sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (Figura 4). La diferencia más importante entre los vectores consiste en la presencia de una secuencia nucleotídica, que genera una proteína de fusión en el extremo carboxilo de la proteína de interés denominada “Flag”. Esta secuencia permite la identificación indirecta de la proteína E6 con anticuerpos comerciales anti-Flag (Sigma).

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos para la secuencia de los genes E6 y E7

| Nombre del oligonucleótido | Sitio de corte | Secuencia (5'→3') | Tamaño del producto (pb) |
|----------------------------|-----------------|---|--------------------------|
| E6 pcDNA sentido | <i>Bam</i> HI | 5'-GGG GGA TCC ATG GCG CGC TTT GAA GAT CCA ACA -3' | 495 |
| E6 pcDNA antisentido | <i>Eco</i> RI | 5'- GGG GAA TTC TTA TAC TTG TGT TTC TCT GCG TCG - 3' | |
| E6 pxj40 sentido | <i>Bam</i> HI | 5'-GGG GGA TCC ATG GCG CGC TTT GAA GAT CCA ACA -3' | 495 |
| E6 pxj40 antisentido | <i>Hind</i> III | 5'- GGG AAG CTT TTA TAC TTG TGT TTC TCT GCG TCG - 3' | |
| E7 sentido | <i>Bam</i> HI | 5'- GGG GGA TCC ATG CAT GGA CCT AAG GCA ACA TTG - 3' | 336 |
| E7 antisentido | <i>Eco</i> RI | 5'- GGG GGA ATT CTT ACT GCT GGG ATG CAC ACC ACG - 3' | |

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de las variantes del gen E6 y E7. La secuencia de los sitios de restricción de las enzimas utilizadas para la clonación en los vectores de expresión se indica en negritas.

Las secuencias amplificadas de las variantes de E6 se purificaron mediante columnas (Roche) y se trataron con diferentes enzimas de restricción. Para la clonación de las variantes de E6 en el vector pcDNA3.1, se utilizaron las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI (Gibco). En el caso del vector pxj40, la digestión se realizó con las enzimas *Hind* III y *Bam* HI (Gibco). Las condiciones empleadas para la digestión son las siguientes; 500 ng del producto purificado, 1 U de la enzima de restricción, 1X del buffer de reacción y el volumen de agua necesario para obtener un volumen de 50 μ l. La digestión se realizó durante 2 hrs a 37°C. Para la digestión de los vectores, la reacción consistió en digerir 2 μ g del vector con 2 U de sus respectivas enzimas en presencia de una concentración de 1X de buffer de reacción. El volumen final de la reacción fue 50 μ l y el tiempo de digestión fue de 3 hrs a 37°C. Los fragmentos de las variantes de E6 y vectores digeridos se purificaron mediante columnas para su ligación.

La unión de las secuencias de E6 digeridas a sus respectivos vectores fue catalizada por la enzima “T4 DNA ligasa” (Gibco). La ligación se realizó a una temperatura de 16 °C durante 12 hrs. Las condiciones fueron las siguientes: 2 μ l del vector digerido, 20 μ l del fragmento amplificado digerido, 4 μ l del buffer de reacción y 1 U de ligasa en un volumen de 40 μ l.

Las bacterias utilizadas para transformación son las cepas de *Escherichia coli* DH5-alfa. La transformación de las bacterias competentes se realizó con 50 ng de los plásmidos recombinantes. El crecimiento de bacterias transformadas se realizó en medio de Luria Bertani (Sigma) suplementado con 150 μ g/ml de ampicilina a 37 °C durante 12 hrs. La amplificación, extracción y purificación de los plásmidos se realizó mediante columnas de purificación (Qiagen). La presencia de los diferentes genes de E6 dentro de los plásmidos se corroboró por la digestión los plásmidos obtenidos y secuenciación de los fragmentos obtenidos.

Figura 4. Mapa del vector de expresión pcDNA.

Figura 4. Vector de expresión para células eucariontes pcDNA 3.1 (5446 pb). El plásmido pcDNA contiene un promotor de citomegalovirus y genes de resistencia a Ampicilina y Neomicina.

8.5 Transfección celular con los plásmidos con las variantes de E6 del VPH-18

Las líneas celulares MCF-7, C33A y NIH3T3 se transfectaron con los plásmidos de expresión de los genes E6 variantes de VPH-18. La transfección de las líneas celulares se realizó mediante liposomas, Lipofectin Reagent (Gibco BRL). La cantidad de ADN transfectado fue de 4 µg de cada plásmido. Como control positivo de la transfección se utilizó al plásmido GFP (Green fluorescent protein), el cual genera una proteína en las células transfectadas que emite una fluorescencia verde al observarse en luz UV.

Con el objetivo de generar clonas celulares con una expresión estable de las variantes del gen E6, las células transfectadas se seleccionaron con geneticina (Sigma). El tratamiento de las células transfectadas se inició 24 hrs posteriores a la transfección y la concentración empleada fue de 800 µg/ml de medio. El proceso de selección se mantuvo constante durante el cultivo de las células. La selección de clonas estables se realizó mediante dilución. Los plásmidos pcDNA y pxj40 se transfectaron de igual forma que las construcciones de E6 para ser utilizados como control.

8.6 Expresión de transcritos del gen E6 de variantes del VPH-18 en líneas celulares y tumores de CaCU

La expresión del transcrito de las variantes del oncogen E6 en las clonas transfectadas se analizó a través de ensayos de reacción en cadena de la transcripción reversa (RT-PCR). Para la extracción el ARN total se utilizó el sistema RNAeasy (Invitrogen). El procedimiento empleado en la obtención del ARN total de los tumores se describe a continuación: Las biopsias de tumores positivos a VPH-18, previamente clasificados como variante Europea, variante Africana y clona de referencia (AsAi), se disgregaron con un homogenizador en un volumen de 500 µl de solución de lisis del sistema RNAeasy (Invitrogen). La cuantificación y determinación de la calidad del ARN se realizó mediante espectrofotometría y con geles desnaturalizantes de formamida, respectivamente.

La síntesis del ADN complementario se realizó a través del sistema de transcripción reversa utilizando 1 µg de ARN total. El ADNc se utilizó para analizar de la expresión de los transcritos de E6 con los oligonucleótidos específicos para E6.

8.7 Extracción de proteínas y western blot de E6, p53 y Bax

Para la extracción de las proteínas totales, las células transfectadas con los diferentes aislados de E6 se trataron con 300 µl solución de lisis celular suplementado con inhibidores de proteasas (100 mM Tris (pH 8), 100 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1% apoprotein, 1 mM PMSF). La calidad de las proteínas obtenidas se corroboró mediante la electroforesis de las mismas en geles de poli-acrilamida teñidos con azul de coomasie al 2%. La detección de las proteínas E6, p53 y Bax se llevó a cabo mediante anticuerpos específicos (Santa Cruz Biotechnology). Para los ensayos de western blot se emplearon 15 µg de los extractos protéicos totales. Estas proteínas se separaron en geles de poliacrilamida del 10% (en el caso de E6, la concentración del gel fue al 18%) para su transferencia a membranas de nitrocelulosa en cámara húmeda (Amersham). La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4 °C utilizando una dilución 1:1000 del anticuerpo primario. Para la detección del complejo proteína-anticuerpo primario se emplearon anticuerpos peroxidados utilizando el sistema de quimioluminiscencia (ECL) para su visualización. La normalización de la cantidad de proteínas totales se determinó

utilizando anticuerpos que reconocen a la Actina, una proteína que se expresa de forma constitutiva (Santa Cruz Biotechnology).

8.8 Ensayo de degradación *in vitro* de p53

El ensayo de degradación *in vitro* de p53 se llevó a cabo a través del sistema de transcripción y traducción *in vitro* en lisados de reticulocitos de conejo (Promega). El marco de lectura de los diferentes aislados de E6, así como de p53 contenidas dentro del plásmido pcDNA fueron utilizadas como templados para la obtención de las proteínas correspondientes. La transcripción y traducción de las proteínas se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Con el objetivo de monitorear los niveles de degradación de la proteína p53, la síntesis de esta proteína se llevó a cabo en presencia de metionina marcada con el radioisótopo azufre-35. La determinación de los niveles de degradación de p53 se describe a continuación: 10 µl de la proteína p53 [S³⁵] traducida *in vitro* se incubaron con 5 µl de cada uno de los diferentes aislados de la proteína E6 traducida de igual forma. La incubación se realizó durante 3 hrs. a 30 °C, la reacción de degradación se detuvo mediante la adición de la solución de carga de proteínas. El producto de esta reacción se visualizó por fluorografía posterior a su separación en un gel de poli-acrilamida.

8.9 Ensayo de formación de colonias en agar suave

Las células inmortalizadas de fibroblastos de ratón NIH-3T3 transfectadas con los aislados de E6 y pcDNA se emplearon en el ensayo de formación de colonias independientes de anclaje. Para evaluar la independencia de anclaje celular se determinó la formación de colonias en agar suave. Se resuspendieron 3×10^3 células en 0.5 ml de medio conteniendo 10% de SFB, 4.5 g/l glucosa, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomycin y 0.5 % de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma). La mezcla se colocó sobre 0.5 ml de medio sólido constituido de DMEM con 0.7 % de agarosa en cajas de 24 pozos. Las colonias se contaron 15 días más tarde. El ensayo se realizó por triplicado.

8.10 Generación de tumores en ratones desnudos Balb/Nu

Para el ensayo de generación de tumores en ratones desnudos se utilizaron ratones hembras BALB/c-Nu de 6 a 8 semanas de edad. Estos ratones se inyectaron con las células

NIH-3T3 transfectadas con los aislados de E6 y con vector pcDNA, cada grupo estaba formado por 8 ratones. Las células transfectadas se despegaron con tripsina al 1% y se cuantificaron 1×10^6 células para inyectar subcutáneamente cada flanco de los ratones en un volumen de 200 μ l de DMEM/F12. La medición de los tumores se realizó cada semana usando un vernier para medir el diámetro de los tumores y el volumen tumoral se calculó con la siguiente formula: $V_t = (2ab) \pi/6$, donde “a” y “b” corresponde al diámetro mayor y al diámetro menor del tumor respectivamente. Al cabo de un mes posterior a la inyección de las células, los ratones se sacrificaron para analizar las características histológicas de los tumores.

8.11 Mutagénesis dirigida sobre el marco de lectura de E6

Para generar los cambios presentes en la secuencia del oncogen E6 de la variante Africana sobre el plásmido que contiene la secuencia de referencia del oncogen E6 (excepto aquellos cambios compartidos con el aislado Europeo de E6), se utilizó el sistema de mutagénesis dirigida al sitio transformador (Clontech). La secuencia de los oligonucleótidos empleados y la posición de los cambios que se generaron se describe a continuación, el nucleótido a cambiar se encuentra subrayado: T251C (5'-GAATTTGCATTCAAAGATTTATTTG-3'); G266A (5'-GATTTATTTGTAGTGTATAGAG-3'); T317C (5'-GTATAGATTTCTATTCTAGAATTAG-3'); C342T (5'-GAATTAAGATATATTATTCAGAC-3'); G374A (5'-GAGACACATTAGAAAAAC TAAC-3'); C491A (5'-GATTTCAAAAAATAGCTGGGC-3'); y A458G (5'-GACAGGAGCGACTCCAACGAC-3'). Para la selección de los aislados con las respectivas mutaciones se modificó el sitio de unión de la enzima de restricción Sma I (5'-CTCCCGGTAGCTTGTATATC-3'). La presencia de los cambios nucleotídicos de la variante africana de E6 en las clonas obtenidas del aislado de referencia se confirmó mediante secuenciación. Los diferentes plásmidos obtenidos se utilizaron para transfectar la línea celular MCF-7. El RNA total y las proteínas totales se obtuvieron de las células transfectadas para analizar los patrones de expresión de E6 mediante RT-PCR y los niveles de proteínas celulares mediante western blot.

9. RESULTADOS

9.1 Amplificación y caracterización de los cambios en las variantes de los oncogenes E6 y E7 de VPH-18

La amplificación del marco de lectura de las variantes de los oncogenes E6 y E7 se obtuvo de muestras previamente identificadas y clasificadas como aislado de referencia, variante Europea y Africana a través del análisis del gen L1.⁴⁷ El análisis de la variación intratipo en los oncogenes virales se realizó mediante secuenciación directa con oligonucleótidos específicos para el marco de lectura de los genes E6 y E7 (Tabla 1).

La secuencia del marco de lectura del oncogen E6 de la variante Europea demostró la presencia de 3 cambios silenciosos en las posiciones 287, 485 y 549, con respecto a la variante Asiática Amerindia (referencia). En el caso de la variante Africana, la secuencia de E6 presenta 10 cambios (251, 266, 287, 317, 342, 374, 485, 491, 548 y 549). Dos cambios generan la transición de los aminoácidos histidina por tirosina en la posición 342 y asparagina por lisina en la posición 491. Cabe mencionar que el sitio 491, es un sitio conservado entre los VPH de alto riesgo, por lo cual su cambio podría afectar el comportamiento biológico del oncogen E6 en la variante Africana. En el caso de la secuencia del oncogen E7, una secuencia más conservada entre los papilomas, las variantes estudiadas presentan menos cambios. La variante Europea presenta solo un cambio en la posición 751 (C x T) sin llegar a afectar la secuencia de la proteína. Al estudiar la secuencia de la variante Africana se observó la presencia de 2 cambios en las posiciones 640 (C x T) y 864 (A x G). El cambio en la posición 864 genera una transición en el codón que codifica para asparagina presente en el aislado de referencia a serina en la variante Africana (Tabla 2).

La presencia de esta variación intratipo en los oncogenes virales, en particular aquellos cambios que resultan en la transición en los aminoácidos, podría afectar la forma en que las proteínas E6 y E7 se traducen o interactúan con otros elementos celulares, lo cual resultaría en fundamento muy lógico para el comportamiento biológico diferencial observado entre las variantes del VPH-18.

Tabla 2. Secuencia de los cambios en los oncogenes E6 y E7 de variantes del VPH-18

| | Cambios en el Oncogen E6 | | | | | | | | | | Cambios en el Oncogen E7 | | | | | | | |
|------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|
| | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 5 | 5 | Compendium de | 6 | 7 | 7 | 8 | 8 | 8 | Compendium |
| | 5 | 6 | 8 | 1 | 4 | 7 | 8 | 9 | 4 | 4 | de VPH | 4 | 5 | 7 | 0 | 6 | 6 | de VPH |
| | 1 | 6 | 7 | 7 | 2 | 4 | 5 | 1 | 8 | 9 | | 0 | 1 | 0 | 6 | 4 | 5 | |
| AsAi | T | G | C | T | C | G | T | C | A | C | | C | C | A | G | A | C | |
| E | -- | -- | G | -- | -- | -- | C | -- | -- | A | (HPV18v2E67) | -- | T | -- | -- | -- | -- | (101) |
| Af | C | A | G | C | T | A | C | A | G | A | | T | -- | -- | -- | G | -- | (4039) |
| | Cambios en la Oncoproteína | | | | | | | | | | Cambios en la Oncoproteína | | | | | | | |
| | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5 | 6 | 7 | 9 | 9 | | |
| | 9 | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 4 | 4 | 7 | 4 | 1 | 3 | 2 | 2 | | |
| | | | | | | | 7 | 9 | 8 | 9 | | | | | | | | |
| AsAi | Phe | Val | Pro | Phe | His | Leu | Phe | Asn | Arg | Arg | | Pro | Ala | Met | Glu | Asn | Asn | |
| E | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | (HPV18v2E67) | -- | -- | -- | -- | -- | -- | (101) |
| Af | -- | -- | -- | -- | Tyr | -- | -- | Lys | -- | -- | | -- | -- | -- | -- | Ser | -- | (4039) |

Tabla 2. Alineamiento de la secuencia de los genes y proteínas E6 y E7 del aislado de referencia (AsAi) con la secuencia de las variantes identificadas de la rama Europea (E) y Africana (Af). Las posiciones a nivel de nucleótido y aminoácido que permanecen sin cambios en las variantes de indica de la siguiente forma (--).

9.2. Análisis de la expresión de las variantes del oncogen E6 de VPH-18 en las líneas celulares transfectadas y tumores de CaCU

Con el objetivo de determinar si los cambios presentes en las variantes del oncogen E6 afectan su expresión, la línea celular de cáncer de mama, MCF-7 se transfectó con las variantes de E6 clonadas en los vectores pcDNA 3.1 y pxJ40. Las células transfectadas con el vector vacío se utilizaron como control. Las células transfectadas se seleccionaron con el antibiótico geneticina durante 4 semanas para obtener clonas estables. Posterior a la selección celular, se realizó una clonación por dilución para obtener diferentes clonas celulares. La integridad de gen E6 en cada una de las clonas se analizó mediante la

obtención del ADN y la amplificación del marco de lectura de E6 por medio de PCR con oligonucleótidos específicos. Este procedimiento se realizó en cada una de las clonas de las respectivas variantes de E6. La selección de las clonas celulares con genética se mantuvo durante todo el tiempo que se cultivaron las células.

La determinación del patrón de expresión del oncogen E6 de las variantes del VPH-18, se realizó mediante la extracción del ARN total de las clonas y se analizó mediante RT-PCR. El análisis de expresión demostró diferencias muy importantes en la expresión de los transcritos del oncogen E6. Como se puede observar en la figura 5a, las células transfectadas con la variante Europea y de referencia expresan mayores niveles del transcrito completo del gen E6. Las clonas transfectadas con la variante Africana de E6, si bien expresan el transcrito completo de E6, la mayor proporción la representa el transcrito E6*I. La identidad del transcrito E6*I se corroboró por secuencia, mediante la determinación del sitio donador en la posición 233 y el sitio aceptor en la posición 416.

Para comparar los patrones de expresión de las variantes del gen E6 observados en la línea celular MCF-7 de mama con otra línea celular, pensando que el patrón de expresión observado depende de la línea celular, la transfección de la línea celular C-33A de cérvix se realizó con las variantes del gen E6 clonadas en el vector pxJ40. De igual forma que en las células MCF-7, las células C-33A transfectadas se seleccionaron y se clonaron por dilución para la obtención de clonas estables. La integridad del gen E6 en las clonas celulares fue analizada mediante su amplificación por medio de PCR. En la figura 5b se puede observar el patrón de expresión de las clonas de la línea C-33A obtenidos por RT-PCR. De manera similar a las células MCF-7 transfectadas, las células C-33A transfectadas con el aislado de Referencia y variante europea presentan mayores niveles de expresión del transcrito E6 con respecto al transcrito E6*I. La variante Africana por el contrario mantiene mayores niveles de expresión del transcrito E6*I. Estos ensayos se realizaron por triplicado usando diferentes clonas, confirmando que el resultado obtenido en las clonas celulares de la línea MCF-7 es reproducible en la línea celular C-33A.

De manera paralela al análisis de expresión de las variantes de E6 en las líneas celulares transfectadas y con el objetivo de determinar el patrón de transcripción del oncogen E6 en biopsias de CaCU positivas a VPH-18, se analizaron 11 biopsias de CaCU. La

caracterización de los aislados presentes en los tumores demostró la presencia del aislado asiático-americano en cuatro tumores, la variante Europea estaba presente en seis tumores, mientras que tres tumores resultaron positivos a la variante Africana.

Figura 5. Expresión del oncogen E6 de variantes del VPH-18 en líneas celulares.

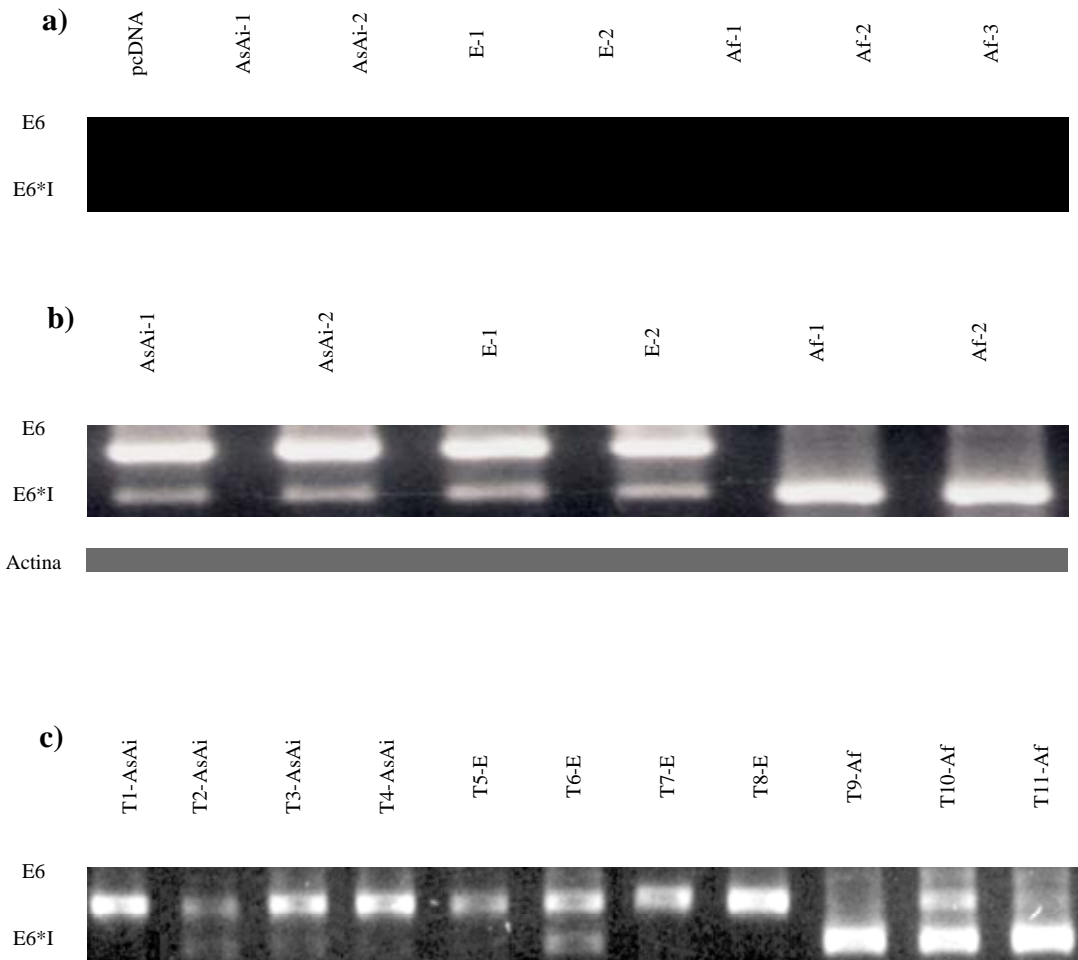


Figura 5. Análisis de expresión del gen E6 de las variantes del VPH-18. a) El patrón de expresión de las variantes de E6 clonadas en el vector pcDNA se determinó en diferentes clonas celulares obtenidas de la transfección de la línea celular MCF-7, cada columna indica diferentes clonas analizadas. b) Ensayo semi-cuantitativo de la expresión de E6 de las variantes clonadas en el vector pxJ40 transfectadas en la línea celular C-33A, la expresión se normalizó con la amplificación de un fragmento del gen actina. c) Expresión de E6 en los tumores de CaCU, T1-T4 corresponde al aislado de referencia, en el caso de las muestras T5-T8 contienen la variante Europea y los tumores del T9-T11 contienen al aislado de la rama Africana del VPH-18.

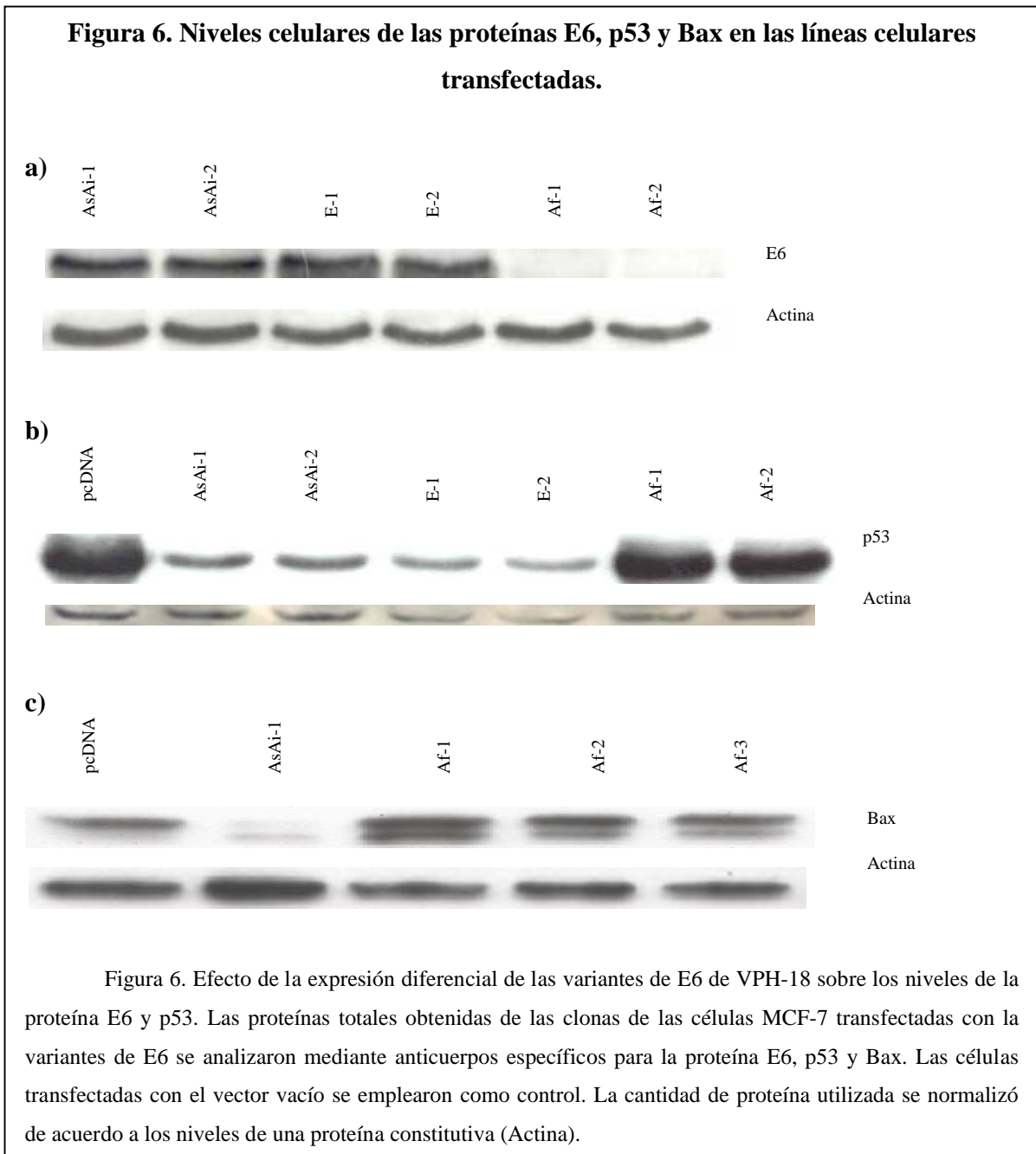
El patrón transcripcional de las variantes de E6 se estudió a través de RT-PCR, observando una correlación muy importante entre el resultado obtenido entre las células transfectadas con el patrón de expresión de E6 en las biopsias de los tumores. Una mayor expresión del transcrito E6 completo en los tumores con el aislado de referencia, así como en los tumores con la variante Europea. Con respecto a los tumores con la variante Africana, de manera similar a las células transfectadas, se observó un patrón de expresión con una predominante expresión del transcrito E6*I con respecto al transcrito completo de E6 (Figura 5c). Estos resultados sugieren que los cambios presentes en la variante Africana de E6 afectan el procesamiento del transcrito de E6, resultando en la reducción en los niveles del transcrito completo de E6.

9.3. Niveles de expresión de la proteína E6, p53 y Bax en las líneas celulares transfectadas con las variantes del oncogen E6

Con la finalidad de conocer el efecto del patrón de expresión de E6 observado en las variantes sobre los niveles de sus respectivas proteínas, se determinaron los niveles de las proteínas E6 en las clonas celulares. Como se puede observar, las células transfectadas con el aislado de referencia y la variante Europea mantienen mayores niveles de proteína E6 con respecto a las células con la variante Africana, donde los niveles de proteína E6 son mínimos. El mismo resultado se observó en las diferentes clonas celulares analizadas. Si bien, los niveles de expresión del transcrito completo de E6 de las variantes correlacionó con los niveles de proteínas de E6, mediante estos ensayos no se logró detectar a la proteína E6*I en las células transfectadas (Figura 6a).

La proteína supresora de tumores p53 es el blanco celular más conocido de la oncoproteína E6. E6 promueve la degradación de p53 al formar un complejo con la proteína celular E6AP, lo que permite una interacción de manera directa con p53 para degradarla a través del sistema de degradación proteosómica. Con el objetivo de conocer los niveles de la proteína p53 presentes en las células transfectadas con los diferentes aislados de E6, los niveles de la proteína p53 se analizaron mediante western blot empleando anticuerpos específicos. Las células transfectadas con el vector vacío se emplearon como control. La presencia de la oncoproteína E6 en las células transfectadas

con los aislados de la variante Asiático-americana y Europea resultó en bajos niveles de p53 con respecto a las células control. La reducción en los niveles de la proteína E6, observada en las células transfectadas con la variante Africana se refleja en mayores niveles de la proteína p53 con respecto a las células con los aislados de referencia y europeo (Figura 6b).

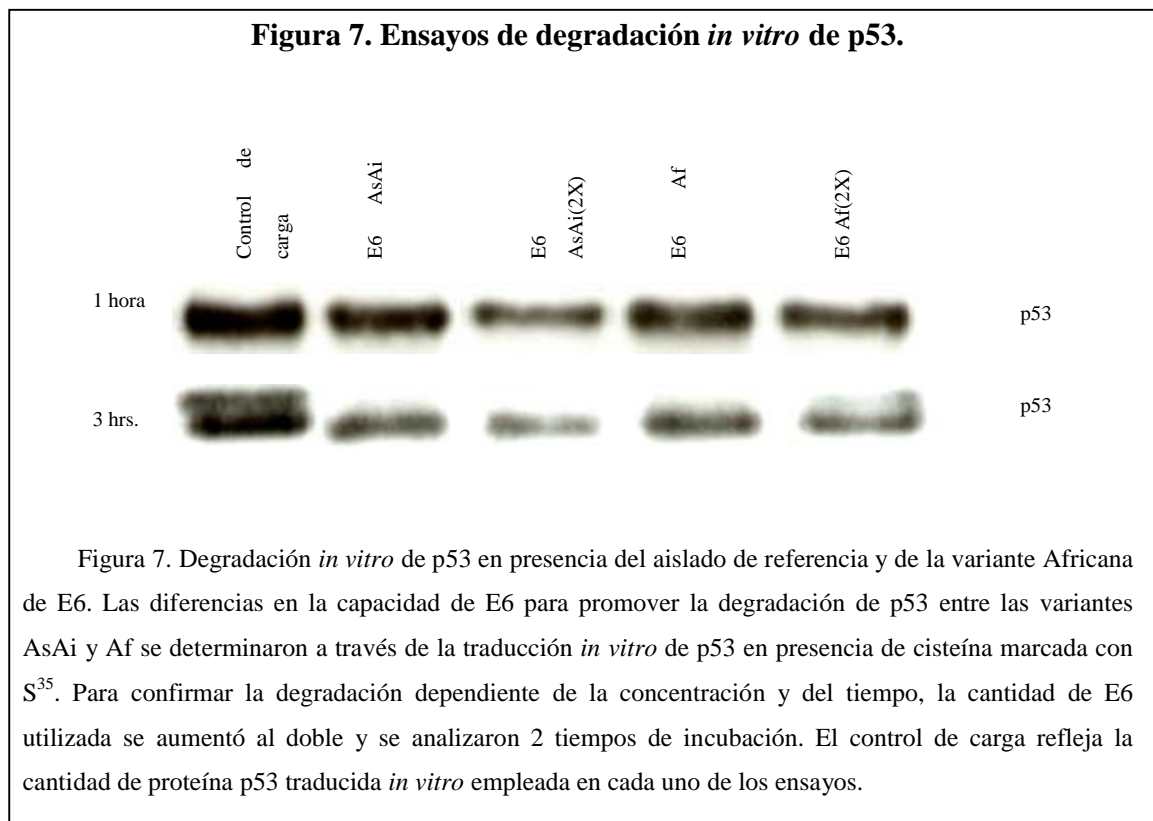


Para correlacionar los niveles de p53 presentes en las células transfectadas con las diferentes variantes, con otras proteínas involucradas en apoptosis dependientes de p53, se analizaron los niveles de la proteína Bax. Esta proteína se encuentra bajo la acción de p53, de tal forma que p53 activa su transcripción para iniciar la apoptosis celular. Se observó que los niveles de Bax correlacionaron con los niveles de p53 en cada una de las variantes. Los aislados de E6 de la rama Africana al mantener mayores niveles de p53 contienen mayores niveles de la proteína Bax. En el caso de las células con el aislado de referencia, los niveles de Bax son mínimos, resultado que correlaciona con los niveles de p53 observados en las células con este aislado (Figura 6c).

9.4 Efecto de la variación intratipo de E6 sobre la degradación *in vitro* de p53

Los ensayos de expresión de los transcritos de E6 de las variantes de VPH-18 demostraron diferencias muy importantes en el patrón de expresión, los cuales afectan los niveles de la proteína E6 presentes en las células. Los aislados europeo y asiático-americano de E6 mantienen mayores niveles de la proteína E6 en relación a la variante Africana, la cual presenta menores niveles del transcrito E6 completo como resultado de un mayor nivel de expresión del transcrito E6*I. Estos resultados son una importante evidencia de que los cambios presentes en la secuencia del gen E6 de las variantes de VPH-18 afectan la expresión y los niveles de traducción de la proteína E6. Sin embargo, las variaciones presentes en el aislado africano de E6 no solamente podrían afectar la expresión de E6, los cambios que se generan a nivel de aminoácidos en la variante de E6 podrían alterar la interacción con otras proteínas celulares, tales como p53. Para estudiar el efecto de los cambios en aminoácidos identificados en la variante africana de E6 sobre la degradación *in vitro* de p53, se utilizó el sistema de transcripción y traducción *in vitro* en reticulocitos de conejos. Este sistema permite evaluar las diferencias en la capacidad de las variantes asiático-americana y africana de E6 para promover la degradación de p53 independiente de las diferencias observadas a nivel de transcripción. La transcripción y traducción en reticulocitos mantiene el sistema de degradación proteosómica utilizado por E6 para promover la degradación de p53, no obstante, el mecanismo implicado en el procesamiento de transcritos se encuentra ausente.

Para monitorear la degradación de p53 en presencia de las variantes de E6, la traducción *in vitro* de p53 se realizó utilizando el aminoácido cisteína marcada con el radioisótopo S³⁵. La incubación de p53 con la proteína E6 referencia claramente reduce los niveles de p53, con respecto al control de carga. Como podría esperarse la degradación de p53 fue dependiente de la concentración de E6 y del tiempo de interacción entre ambas proteínas, es decir, el aumento en la concentración de la proteína E6 resulta en una mayor degradación de p53 (Figura 7). Con respecto a capacidad de la variante africana de E6 para promover la degradación de p53, se observó que el nivel de degradación fue similar al que presenta el aislado de referencia de E6. Si bien los cambios en la secuencia de nucleótidos del gen E6 de la variante africana afectan su patrón de expresión, los cambios que se observan en la secuencia de aminoácidos no afectan la capacidad de E6 para promover la degradación de p53 (Figura 7).



9.5. Determinación de la capacidad oncogénica de las variantes de E6 de VPH-18

La habilidad de generar colonias independientes del anclaje en agar suave y de formar tumores en ratones atímicos son las características más importantes que distinguen a las células transformadas. La transfección de la línea celular NIH-3T3, una línea celular inmortalizada de origen murino, permitió evaluar las diferencias de las variantes del oncogen E6 para transformar el comportamiento biológico de esta línea celular.

La formación de colonias de las células NIH-3T3 transfectadas con las variantes de E6 se determinó mediante su crecimiento en agar suave. Después de dos semanas de incubación se determinó el número de colonias para cada variante de E6, cada ensayo se realizó por triplicado. Las células NIH-3T3 transfectadas con el vector vacío se utilizaron como control. El número de colonias obtenido por cada variante demostró diferencias muy importantes en la capacidad de E6 para promover la transformación de esta línea celular. El promedio de colonias obtenido por el aislado de referencia de E6 fue muy similar al observado para el aislado de la rama europea. Por el contrario, las diferencias entre el número de colonias en las células con el aislado africano de E6 con respecto a la referencia y variante europea fue notoria. El número de colonias observado en las clonas con la variante africana fue de 5 a 4 veces menor en relación al promedio de colonias para el aislado de referencia y variante europea de E6 respectivamente (Tabla 3). Cabe mencionar que además de que la variante africana de E6 generó menos colonias, su tamaño fue visiblemente menor en relación a las colonias obtenidas con las variantes Asiático-americana y Europea.

Para corroborar los resultados observados *in vitro*, se evaluó la habilidad de las células NIH-3T3 transfectadas con las variantes de E6 para generar tumores *in vivo* en ratones desnudos. Las células NIH-3T3 transfectadas con el aislado de referencia de E6 generaron tumores que aparecieron a las dos semanas de la inoculación, el volumen observado a las cuatro semanas fue superior a los 100 mm³. En el caso de las células con el aislado europeo, aunque el tiempo de aparición de los tumores fue de tres semanas, el volumen tumoral fue mayor a los 100 mm³. Para las células transfectadas con la variante africana de E6, la generación de tumores se hizo visible a partir de la cuarta semana, alcanzando un volumen máximo de 8 mm³. Cabe mencionar que aunque el desarrollo tumoral de las

células con la variante africana fue menor al obtenido con las variantes asiático-americana y europea, a las nueve semanas la variante africana alcanzó un volumen tumoral de aproximadamente 100 mm³, similar al observado con las otras variantes a las cuatro semanas. Las células transfectadas con el vector vacío se utilizaron como control y no se observó desarrollo tumoral durante el tiempo que duró el ensayo. Los tumores desarrollados se emplearon para analizar las características anatomopatológicas y obtener cultivos primarios. La observación con hematoxilina-eosina demostró un mayor índice de mitosis, con núcleos más grandes y pleomórfico en los tumores de los aislados asiático-americano y europeo, que los tumores obtenidos con la variante africana.

Tabla 3. Formación de colonias independientes de anclaje y tumores en ratones desnudos de las variantes de E6 del VPH-18.

| | Formación de colonias independiente de anclaje (No de colonias) | Formación de tumores en ratones desnudos (mm ³) |
|---------|---|---|
| pcDNA | 3-5 | 0 |
| E6 AsAi | 57-82 (75) | 113-130 |
| E6 E | 37-59 (45) | 103-182 |
| E6 Af | 5-18 (8) | 1.4-8 |

Tabla 3. Resultados del análisis de las variantes de E6 en su capacidad para generar colonias independientes de anclaje en agar suave y para formar tumores en ratones desnudos BALB/c-N. Los datos presentados representan los rangos obtenidos de 4 experimentos diferentes y la media de los valores se indica entre paréntesis.

9.6 Mutagénesis dirigida de los cambios en la secuencia de las variantes del gen E6

La diferencia entre la secuencia de aminoácidos de E6 de los tipos de alto riesgo y bajo riesgos determina la habilidad de las proteínas E6 para promover la degradación de p53.⁸⁰ No obstante, el efecto de los cambios en la secuencia nucleotídica sobre la expresión y procesamiento de los transcritos de E6 no se conoce por completo. La proteína E6 se

traduce a partir del transcrito bicistrónico E6/E7, sin embargo el procesamiento alternativo entre el sitio donador y los sitios aceptores presentes en la secuencia de E6 genera los transcritos E6*I-IV. El análisis de expresión de las variantes de E6, demostró que la variante africana de E6 expresa mayores niveles de E6*I con respecto al transcrito completo de E6, mientras que los aislados de referencia y europeo mantienen una mayor proporción del transcrito completo de E6. Para determinar si los cambios presentes en la variante africana de E6 podrían estar implicados en el patrón de expresión observado, se realizó mutagénesis sobre la secuencia de referencia de E6 y se analizó la expresión de los transcritos de E6. La secuencia de E6 del aislado de referencia se modificó de acuerdo a los cambios reportados en la variante africana de E6. Los cambios en la variante africana compartidos con el aislado europeo se omitieron por presentar el mismo patrón de expresión que el aislado de referencia. Al determinar la expresión de E6 en las clonas del aislado de referencia de E6 mutantes, se observó que solamente el cambio en la posición 491 revierte el patrón observado para esta variante (Figura 8a). Se puede observar cómo el aislado de referencia de E6 presenta una mayor expresión del transcrito E6 completo, sin embargo, la mutagénesis sobre el aislado de referencia de E6 en el sitio C491A genera un patrón de expresión similar al observado con la variante africana. Cabe mencionar que aunque la posición G374A se localiza cerca del sitio de rama que se utiliza durante el procesamiento del transcrito, dicho cambio no tuvo efecto sobre el patrón de expresión de E6.

Las células MCF-7 transfectadas con el aislado de referencia, variante africana, mutante G374A y C491A se emplearon para estudiar el efecto de la mutagénesis sobre los niveles de p53. Como se observó previamente, el aislado de referencia de E6 mantiene bajos niveles de p53, sin embargo, la mutación C491A sobre el aislado de referencia produce mayores niveles de la proteína p53. Los niveles de p53 en la mutante C491A correlaciona con la expresión en mayor proporción del transcrito E6*I. Se puede observar como la clona de referencia con la mutación G374A, al no modificar el patrón de expresión observado para el aislado de referencia y expresar mayores niveles del transcrito completo, presenta menores niveles de p53 (Figura 8b). Es importante destacar que la posición 491 es un sitio conservado entre los VPH oncogénicos.⁶⁸

Figura 8. Mutagénesis de los cambios en la secuencia del oncogen E6 de VPH-18.

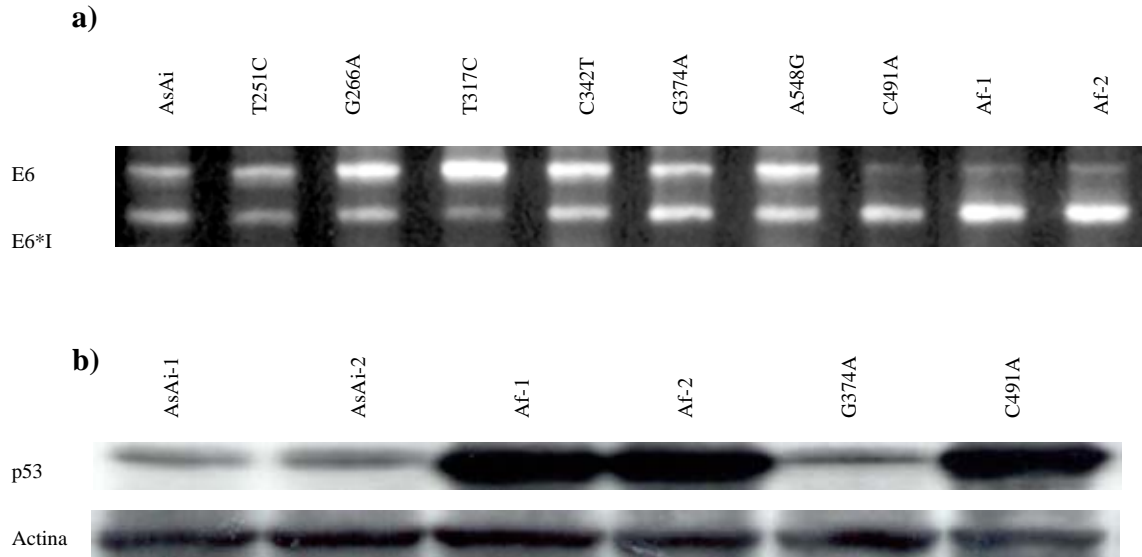


Figura 8. Efecto de la mutagénesis de los cambios presentes en la variante africana sobre el aislado de referencia de E6. a) Las células MCF-7 transfectadas con la mutante C491A cambia el patrón del aislado de referencia de E6. El patrón de expresión de las variantes AsAi y Af se incluye como control. b) Niveles celulares de la proteína p53 en células transfectadas con los aislados AsAi, Af y referencia con los cambios G374A y C491A.

10. DISCUSIÓN

La infección persistente con el virus del papiloma de alto riesgo representa el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cérvico-uterino.¹¹ El inicio de la vida sexual a temprana edad y el número de parejas sexuales, son factores de riesgo implicados en el desarrollo del cáncer de cérvix.⁸⁸ Sin embargo, factores virales tales, como la integración del genoma viral al genoma celular, la expresión constante de los oncogenes virales y la variación intra-tipo son considerados como elementos muy importantes en la carcinogénesis inducida por el VPH. La variación intra-tipo se ha empleado principalmente para estudiar la distribución geográfica del VPH. Recientemente se ha determinado que la variación intra-típica puede ser un factor muy importante para determinar el riesgo de desarrollo de CaCU y que podría explicar en parte las diferencias observadas en las patologías asociadas con el VPH.

El cáncer cérvico-uterino constituye un grave problema de salud reproductiva en la mujer. Anualmente se detectan cerca de 500,000 casos nuevos y aproximadamente el 50% de las mujeres mueren a causa de esta enfermedad, la gran mayoría de estas muertes ocurren en países en vías de desarrollo.⁸⁶ Tal es el caso de México, donde el CaCU ocupa los primeros lugares de morbilidad y mortalidad en mujeres.⁷⁰ Se ha propuesto que uno de los factores que podría estar implicada en la alta incidencia de CaCU observado en la población mexicana es la variación intratipo del VPH-16. Mediante el estudio de la prevalencia de diferentes variantes de VPH-16, se ha observado que las variantes de la rama asiático-americana del VPH-16 presenta una alta prevalencia en la población mexicana, que varía desde un 23% hasta un 88%.^{8,15} Los estudios moleculares enfocados a determinar diferencias en el comportamiento biológico de las variantes del VPH-16 han determinado que las variantes de la rama asiático-americana podrían presentar un potencial oncogénico mayor.^{61,37} Estos datos indicarían que la exposición a las variantes asiático-americanas podría contribuir a incrementar el riesgo de las mujeres mexicanas para desarrollar cáncer de cérvix.

Dentro de los virus del papiloma humano de alto riesgo, la infección con el VPH-18 es de particular importancia. Se ha observado que el VPH-18, se asocia principalmente con tumores más agresivos e indiferenciados y por lo consecuente con peor pronóstico clínico.¹⁴

Además, la presencia del VPH-18 se correlaciona con una mayor probabilidad de recurrencia tumoral y de metástasis a nódulos linfáticos.³⁹ A pesar de la naturaleza agresiva de las lesiones ocasionadas por el VPH-18, su fenotipo se asocia con lesiones más características de infecciones con tipos de VPH de bajo riesgo.⁵⁷

Los estudios realizados por Hecht et al., (1995) revelaron que la variabilidad genética del VPH-18 puede ser responsable del amplio espectro de patologías asociadas a este tipo viral. Esta aseveración se basa en la identificación de una variante del VPH-18 en el 40% de las muestras de lesiones de bajo grado, pero que se encuentra ausente en las muestras de cáncer invasor, lo que indicaría que dicha variante presenta un comportamiento menos agresivo por tener un potencial oncogénico menor.

En un estudio realizado en la población mexicana se identificó la presencia tres aislados de VPH-18 en diferentes tipos histológicos de CaCU. Uno de los aislados correspondía a la clona de referencia, que filogenéticamente corresponde a la rama Asiático-americana. Mientras que el segundo aislado se ubicó dentro de la rama Europea y el tercer aislado dentro de la rama Africana. Uno de los hallazgos más interesantes de este estudio fue la asociación casi exclusiva que se observó entre la variante africana y los tumores escamosos. Lo que sugiere que la variante africana pudiera estar asociada con un comportamiento biológico menos agresivo, debido a que los carcinomas escamosos tienen un mejor pronóstico que los adenocarcinomas, los carcinomas adenoescamosos y en particular los de células pequeñas. En contraste, en los carcinomas de células pequeñas, positivos a VPH-18, sólo se encontró la clona de referencia.⁴⁷ Recientemente, en un estudio realizado en Holanda se observó la misma asociación que apoya dicha propuesta. Se estudio la presencia de variantes del VPH-18 en diferentes tipos histológicos, observando la presencia de una variante africana exclusivamente en tumores escamosos de cérvix.²¹ La caracterización de los cambios en la secuencia de los genes E6 y E7 de las variantes encontradas en la población mexicana permitió conocer que la variante africana reportada por de Boer et al., (2005) comparte algunos cambios en la secuencia de E6 con la variante Africana que se describe en este estudio. En el caso del gen E7, la secuencia reportada por de Boer et al., (2005) difiere por completo con los cambios observados en la variante africana.

La presencia de los cambios en la secuencia nucleotídica de los genes E6 y E7 podría ser un indicativo de un comportamiento biológico diferencial entre las variantes del VPH-18, principalmente a nivel de proteína, donde se ha reportado que las posiciones 80 y 129 de la proteína E6 son sitios conservados entre los VPH de alto riesgo.⁶⁸ Sin embargo, los ensayos de degradación *in vitro* de p53 realizados con las variantes de E6 de VPH-18 demostraron que estos cambios no afectan la capacidad para promover la degradación de p53. Aunque la interacción entre p53 y E6 es la más conocida es importante determinar el efecto que tendrán los cambios presentes en la proteína E6 de la variante africana sobre otros elementos celulares, tales como Bak, CBP/P300 y hDlg.

Es importante destacar, que los cambios en el marco de lectura del gen E6 de las variantes no solo pueden afectar la habilidad de las proteínas E6 para interactuar con otras proteínas, también podrían alterar la transcripción de E6 y los niveles de traducción de la oncoproteína. En este sentido, el análisis de la transcripción de E6 de las variantes de VPH-18 demostró diferencias muy importantes en su expresión. Se observó que las clonas de la variante africana expresan una mayor proporción del transcrito E6*I en relación con el transcrito completo de E6. Las clonas del aislado de referencia y variante europea de forma contrastante expresan en mayor proporción el transcrito completo de E6. Estos hallazgos sugieren que los cambios nucleotídicos presentes en la variante africana de E6 promueven el procesamiento del mensajero de E6, generando mayores niveles del transcrito E6*I. El procesamiento de los transcritos de los genes virales es un fenómeno complejo y común entre los VPH, sin embargo, no se conoce por completo como se regula la expresión de los oncogenes virales. La reducción en los niveles del transcrito completo de E6 en la variante Africana se traduce en una disminución en los niveles de proteína E6 observados para esta variante. Este hallazgo se ha observado de forma similar en variantes de VPH-16, donde las variantes asiático-americanas que mantienen la secuencia completa del gen E2 inhiben la traducción de dicha proteína al generar mayor procesamiento del transcrito completo de E2.⁶¹

Algo importante de destacar es la correlación de los patrones de expresión de las variantes de E6 observados en las líneas celulares y los obtenidos con las muestras de tumores. Si bien, el número de tumores analizados fue limitado, el patrón de expresión de E6 en los tumores con la variante africana presento mayor expresión del transcrito E6*I.

Por el contrario, los tumores del aislado de referencia y casi la totalidad de los tumores de la variante Europea expresan el transcrito completo de E6 en mayor proporción.

Originalmente se pensaba que estos eventos de ajustes en el bicistron E6/E7, incrementaban la eficiencia en la traducción de E7, debido al aumento en el espacio intercistónico que se genera entre E6 y E7.⁸³ No obstante, se ha demostrado que E7 se traduce de forma eficiente, tanto del ARNm bicistrónico E6/E7, como de los transcritos ajustados.⁷⁸ La forma en que los cambios dentro de la secuencia de E6 pueden afectar el procesamiento del transcrito y eficiencia de traducción de la proteína E6 no se conoce por completo. Se ha observado que la modificación del sitio donador y/o de los sitios aceptores aumenta la expresión del transcrito completo de E6 y aumenta la traducción de la oncoproteína. La introducción de los cambios presentes en la variante Africana sobre la secuencia del aislado de referencia, demostró que la 491 revierte el patrón de expresión de E6 observado en el aislado de referencia. A pesar de que la posición 491 no se localiza cerca del sitio donador, ni del sitio aceptor o dentro del sitio de rama, puede ser un sitio muy importante para la unión de las proteínas implicadas en el procesamiento del transcrito.¹⁰² Esta observación confirma la importancia de esta posición para la capacidad transformante de la proteína E6 de alto riesgo.

La degradación de p53 es considerada como uno de los eventos más importantes en la inhibición de la apoptosis mediada por E6. Sin embargo, otras proteínas celulares implicadas en la activación de la apoptosis pueden ser afectadas de forma diferencial por las variantes de E6. La reducción en los niveles de la proteína E6 en las clonas de la variante Africana, debido a una reducción en los niveles del transcrito completo de E6, se traduce en altos niveles de proteína p53. Los mayores en los niveles de p53 observados en esta variante por consecuencia producen un aumento en proteínas que encuentran reguladas directamente por p53, como es el caso de Bax. Bax es una proapoptótica, implicada en la liberación del citocromo C de la mitocondria al citosol, en la activación de caspasas e inducción a apoptosis.⁴⁶ Como es de esperarse, las clonas del aislado de referencia y variante Europea mantienen bajos niveles de p53 y Bax, lo que correlaciona de forma inversa con los niveles de la proteína E6 observados en estos aislados. Cabe mencionar que recientemente se demostró que además de inhibir la transcripción de Bax, a través de la degradación de p53, E6 de VPH-16 es capaz de inducir la degradación de Bax.⁴⁶ Este

hallazgo indicaría que los niveles de la proteína Bax que se observan en las células transfectadas con las variantes podría ser resultado de la degradación diferencial de Bax y no una consecuencia de la actividad transcripcional de p53 sobre Bax.

Si bien la unión de E6 con p53, es una de las interacciones más conocidas que pueden presentarse entre E6 y con la maquinaria celular, la determinación de potencial oncogénico mediante los ensayos de formación de tumores podría dar una idea más clara de las diferencias en el comportamiento biológico de las variantes. Las diferencias entre las variantes en la capacidad para generar tumores radicarón principalmente en el índice de crecimiento y el volumen tumoral que cada una de ellas alcanzó. Observado que los tumores generados con los aislados Asiático-americano y Europeo alcanzaron un volumen tumoral claramente mayor y en menor tiempo que los tumores obtenidos con la variante africana. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la variación intra-tipo de E6 podría retrasar el proceso de transformación de las células que contienen la variante Africana. Esto podría explicar en parte, como la variación en una o más proteínas virales puede modificar el comportamiento biológico, reducir el potencial oncogénico y afectar el resultado clínico de la infección. La reducción en la capacidad de uno de los elementos transformantes del VPH no implica la pérdida total de la capacidad oncogénica del virus, puede traducirse en diferencias biológicas que retrasen la carcinogénesis cervical.

La modificación de uno o más aminoácidos en la secuencia de las proteínas virales podría representar un cambio conformacional en la estructura de las proteínas. En algunos casos, estos cambios afectan la exposición de epítopes necesarios para un eficiente reconocimiento por parte del sistema inmune mediado por células. La asociación del VPH ciertos haplotipos del antígeno leucocitario humano (HLA) parece ser un factor muy importante para determinar el riesgo de desarrollo de CaCU.¹ Por otro lado, se ha propuesto que la variabilidad del VPH, puede estar asociada con ciertos haplotipos del HLA y aumentar en el riesgo para desarrollar lesiones de alto grado. En un estudio de casos y controles se observó que la combinación entre la variante de E6 del VPH-16 (L83V) con los haplotipos HLA-B*44, HLA-B*51 y HLA-B*57 presenta un riesgo mayor de cáncer.⁹⁷ Es importante destacar, que el análisis *in silico*, demostró que la variación en el residuo 83 de E6 afecta la unión de los péptidos al haplotipo HLA-B*44, lo que podría modificar la respuesta citotóxica de los linfocitos T.⁹⁷ Si bien, otros estudios no han observado ninguna

correlación entre variantes específicas del VPH-16 con haplotipos del HLA,⁹ es de interés definir si las alteraciones en la secuencias de las proteínas E6 de las variantes del VPH-18 pueden intervenir con las propiedades antigénicas de las proteínas o modificar la respuesta inmune celular. La variación intra-tipo en otros genes virales, como es el caso de los genes L1 y L2, podría traducirse en el cambio conformacional de epítopes relevantes para la neutralización viral.

Basado en todas estas conclusiones es de vital importancia incrementar nuestro conocimiento sobre el potencial maligno de los tipos de VPH, así como de sus respectivas variantes y conocer el efecto que estos puedan tener sobre diferentes tipos histológicos de cáncer. Además de que el estudio de su prevalencia podría establecer las bases para la caracterización de grupos o comunidades enteras con alto riesgo para el desarrollo de tumores malignos.

11. ANEXOS

REVISIONES

Elementos víricos y celulares que intervienen en el proceso de replicación del virus del papiloma humano

Erick de la Cruz Hernández, Alejandro Mohar Betancourt y Marcela Lizano Soberón

Instituto Nacional de Cancerología, Subdirección de Investigación Básica, México D.F.

La infección del virus del papiloma humano (VPH) es el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cervicouterino. El ciclo de vida del VPH está ligado al proceso de diferenciación epitelial. Cuando estos virus infectan las células basales se mantienen como elementos autorreplicativos con bajos niveles de expresión génica. A medida que los estratos celulares se van diferenciando, los niveles de replicación del genoma vírico aumentan y se sintetizan las proteínas víricas tardías, con lo que se inicia la formación de partículas infecciosas. Aun cuando las proteínas E1 y E2 son los elementos principales en la replicación, otras proteínas víricas también contribuyen promoviendo o reprimiendo la transcripción de ciertos genes víricos. Sin embargo, no está claro cómo es que estos factores de replicación son regulados durante el ciclo de vida del VPH. Por lo tanto, resulta importante entender estos mecanismos de regulación, además de las interacciones de las proteínas víricas con múltiples dianas celulares, que promueven la transformación celular.

Palabras clave: VPH, cáncer cérvico-uterino, replicación viral

De la Cruz Hernández E, Mohar Betancourt A, Lizano Soberón M. Elementos víricos y celulares que intervienen en el proceso de replicación del virus del papiloma humano. Rev Oncol 2004;6(5):263-71

Cellular and viral elements involved in the replication of human papilloma virus

Infection by the human papilloma virus (HPV) is the main risk factor in the development of cancer of the cervix and uterus (CaCU). The life cycle of the HPV is linked to the epithelial differentiation process. When the virus infects the basal cells they remain as self-replicating elements with low levels of gene expression. While the cell layer differentiates, the levels of the viral genome increase, late viral proteins are synthesised and begin to form infectious particles. Even when the E1 and E2 proteins are the principal elements in the replication, there are other viral proteins that, as well, contribute to promoting or suppressing the transcription of certain viral genes. However, it is still unclear as to how these replication factors are regulated during the life cycle of the HPV. As such, it is important to identify these regulatory mechanisms, apart from the interactions of the viral proteins with multiple cell targets, which promote cellular transformation.

Key words: HPV, cervical cancer, viral replication

REPLICACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN EL EPITELIO ESTRATIFICADO

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus pequeño de ADN de doble cadena circular, que infecta el epitelio estratificado. El genoma del VPH contiene 6

genes tempranos (E) y 2 genes tardíos (L). Los genes tempranos están implicados en la regulación y replicación del virus, y los genes tardíos codifican las proteínas de la cápside vírica. Hasta hoy se han identificado más de 200 tipos de VPH diferentes, los cuales pueden ser divididos en aquellos que infectan superficies cutáneas y los que infectan superficies mucosas¹. Estos virus infectan a las células basales a través de microlesiones presentes en la superficie de los epitelios. Hasta ahora, no se ha podido identificar el receptor que permite la entrada del VPH a las células epiteliales. Sin embargo, se han propuesto diversos candidatos para esta labor, y uno de los cuales es la integrina alfa-6, beta-4². Esta proteína de superficie se

Correspondence: M. Lizano Soberón
Instituto Nacional de Cancerología,
Subdirección de Investigación Básica,
Servicio de Oncología Médica,
Av. San Fernando, 22. Col sección XVI. Del. Tlalpán
14000 México D.F.
E-mail: lzano@servidor.unam.mx

Received 8 October 2003; Revised 12 January 2004; Accepted 4 February 2004.

expresa durante el proceso de restauración de un tejido dañado, lo que la hace una candidata muy apropiada para esta función; sin embargo, ningún estudio funcional ha podido demostrarlo. Por su parte, se ha visto que los viriones de VPH se unen a la heparina presente en la superficie celular⁵, lo cual podría proveer un anclaje inicial, seguido de la formación de un complejo que permita su entrada a través de un endosoma.

El ciclo de vida del VPH puede dividirse en dos etapas: una productiva y otra no productiva. En la etapa no productiva, el genoma vírico permanece como un elemento extracromosomal en forma de episoma (elemento genético autorreplicativo). Este evento ocurre en las células basales del epitelio estratificado, donde el virus replica su ADN para mantener un número de 50-100 copias del genoma dentro de las células basales y parabasales. Al dividirse la célula infectada, una de las células hijas permanece en la parte basal del epitelio, mientras que la otra célula inicia un proceso de diferenciación en la parte superior del epitelio. El virus necesita la maquinaria replicativa de la célula para la síntesis del ADN vírico, la cual es poco eficiente en las células diferenciadas. Sin embargo el virus estimula la progresión de la fase celular G1-S en una célula diferenciada y de esta forma produce un ambiente adecuado para la replicación del ADN. En la etapa productiva, el genoma vírico se amplifica de modo que aumenta el número de copias presentes en la célula y se expresan los genes tardíos que codifican las proteínas de la cápside. Los promotores tardíos que regulan la transcripción del ARNm que codifica las proteínas de la cápside (L1 y L2), se activan solamente en células parcialmente diferen-

ciadas. La síntesis de las proteínas de la cápside sólo ocurre dentro del programa de diferenciación celular, dado que puede observarse exclusivamente en los estratos superiores del epitelio y no en las placas basales. Debido a que la producción de las partículas víricas está restringida a las placas superiores del epitelio, las células basales no son lisadas durante la producción de los viriones, y así la infección permanece durante largos periodos de tiempo. Podría pensarse que el ciclo vírico productivo y no productivo ocurre de forma independiente, pero sucede dentro de la misma célula. De esta forma las células infectadas y parcialmente diferenciadas amplifican el ADN vírico en la placa granular, transcriben y traducen los genes tardíos en la parte superior del epitelio, donde se ensamblan las partículas víricas infecciosas (figs. 1 y 2).

E1 Y E2 EN LA INICIACIÓN DE LA REPLICACIÓN

El mantenimiento del genoma vírico en las células infectadas del epitelio basal es esencial para el ciclo de vida del virus. Esto depende de la función y de los niveles de expresión de dos proteínas involucradas en el proceso de replicación vírica, E1 y E2. La replicación del ADN vírico se inicia con la unión de E1 y E2 a secuencias específicas del ADN dentro de la región larga de control. Tanto E1 como E2 se unen de forma independiente a sus respectivas secuencias. La proteína E1 funciona como un iniciador de la replicación, se une específicamente al origen de replicación vírica e interactúa con diversas proteínas celulares requeridas para la replicación. El origen de replicación del virus

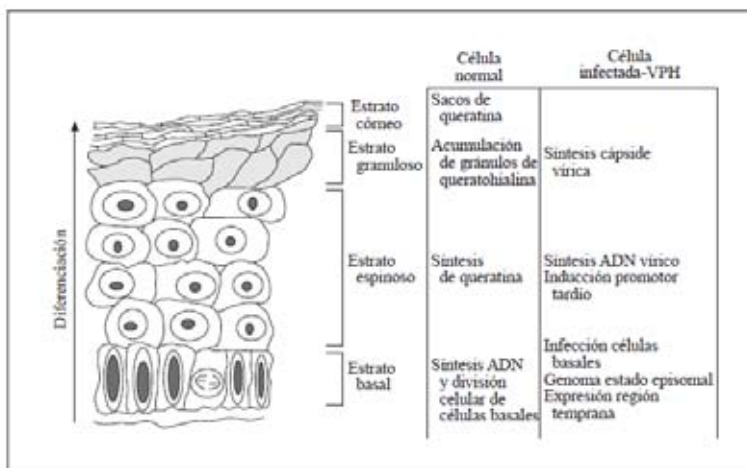


Fig. 1. Funciones de las células normales, así como de las células infectadas por virus del papiloma humano (VPH) durante la diferenciación.

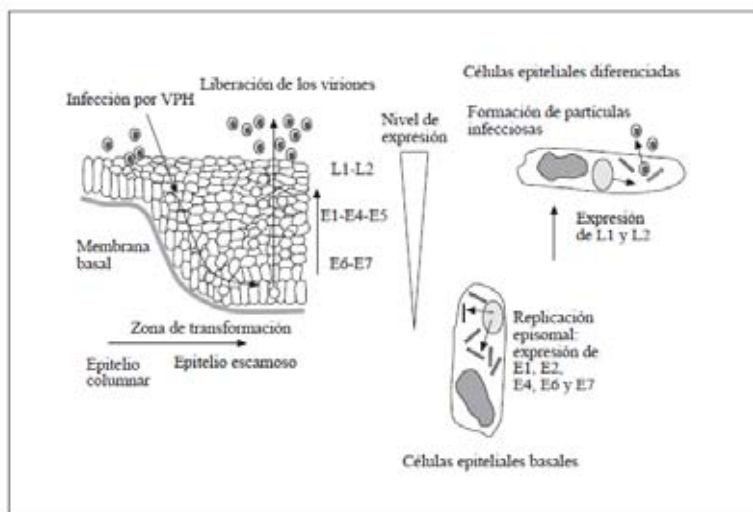


Fig. 2. Replicación de las partículas del virus del papiloma humano (VPH). En las células basales, la expresión de los genes víricos está controlada por factores celulares, mientras que en los estratos superiores, las células infectadas amplifican el genoma vírico. Finalmente, las partículas víricas son liberadas a lo largo de las células escamosas, las cuales son exfoliadas a la superficie del epitelio.

del papiloma consiste en secuencias ricas en A/T flanqueadas por dos o tres sitios de unión de E2. La proteína E1 se une a las secuencias A/T con baja afinidad, mientras que E2 se une con alta afinidad.

El gen E2 codifica tres proteínas diferentes generadas por procesamiento alternativo. Una proteína de longitud completa (E2), la cual regula la transcripción del ARN vírico y la replicación del ADN vírico, funcionando como un elemento transactivador. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias E2 puede reprimir la transcripción de ciertos promotores que controlan la expresión de los genes transformantes E6 y E7, regulando indirectamente la proliferación celular y la capacidad de transformación. Esta función se ha observado principalmente durante la infección inicial, donde los niveles de expresión de E6 y E7 son bajos. Las otras dos proteínas de E2, E1/E2C y E2-C son más cortas, y tienen la particularidad de inhibir la capacidad de transactivación de E2. Estas proteínas E2 pequeñas conservan su sitio tanto de unión a ADN, como de dimerización. Sin embargo, carecen del sitio de transactivación, por lo cual pueden inhibir la acción de E2 al unirse en forma competitiva a su sitio de unión, o bien mediante la formación de complejos con E2⁴.

La proteína E2 reconoce la secuencia palindrómica ACCN₆GGT, la cual se encuentra en múltiples copias dentro de la región larga de control del genoma vírico, y funciona como un activador de la transcripción. Esta proteína contiene dos dominios funcionales relativamente conservados entre los diferentes tipos de VPH: el dominio N-terminal que consiste en aproximadamente 200 aminoácidos (aa), y su función es importante en la activación de la transcripción, y el

dominio C-terminal de aproximadamente 100 aa que interviene en la unión al ADN y su dimerización. Ambos dominios están unidos por una región denominada región de bisagra, cuya secuencia es muy variable entre los VPH. La replicación transitoria del genoma del VPH requiere solamente de E1 y E2, pero el mantenimiento estable en queratinocitos normales requiere la expresión de E6 y E7. Esto sugiere que las proteínas E6 y E7 modifican el ambiente celular, lo que le permite al genoma vírico mantenerse como elemento extracromosomal.

Como se ha mencionado, la replicación del genoma del VPH está restringida a las células diferenciadas, las cuales han salido del ciclo celular y cuya maquinaria de replicación de ADN está "apagada". Por lo cual, el genoma vírico contribuye a las funciones genéticas de la célula, compensando las funciones celulares perdidas para la replicación del ADN vírico. Uno de los principales oncogenes involucrados es E7, el cual interviene en la iniciación de la síntesis de ADN como resultado de la activación de la transición de la fase G1/S del ciclo celular. Paradójicamente, la activación inapropiada del ciclo celular y de la proliferación celular activan la muerte celular programada (apoptosis) en las células normales, lo que trae como resultado la reducción del tiempo de vida de la célula infectada y la pérdida de la replicación vírica.

Este efecto es corregido a través de la maquinaria vírica que previene la apoptosis dentro de las células infectadas, proceso mediado por el oncogén E6. De esta forma ambos genes poseen funciones complementarias para la replicación del virus, E7 promueve

la replicación del ADN y el crecimiento celular, mientras que E6 inhibe la apoptosis, prolongando la supervivencia de las células, incluso de aquellas que llevan mutaciones dentro de su genoma.

LA ONCOPROTEÍNA E6

La fosfoproteína E6 contiene aproximadamente 150 aa y dos dominios de "dedos de zinc", cuya integridad es esencial para su función⁵. Es fosforilada por una proteína cinasa A (PKA), la cual reconoce residuos de treonina en la región carboxilo de E6⁶. A pesar de que E6 es una proteína pequeña, induce cambios muy importantes en el ciclo de vida del virus y en el proceso de immortalización y transformación de la célula. E6 es uno de los genes que se expresan más precozmente durante la infección por VPH, creando un ambiente más propicio para la producción de nuevas partículas víricas al inhibir el proceso de apoptosis, alterar la expresión de otros genes celulares e incrementar el tiempo de vida de la célula. Las funciones de transformación de E6 están mediadas por su interacción con una gran variedad de proteínas celulares. El blanco celular más conocido de E6 es la proteína supresora de tumores p53, para la que E6 promueve la degradación a través del sistema de degradación de ubiquitina⁷. Por lo tanto, las células que expresan E6 mantienen niveles bajos de p53 funcional y no responden ante un daño al ADN, favoreciendo la acumulación de mutaciones en el genoma. En condiciones normales, la degradación de p53 es mediada por el mismo sistema de ubiquitina a través de la ligasa Mdm2⁸. Sin embargo, ante un daño al ADN, p53 se estabiliza mediante su fosforilación, evitando la interacción con Mdm2 y su degradación. En las células que expresan E6, la degradación de p53 se realiza al formar un complejo con E6 unida a una proteína llamada E6-AP. Como resultado, p53 no se activa en forma apropiada ante un daño al genoma, lo que permite la supervivencia de la célula y la acumulación de mutaciones. Además de promover su degradación, se ha observado que E6 puede retener a p53 en el citoplasma, evitando su translocación al núcleo e inhibiendo su función independientemente de su degradación⁹.

Sin embargo, varios estudios han observado que las células que expresan E6 no promueven la degradación de p53 por completo, manteniendo niveles muy bajos de expresión¹⁰. Éstos pueden ser el resultado de la interferencia negativa de la proteína E6*I, la cual aparentemente inhibe la actividad de E6 para promover la degradación de p53¹¹. La proteína E6*I se obtiene como resultado del procesamiento del transcrito de E6, que da lugar a un transcrito de menor tamaño, que pierde la región C-terminal de E6 al generarse un codón de parada prematuro, además de la secuencia original de "dedos de zinc" de la secuencia original de E6¹². De esta forma E6*I es capaz

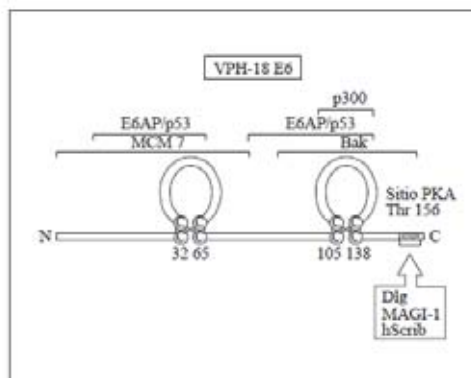


Fig. 3. Diagrama esquemático que muestra la estructura de los dedos de zinc de la proteína E6 del virus del papiloma humano-18 (VPH-18) junto con algunos de sus blancos celulares más conocidos y sus sitios de interacción. Se puede observar el dominio PDZ(ETQV) y el sitio de reconocimiento PKA en el extremo C-terminal.

de unirse a E6 y formar un complejo con E6-AP sin promover la degradación de p53, ya que pierde los sitios involucrados en su degradación. La función de E6*I está relacionada con el control de la degradación de p53 durante el ciclo vírico, de forma que el virus puede controlar la degradación de p53, evitando el proceso de immortalización e integración al genoma, lo que resultaría en la pérdida de la capacidad de replicación (fig. 5).

Si bien la interacción E6-p53 es la más conocida, existen otras muchas interacciones adicionales con dianas celulares que aún no se han descrito por completo. Éstas contribuirían a mantener el fenotipo maligno de las células infectadas, y dependiendo del tipo de interacción con factores celulares pueden dividirse en: a) regulación de la transcripción y replicación del ADN; b) regulación de la apoptosis; c) regulación de la organización y diferenciación celular, y d) polaridad celular e interacción célula-célula.

Efecto de E6 en la regulación de la transcripción y replicación del ADN

Se conoce el papel de la proteína E6 para modular la transcripción de forma positiva o negativa de genes que se encuentran bajo la acción de promotores celulares y víricos. Sin embargo, no se podía determinar cómo E6 afectaba la transcripción de otros genes, hasta que se demostró que E6 interactúa con un coactivador de la transcripción denominado p500/CBP¹³. P500/CBP activa la transcripción de un gran número de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, diferenciación y respuesta inmune. De esta forma

E6 inhibe la transcripción de genes involucrados en la producción de citocinas, como la interleucina-6 (IL-6) e IL-8, además de inhibir la acción del factor de transcripción NF- κ B¹⁴. P500/CBP también posee la capacidad de transferir grupos acetilo a las histonas, por lo cual puede regular la transcripción mediante su acetilación. La acetilación de las histonas se asocia con la activación de la transcripción mediante la remodelación de la estructura nucleosomal en una conformación abierta que permite el acceso a diversos factores de transcripción.

Si bien se ha mencionado que E6 puede activar de forma indirecta la transcripción de ciertos genes, se ha observado que puede modular la transcripción de promotores que contengan elementos TATA en su secuencia¹⁵. Además, E6 podría funcionar como un factor de transcripción celular por la homología estructural que presenta con éstos, ya que los dominios de "dedos de zinc" presentes en E6 podrían funcionar como sitios de unión al ADN para activar la transcripción celular¹⁶.

Inhibición de la apoptosis

Es importante que el virus evite la muerte celular, al menos hasta que se haya replicado. Uno de los principales genes involucrados en la apoptosis es p53, un factor de transcripción que estimula la expresión de genes involucrados en el bloqueo del ciclo celular y la apoptosis, como el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina, p21^{CIP} y Bax. Las proteínas E6 de alto riesgo inhiben la apoptosis mediada por p53 al inducir su degradación. Sin embargo, se ha observado que E6 también puede inhibir las vías de apoptosis independientes de p53 sin importar el estímulo que desencadene su activación. Entre los muchos blancos celulares de E6, se encuentran distintos elementos celulares involucrados en la apoptosis, como Bak, una proteína proapoptótica con altos niveles de expresión en el epitelio diferenciado¹⁷. La proteína E6 de VPH-18 interactúa de manera directa con Bak promoviendo su degradación a través del sistema de ubiquitinización¹⁷. De igual forma que en la degradación de p53, E6 forma un complejo con E6-AP y Bak para promover su degradación. Trabajos más recientes demuestran que las proteínas E6 no oncogénicas pueden unirse a Bak, pero su unión es más débil, lo cual correlaciona con una actividad antiapoptótica débil con respecto a los VPH de alto riesgo¹⁸.

Independiente del proceso de degradación de p53, E6 puede inhibir la apoptosis mediante la degradación de otros componentes proapoptóticos. El factor de transcripción c-Myc es degradado de forma normal a través de la vía del proteosoma; sin embargo, se ha demostrado que las proteínas E6 de alto riesgo pueden acelerar su degradación al formar un complejo

con E6-AP, lo cual no sucede con las proteínas de bajo riesgo¹⁹. Esto puede ser tomado como algo inusual, ya que una de las funciones de c-Myc consiste en estimular la proliferación celular, por lo cual puede interpretarse que la finalidad de la degradación de c-Myc mediada por E6 va dirigida a su actividad proapoptótica.

Interferencia con la organización y diferenciación epitelial

Los VPH de alto riesgo se replican en las placas diferenciadas del epitelio escamoso, en un ambiente que no permite la replicación del ADN. Una característica de las proteínas E6 de alto riesgo es su capacidad para inhibir el proceso de diferenciación terminal de las células epiteliales, lo cual normalmente las lleva a su queratinización y muerte. Sin embargo, el hecho de que E6 de VPH-16 incremente la resistencia de los queratinocitos humanos a la diferenciación inducida por calcio y suero a través de vías independientes de p53, indica que se desconoce el mecanismo molecular por el cual E6 resuelve el proceso. Sin embargo, E6 de VPH-16 interactúa con E6BP/ERC55, una proteína cuya función está relacionada con la unión al calcio, localizada en el retículo endoplásmico. Ensayos *in vivo* demuestran que E6BP forma un complejo con E6 y E6-AP, aunque no se ha podido demostrar su degradación²⁰.

Además de los blancos celulares antes mencionados, se han identificado otros que pueden contribuir al potencial oncogénico de E6, tales como la paxilina, una proteína de adhesión focal involucrada en la traducción de señales y remodelación del citoesqueleto de actina²¹, Mem7, un factor de replicación del ADN²². Estudios recientes han identificado una nueva clase de proteínas caracterizadas por poseer dominios PDZ, que se unen en forma directa al extremo C-terminal de las proteínas E6 del VPH de alto riesgo y no a las de bajo riesgo²³. Esta interacción es particularmente interesante, debido a que ocurre a través de un dominio altamente definido formado solamente por 4 aa²⁴. Las proteínas PDZ identificadas que interactúan con E6 son: hDlg, un homólogo de la proteína supresora de tumores Dlg de *Drosophila*²⁵, MAGI-1, una proteína involucrada en la unión celular²⁶, y la proteína hScrib, involucrada en el control de las uniones celulares así como en la proliferación celular²⁷. Debido a que estas proteínas se expresan en sitios de contacto célula-célula, se han relacionado con el control de la división y polaridad celular.

LA ONCOPROTEÍNA E7

E7 codifica una fosfoproteína que contiene aproximadamente 100 aa. De forma similar a E6, E7 contiene

un dominio de unión a zinc en la región C-terminal, el cual se utiliza para su dimerización o multimerización²⁸, y un sitio de fosforilación en su región N-terminal, donde es fosforilada por la cinasa caseína II²⁹. Diversos ensayos han demostrado que la localización de la proteína E7 dentro de la célula es predominantemente nuclear³⁰; sin embargo, se han detectado niveles muy bajos en el citoplasma y otros compartimentos celulares, lo cual se relaciona con la capacidad de E7 para interactuar principalmente con blancos celulares implicados en la síntesis del ADN y el control del ciclo celular. E7 interactúa con muchos blancos celulares, tales como Rb, p107, p150, ciclina A, ciclina E, desacetilasa de histonas (HDAC) y Ap-1^{31, 32}. Debido a la naturaleza de estas proteínas, se puede determinar que el principal papel de E7 consiste en alterar el control del ciclo celular normal. Diversos estudios han demostrado que la expresión de E7 está asociada con un incremento en la síntesis del ADN celular³³, así como con un aumento en la proliferación celular³⁴. Estas características son el resultado de la interacción entre E7 y las proteínas de la familia Rb, incluyendo Rb, p107 y p150. Estas interacciones interfieren con la habilidad de Rb para inhibir la activación del factor de transcripción E2F, de tal forma que E7 forma un complejo con Rb promoviendo su degradación a través del sistema de ubiquitinización³⁵. Esto permite que el factor E2F active la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de ADN, tales como la reductasa dehidrofolato, cdc 2, ciclina A, ciclina D y polimerasa alfa³⁶. Además de la degradación de Rb, E7 interactúa con otros inhibidores del ciclo celular, incluyendo p21³⁷ y p27³⁸ (fig. 4). Debido a la integración del genoma del VPH durante la transformación maligna, el gen E5 no se expresa en los tumores cervicales. La proteína E5 está localizada principalmente en el aparato de Golgi, pero también se ha detectado en endosomas y en otras membranas intracelulares³⁹. La principal función de la proteína E5 consiste en reducir el requerimiento de factores de crecimientos necesarios para la proliferación celular. Aunque su actividad transformante es débil, se ha observado que E5 de VPH-16 posee la capacidad de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico⁴⁰, además de incrementar su expresión en la superficie celular al inhibir su degradación⁴¹. La inhibición en la degradación de los receptores podría ser el resultado de la interacción de E5 con la subunidad 16kDa de la ATPasa vacuolar⁴², evitando la acidificación de los endosomas necesarios para su degradación. E5 puede activar otras proteínas involucradas en la proliferación celular, tales como la cinasa MAPK⁴³ y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas⁴⁴. De esta forma la proteína E5 contribuye a la proliferación celular de las células infectadas.

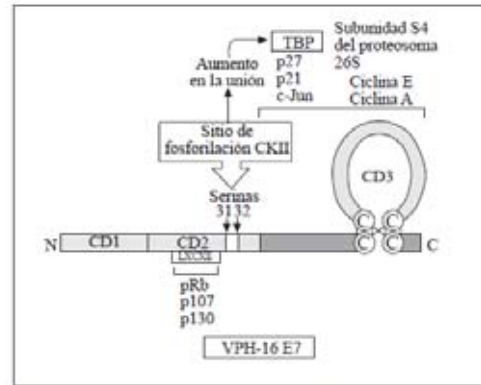


Fig. 4. Estructura de la proteína E7 del virus del papiloma humano-16 (VPH-16). Se pueden observar sus tres dominios conservados (CD1-3), junto con algunos de sus blancos celulares más conocidos y sus sitios de interacción.

EXPRESIÓN DE GENES TARDÍOS

Las funciones víricas tardías, tales como la síntesis de ADN vírico, síntesis de proteínas de la cápside, y ensamblaje de los viriones ocurre exclusivamente en las células diferenciadas. La transcripción de los genes víricos tardíos está regulada por un promotor específico que se encuentra localizado dentro del marco de lectura del gen E7. Dicho promotor depende del proceso de diferenciación celular, controla la expresión de las proteínas de la cápside, L1 y L2, así como de la proteína E4, generadas a partir de un ARNm policistrónico⁴⁵.

La proteína E4 se expresa solamente en las células diferenciadas del epitelio, su marco de lectura está localizado dentro de la región temprana; sin embargo, al encontrarse bajo la acción de un promotor específico de la diferenciación se expresa como un gen tardío. Se origina de un transcrito formado por un procesamiento entre el marco de lectura de E1 y E4, E1/E4. La función principal de E4 consiste en inducir la ruptura de las redes de citoqueratina, permitiendo la liberación de los viriones sintetizados durante la fase productiva de la replicación vírica⁴⁶. Además de esta función, se ha observado que E4 detiene el ciclo celular en la fase G2/M, lo que permite la síntesis de ADN y división nuclear en ausencia de división celular⁴⁷.

El proceso por el cual la diferenciación activa el ciclo de vida productivo es un área de mucho interés, aunque el conocimiento de cómo estos procesos son regulados es limitado. Se han propuesto varios modelos de cómo se activa la producción de viriones en las placas superiores del epitelio. Uno de ellos propone

que la activación de los genes víricos tardíos es el resultado de la interacción de los promotores tardíos con factores de transcripción celulares específicos de la diferenciación, como los factores de transcripción Ying Yang 1 (YY1), Skn-1 y CDP⁴⁸⁻⁵⁰. En un segundo modelo, se propone la activación de factores de transcripción que reprimen la expresión de los genes tardíos en las células basales. La idea central en ambos modelos es que el número de copias es controlado por los niveles de las proteínas E1 y E2 activos en las células.

El efecto directo de los oncogenes víricos sobre las células epiteliales del cérvix inicia una serie de cambios progresivos que alteran las funciones normales del ciclo celular, de apoptosis y diferenciación; estas alteraciones pueden incrementar la susceptibilidad de la célula a sufrir daños en el ADN e inestabilidad cromosómica. Con frecuencia, estas alteraciones están acompañadas de la integración del genoma del virus en el genoma celular, lo que garantiza la expresión perpetua de los oncogenes víricos.

La regulación de la transcripción de los genes víricos es un proceso muy complejo y hasta la fecha poco conocido. Esto se debe a la presencia de múltiples promotores y patrones de *splicing* dentro de los transcritos; muchos virus de ADN utilizan el *splicing* en el ARNm, como un mecanismo para regular la expresión de sus genes⁵¹. El procesamiento de un intrón dentro del marco de lectura de E6 puede modular la expresión de los genes E1 y E2⁵², debido a que el *splicing* se sitúa hacia arriba de la secuencia codificante para estos genes. De esta forma el procesamiento en el marco de lectura de E6 puede incrementar el espacio intergénico en estos genes, aumentando la eficiencia de la traducción. En el caso de E6 y E7 sólo los VPH de alto riesgo presentan transcritos bicistrónicos y policistrónicos para estos genes⁵³, a diferencia de los VPH de bajo riesgo, donde sus transcritos son monocistrónicos. Esto podría representar un posible mecanismo de regulación, al observarse que en las proteínas codificadas por transcritos policistrónicos el segundo y tercer gen se traducen con menos eficiencia⁵⁴.

CONCLUSIÓN

La patogénesis molecular de la infección por VPH en el desarrollo del cáncer cervicouterino es un tema aún no aclarado por completo. Si bien estos virus poseen la capacidad para inducir carcinogénesis por sí solos, la infección *per se* no es suficiente para promover la transformación maligna. Es necesaria la presencia de otros factores que contribuyen al desarrollo del cáncer. Aunque se han estudiado muchos modelos acerca de la replicación vírica, existen muchos aspectos que permanecen aún desconocidos y que sin duda son necesarios para comprender el comporta-

miento biológico de los diferentes tipos de VPH, así como de sus respectivas variantes. Por ello resulta interesante englobar todos los elementos identificados hasta la fecha, con el fin de entender el papel que desempeña cada uno de ellos en la regulación del ciclo de vida del virus.

Bibliografía

1. Villiers EM. Human papillomavirus. Introduction. *Semin Cancer Biol* 1999;9(6):577.
2. Evander M, Frazer H, Payne E, et al. Identification of the alpha-6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997;71:2449-56.
3. Joyce G, Tung S, Przysiecki T, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant-virus like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 1999;274:5810-22.
4. Stubenrauch F, Hummel M, Laimins L, et al. The E8^E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J Virol* 2000;74(5):1178-86.
5. Barbosa S, Lowy R, Schiller T. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* 1989;63:1404-7.
6. Kühne C, Gardiol D, Banks L, et al. Differential regulation of human papillomavirus E6 by protein kinase A: Conditional degradation of human dish large by oncogenic E6. *Oncogene* 2000;19:5884-91.
7. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18, E6 proteins with p53. *Science* 1990;248:76-9.
8. Hengstermann A, Linares L, Scheffner M, et al. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(5):1218-25.
9. Mantovani F, Lawrence B. Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical tumour derived cell lines. *Oncogene* 1999;18:5309-15.
10. Butz K, Shahabuddin L, Geisen C, et al. Functional p53 protein in human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene* 1995;10:927-36.
11. Pim D, Massimi P, Banks L. Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. *Oncogene* 1997;15:257-64.
12. Pim D, Banks L. HPV-18 E6*1 protein modulates the E6-directed degradation of p53 by binding to full length HPV-18 E6. *Oncogene* 1999;18:7405-8.
13. Patel D, Huang S, McCance J, et al. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p500. *EMBO J* 1999;18:5061-72.
14. Sheppard HM, Corneille S, Espiritu C, et al. New insights into the mechanism of inhibition of p53 by simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol* 1999;19:2746-55.
15. Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, et al. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* 1991;65:4860-6.
16. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001;20:7874-87.

17. Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 1998;17:2943-54.
18. Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with bak are conserved among E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* 1999; 80:1513-7.
19. Gross-Meslilaty S, Reinstein E, Bercovich B, et al. Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8058-63.
20. Chen J, Reid E, Band V, et al. Interaction of papillomavirus E6 oncoprotein with a putative calcium-binding protein. *Science* 1995;269:529-31.
21. Tong X, Howley M. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *PNAS USA* 1997;94:4412-7.
22. Kühne C, Banks L. E5 ubiquitin ligase/E6 AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, The L2G box. *J Biol Chem* 1998;273:54302-9.
23. Saras J, Heldin C. PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. *Trends Biochem Sci* 1996;21:455-8.
24. Doyle D, Lee A, Lewis J, et al. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 1996;85:1067-76.
25. Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, et al. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *PNAS USA* 1997;94:11612-6.
26. Glaunsinger B, Thomas M, Banks L, et al. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene* 2000;19:1093-8.
27. Nakagawa S, Huijbregtse M. Human Scribble (vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* 2000;20:8244-55.
28. McIntyre C, Fratini G, Grossman R, et al. Human papillomavirus type 16, E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization and transformation but not for RB binding. *J Virol* 1995;67:5142-50.
29. Barbosa S, Edmonds C, Fisher C, et al. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J* 1990;9:155-60.
30. Guccione E, Massimi P, Bernat A, et al. Comparative analysis of the intracellular location of the high- and low-risk human papillomavirus oncoproteins. *Virology* 2002;295:20-5.
31. Dyson N, Howley M, Munger K, et al. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;245:934-7.
32. Antinore J, Birrer J, Patel D, et al. The human papillomavirus type 16, E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factor. *EMBO J* 1996;15:1950-60.
33. Cheng S, Schmidt-Grimminger C, Murant T, et al. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* 1995;9:2335-49.
34. Morris D, Crook T, Bandara R, et al. Human papillomavirus type 16 E7 regulates E2F and contributes to mitogenic signaling. *Oncogene* 1993;8:893-8.
35. Jones DL, Thompson A, Munger K. Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology* 1997;239:97-107.
36. Adams D, Kaelin G, WG Jr. Transcriptional control by E2F. *Semin Cancer Biol* 1995;6:99-108.
37. Jones DL, Alani RM, Mungler K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21^{ras}-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* 1997;11:2101-11.
38. Zerfass-Thome K, Zwierschke W, Mannhardt B, et al. Inactivation of the cdk inhibitor p27^{KIP1} by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 1996;13:2323-30.
39. Conrad M, Bubb BJ, Schlegel R. The human papillomavirus type 6 and 16, E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* 1993;67:6170-8.
40. Hwang S, Nottoli T, Dimaio D. The HPV-16, E5 protein: expression, detection and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology* 1995;211:227-33.
41. Straight SW, Hinkle M, Jewers J, et al. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol* 1995;67:4521-32.
42. Straight SW, Herman B, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* 1995;69:3185-92.
43. Gu Z, Matlaszewski G. Effect of human papillomavirus type 16 on MAP kinase activity. *J Virol* 1995;69:8051-6.
44. DiMaio D, Lai C, Mattoon D. The platelet-derived growth factor b receptor as a target of the bovine papillomavirus E5 protein. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:283-95.
45. Hummel M, Lim HB, Laimins L. Human papillomavirus type 31b late gene expression is regulated through protein kinase C-mediated changes in RNA processing. *J Virol* 1995;69:3381-8.
46. Pray R, Laimins L. Differentiation-dependent expression of E1⁺E4 proteins in cell lines maintaining episomes of human papillomavirus type 31b. *Virology* 1995;206: 679-85.
47. Nakahara T, Nishimura A, Tanaka M, et al. Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4. *J Virol* 2002;76(21):10914-20.
48. Yukawa K, Butz K, Yasui T, et al. Regulation of human papillomavirus transcription by the differentiation-dependent epithelial factor *Epc-1/skn-1a*. *J Virol* 1996;70(1):10-6.
49. Narahari A, Roman A, Ying yang 1 negatively regulates the differentiation-specific E1 promoter of human papillomavirus type 6. *J Virol* 2000;74:5198-205.
50. O'Connor J, Stunkel H, Zimmermann H, et al. The differentiation-specific factor CDP/cut represses transcription and replication of human papillomaviruses through a conserved silencing element. *J Virol* 2000;74: 401-10.
51. Demeret C, Desaintes C, Yaniv M, et al. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol* 1997;71(12):9345-9.
52. Hubert W, Laimins L. Human papillomavirus type 31 replication modes during the early phases of the viral life cycle depend on transcriptional and posttranscriptional regulation of E1 and E2 expression. *J Virol* 2002;76(5):2263-75.

53. Smotkin D, Prokoph H, Wettstein O. Oncogenic an non-oncogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol* 1989;65:1441-7.
54. Kaufman R, Murtha P, Davies M. Translational efficiency of polycistronic mRNAs and their utilization to express heterologous genes in mammalian cells. *EMBO* 1987;6:187-95.

Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences

Erick De la Cruz-Hernández,¹ Alejandro García-Carrancá,¹ Alejandro Mohar-Betancourt,¹ Alfonso Dueñas-González,¹ Adriana Contreras-Paredes,¹ Enrique Pérez-Cardenas,¹ Roberto Herrera-Goepfert² and Marcela Lizano-Soberón¹

Correspondence
Marcela Lizano-Soberón
lizano@servidor.unam.mx

¹Unit of Biomedical Research in Cancer, National Cancer Institute/Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico, Av. San Fernando No. 22, Col. Sección 16, Tlalpan, 14080 Mexico City, Mexico

²Department of Pathology, National Cancer Institute, Mexico City, Mexico

Persistent infections of the uterine cervix with 'high-risk' human papillomavirus (HPV) are now recognized as necessary for the development of cervical cancer. Among them, HPV types 16 and 18 exhibit numerous variants associated with different risks for cervical cancer development. In this study, the questions of whether different HPV type 18 variants exhibit changes in early gene transcription and the molecular mechanisms underlying these differences were investigated. It was shown that, indeed, type 18 variants exhibited singular differences in E6 transcripts *in vivo*. Higher levels of the E6¹ transcript were detected regularly in clones harbouring the African variant, as opposed to low levels of this transcript detected in clones containing the reference clone (Asian–Amerindian), where significantly higher levels of full-length E6 transcript were usually observed. As a direct consequence, higher levels of p53 protein were found in the presence of African E6, as opposed to the low levels of p53 observed with the Asian–Amerindian E6. These variations in consequence affected the levels of cellular proteins regulated by p53, such as Bax. Similar changes in the relative levels of E6 transcripts were observed when tumours containing type 18 E6 variants were analysed. The different ability of cells containing variant E6 genes to form tumours in nude mice was suggested by the fact that tumour volumes were considerably higher when cells expressed the Asian–Amerindian E6. Mutagenesis analysis of the reference clone showed that a C491A change reverts the phenotype. These results suggest that different splicing patterns of E6 within HPV type 18 variants may possibly have biological implications in viral tumorigenesis.

Received 3 February 2005
Accepted 7 June 2005

INTRODUCTION

Cervical cancer constitutes a serious health problem in developing countries, which include about 80% of the nearly 500 000 cases newly diagnosed each year worldwide (WHO, 2004). Epidemiological and molecular evidence has established a causal role between persistent infections with 'high-risk' human papillomavirus (HPV) infections and cervical cancer development (Bosch *et al.*, 2002; zur Hausen, 2002). Among almost 200 different HPV types identified so far, 35 of them are usually found in anogenital lesions. HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 45 and 58 have been found in most invasive cancers (Walboomers *et al.*, 1999; Bosch *et al.*, 2002). A substantial body of evidence shows that persistent infection with oncogenic HPV types is an important factor for development of cancer (Dalstein *et al.*, 2003). Nevertheless, the incidence of cervical intraepithelial

neoplasia and invasive cervical carcinoma is relatively low, despite the fact that most sexually active women are infected by one or more cancer-related HPVs during their lifetime (Moscicki *et al.*, 2001; Schlecht *et al.*, 2001). It seems that other factors are required for the development of this malignancy. In the past few years, it has been proposed that minimal genomic variations within given oncogenic HPV types are involved in the differences observed in behaviour of premalignant lesions. Some studies propose that intratypic HPV variants may confer differential risk levels for cervical cancer disease (Bernard *et al.*, 1994; Xi *et al.*, 1997; Zehbe *et al.*, 1998; Hildesheim *et al.*, 2001). It has been suggested that certain type 18 variants mainly found in premalignant lesions may represent isolates with decreased oncogenic potential (Hecht *et al.*, 1995). In the case of type 16, a Mexican study showed that a specific Asian–American

variant was associated with tumours from young women, suggesting a worse prognosis for those women harbouring this variant (Berumen *et al.*, 2001).

In a previous work (Lizano *et al.*, 1997), we suggested that the apparent exclusive association between distinct histological types of cervical cancer and different HPV types may in part be due to differences in variants infecting the genitalia. An apparent exclusive association was found between an HPV18 variant from the African branch and squamous cell carcinoma (SCC), whereas the reference isolate, as well as a European HPV18 variant, was present in cervical cancer of glandular origin with worse prognosis (adenosquamous, adenocarcinoma and small-cell carcinomas).

Few studies have been performed that addressed the functional significance of genomic or protein variations among HPV variants. It has been reported that sequence variations observed in the long control region (LCR) of a type 16 Asian-American isolate may be responsible for its increased transcriptional activity (Kämmer *et al.*, 2000).

E6 is one of the viral genes expressed early during HPV infection and plays an important role in the viral life cycle, as well as in cellular immortalization and transformation (Mantovani & Banks, 2001). The transformation role of E6 is mediated by its interaction with a variety of cellular proteins. The most studied E6 target is p53. The interaction of E6 with p53 promotes the degradation of the latter via the ubiquitin pathway (Scheffner *et al.*, 1990; Werness *et al.*, 1990). It is known that the increase in p53 levels plays a critical role in the induction of genes that result in cell-cycle arrest (Di Leonardo *et al.*, 1994), allowing repair of damaged DNA or the activation of apoptotic pathways (Caelles *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1995). Therefore, cells expressing E6 maintain low levels of functional p53, altering the normal response to DNA damage and favouring accumulation of genomic mutations. On the other hand, p53 also plays an important role in apoptosis by upregulating Bax levels (Chipuk & Green, 2004; Zhang *et al.*, 2004). It has been shown that low levels of p53 have anti-apoptotic activity

(Lassus *et al.*, 1996), whereas high levels promote apoptosis (Chen *et al.*, 1996).

E6 mRNA from high-risk HPVs exhibits alternative splicing patterns that generate four mRNAs called E6*1-E6*IV (Czegledy *et al.*, 1994). It has been proposed that shortened E6 (E6*1) can bind to full E6, forming a complex with E6-AP and competing for binding to p53 (Pim & Banks, 1999). In this way, E6*1 could probably control p53 degradation at specific moments of the infection to inhibit cellular immortalization and viral genomic integration.

A few studies have reported functional differences among HPV16 variants. E6 protein variants of HPV type 16 showed differences in their abilities to cooperate with E7 to abrogate keratinocyte differentiation and to target the degradation of p53 (Stöppler *et al.*, 1996). Another study showed that a variant harbouring an amino acid change (Leu-Val) at position 83 enhances mitogen-activated protein kinase signalling and cooperative transformation with deregulated Notch1 signalling (Chakrabarti *et al.*, 2004). Nevertheless, no differences in functional activities of HPV18 viral proteins from different isolates have been reported.

The aim of this work was to determine whether nucleotide changes found in the E6 oncogene from different HPV18 variants prevalent among the Mexican population affect its oncogenic potential. We suggest a mechanism that may account in part for the observed differential biological activities of naturally occurring HPV18 isolates.

METHODS

Identification and sequencing of HPV18 variants. DNA was obtained from cervical cancer biopsies identified as harbouring different HPV18 isolates as described previously (Lizano *et al.*, 1997) and used for PCR and sequencing reactions.

Isolates were characterized through the genomic sequence of the LCR and E6 and E7 genes. Direct sequencing was done with a Thermo Sequenase radiolabelled terminator cycle sequencing kit (Amersham Biosciences) for PCR-amplified products obtained with specific primers as shown in Table 1.

Table 1. Specific primers used for PCR amplification of LCR, E6 and E7

Bold nucleotides indicate the restriction sites used for cloning, added to the specific viral sequences.

| Name | Restriction site | Primer sequence | Size (bp) |
|--------------------|------------------|---|-----------|
| LCR sense | <i>Sma</i> I | 5'- CC CCCCGGGTGATGATTGCATTGTATGG-3' | 787 |
| LCR antisense | <i>Hind</i> III | 5'-CC CA AGCTTGGATCCTCAAAGCGGCCAT-3' | |
| E6 pcDNA sense | <i>Bam</i> HI | 5'-GGGGG AT CCATGGCGCGCTTTGAAGATCCAACA-3' | 495 |
| E6 pcDNA antisense | <i>Eco</i> RI | 5'-GGGG AA TCTTATACTTGTGTTTCTCTCGGTGCG-3' | |
| E6 Flag sense | <i>Bam</i> HI | 5'-GGGGG AT CCATGGCGCGCTTTGAAGATCCAACA-3' | 495 |
| E6 Flag antisense | <i>Hind</i> III | 5'-GGGA AG CTTTTATACTTGTGTTTCTCTCGGTGCG-3' | |
| E7 sense | <i>Bam</i> HI | 5'-GGGGG AT CCATGCATGGACCTAAGGCAACATTG-3' | 336 |
| E7 antisense | <i>Eco</i> RI | 5'-GGGG AA TCTTACTGCTGGGATGCACACCAGC-3' | |

Plasmid construction. The E6 ORFs [nt 105–581; numbering according to Myers *et al.* (1994)] from different HPV type 18 variant isolates were amplified, purified with a High Pure PCR product purification kit (Roche), digested with *Bam*HI and *Eco*RI and cloned in pCDNA3.1 (Invitrogen) expression vector or digested with *Bam*HI and *Hind*III and cloned in pXJ40FLAG (kindly provided by Dr E. Manser, Glaxo Group Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore). Digested PCR products and vector were linked and used to transform *Escherichia coli*. Plasmids were isolated with a Plasmid Maxi kit (Qiagen). Cloned E6 sequences were confirmed through PCR-direct sequencing.

Cell cultures and transfections. C-33, NIH 3T3, HaCat and MCF7 cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12; Gibco BRL) supplemented with 8% fetal bovine serum (FBS). Cell lines were transfected with 4 µg DNA from either vectors alone or vectors harbouring the cloned E6 variant genes. pXJ40FLAG-derived plasmids were co-transfected with 400 ng pSV2Neo plasmid for selection. Transfections were performed in 60 cm diameter dishes with Lipofectamine Plus (Gibco-BRL) according to the manufacturer's instructions. For stable-clone selection, cells were treated 24 h after transfection with G418 at 0.8 mg ml⁻¹ in DMEM/F12 for 3 weeks. After stable selection, G418-resistant cells were cloned by dilution. Integrity of E6 in the obtained clones was tested by PCR amplification and sequencing.

RNA extraction and expression analysis. Total RNA was obtained from transfected cells or frozen biopsies by using TRIzol (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Samples were treated with 1 U DNase I (Gibco-BRL). The amount of RNA was determined by UV spectrophotometry and quality was assessed in 2% agarose gels. For cDNA preparation, 2 µg total RNA was reverse-transcribed with random hexamers by using the SuperScript first-strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies). The obtained cDNA was PCR-amplified for E6-expression analysis.

In vitro degradation assay. For *in vitro* degradation assays, p53 and E6, both cloned in pCDNA vector, were *in vitro*-translated by using a rabbit reticulocyte lysate-based coupled transcription-translation system (Promega); 10 µl p53 protein, *in vitro*-translated in the presence of [³⁵S]cysteine, was incubated together with 5 µl of each HPV18 E6 protein isolate. After 3 h at 30 °C, the degradation reaction was stopped by adding 100 µl sample buffer and the proteins were resolved by SDS-PAGE and visualized by fluorography.

Western blot assays. Total cellular proteins were extracted from transfected cells harvested from a 75 cm² plate. Cells were pelleted and disrupted with 300 µl lysis buffer [100 mM Tris (pH 8), 100 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1% apoprotein, 1 mM PMSF]. Proteins were boiled in sample buffer [125 mM Tris/HCl (pH 6.8), 1% SDS, 2% β-mercaptoethanol and 0.01% bromophenol blue] for 5 min and then loaded onto SDS-PAGE gels (10–18%). After electrophoresis, proteins were transferred to a Hybond-C Extra nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences) in a wet chamber for 1 h at 100 V. Membranes were then blocked with 1 × TBS containing 1% skimmed milk and 0.1% Tween 20, washed and incubated with the corresponding antibody [E6, p53, Bax, Actine (Santa Cruz Biotechnology)]. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was used for protein-primary-antibody complex detection. The levels of the corresponding proteins were visualized by using the ECL system (Amersham Biosciences).

Anchorage-independent growth (agar-colony assay). For soft-agar assay, bottom layers of 0.7% soft agar (Sigma) were prepared in 60 mm plates. Cells were harvested by trypsinization and were counted and seeded in triplicate with 15 × 10³ cells per 60 mm dish in a 0.5% agar top layer. The dishes were incubated at 37 °C for

2 weeks and then the number of colonies was counted. Assays were done in triplicate. Presence of 10 or more cells was the criterion taken for a formed colony.

Tumour formation in nude mice. NIH 3T3 cells transfected with the different isolates of E6 HPV18 were trypsinized, counted, resuspended in the smallest quantity (~200 µl) of DMEM/F12 and injected into nude mice (BALB/c-Nu, between 6 and 8 weeks of age) subcutaneously in the flanks. In total, 10⁶ cells were injected per mouse. Tumour size was measured every 7 days. After 1 month, the mice were sacrificed and the tumours were taken out, formalin-fixed and paraffin-embedded. Tumour volume was calculated by using the formula $V_t = (2ab)\pi/6$, where V_t is tumour volume, a is the largest diameter and b is the smallest diameter.

Site-directed mutagenesis assay. Site-directed mutagenesis was performed in the E6 reference clone by using a Transformer site-directed mutagenesis kit (Clontech) in order to mutate in the E6 reference isolate each of the variations contained in the E6 African variant. The positions analysed are shown, with the intended nucleotide exchange underlined at the centre of each primer used: T251C (5'-GAATTTGCATTCAAAGATTATTG-3'); G266A (5'-GATTTATTGTAGTGTATAGAG-3'); T317C (5'-GTATAGATTCTA-TTCTAGAATTAG-3'); C342T (5'-GAATTAAGATATTATTCAG-AC-3'); G374A (5'-GAGACACATTAGAAAACTAAC-3'); C491A (5'-GATTCACAAAATAGCTGGGC-3'); and A458G (5'-CGACA-GGAGCGACTCCAAGAC-3'). The selected clones with the E6 ORFs were sequenced to confirm the presence of the mutated nucleotide. RNA extracted from cells transfected with E6 mutants was submitted to RT-PCR to analyse E6 expression. p53-protein levels of such clones were examined by Western blot.

RESULTS

LCR, E6 and E7 sequence analysis of HPV18 variants

Patients harbouring cervical tumours with HPV18 have been associated with a worse prognosis than those with HPV16; some studies have shown remarkable association between certain variants of HPV18 and less aggressive tumours. We were interested in determining whether nucleotide changes could suggest functional differences among naturally occurring type 18 variants. Therefore, LCR sequences were compared with those reported by Ong *et al.* (1993) and extended to cover the complete LCR (including nt 7130–92; see Table 2). One of our variants corresponded to clone T18-9 from the European branch (E) with an unreported change at position 7258 (T for A). Meanwhile, the other variant was named African, on the basis of its similarity to T18-8 from the African branch; however, it exhibits changes at positions 7496, 7512 and 7529. Compared to the reference clone, this variant showed changes at positions 7130, 7152, 7156, 7161, 7164, 7185, 7258, 7323 and a 7 nt deletion between positions 7245 and 7251.

Due to the important role of E6 and E7 in cervical carcinogenesis, we became interested in determining whether nucleotide changes present in these oncogenes could suggest alterations in its oncogenic potential. Table 2 shows the nucleotide and deduced amino acid sequences of E6 and E7 oncogenes from type 18 variants. The E6 ORF from the European isolate exhibits changes at positions 287, 485 and

Table 2. HPV18 variations in the LCR and the E6 and E7 ORFs

Sequence alignment of the HPV18 reference clone and representative variants from the European and African branch found in the Mexican population. The European (E) and African (Af) variants are compared with the reference isolate (AsAi). No mutation at the nucleotide level or silent mutations at the amino acid level appear as -. Deletions at either the nucleotide or amino acid levels are indicated by *.

| | Changes in the LCR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Variant | | | |
|------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------|------|------------|-----------|
| | 7130 | 7152 | 7156 | 7161 | 7164 | 7185 | 7245 | 7246 | 7247 | 7248 | 7249 | 7250 | 7251 | 7258 | 7323 | 7486 | 7496 | 7507 | 7512 | 7529 | 7530 | 7563 | 7567 | 7592 | 7643 | 7651 | 7658 | 7670 | | 7704 | 7726 | 7730 |
| AsAi | C | A | A | C | C | C | G | T | A | T | G | T | T | A | C | C | A | G | C | T | G | A | T | T | A | T | A | T | C | A | A | AsAi |
| E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | E (T18-9) |
| Af | A | G | G | T | G | T | * | * | * | * | * | * | * | * | A | G | - | - | A | A | C | A | C | C | G | C | T | C | T | A | Af (T18-8) | |

| | Changes in E6 oncogene | | | | | | | | | | Variant |
|----------------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|
| | 251 | 266 | 287 | 317 | 342 | 374 | 485 | 491 | 548 | 549 | |
| AsAi | T | G | C | T | C | G | T | C | A | C | HPV18v2E67 |
| E | - | - | G | - | - | C | - | - | A | | |
| Af | C | A | G | C | T | A | C | A | G | A | |
| Predicted amino acid | | | | | | | | | | | |
| | 49 | 54 | 61 | 71 | 80 | 90 | 127 | 129 | 148 | 149 | |
| AsAi | Phe | Val | Pro | Phe | His | Leu | Phe | Asn | Arg | Arg | HPV18v2E67 |
| E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Af | - | - | - | - | Tyr | - | - | Lys | - | - | |

| | Changes in E7 oncogene | | | | | | | | | | Variant |
|----------------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|----------------------|--|--|--|---------|
| | 640 | 751 | 770 | 806 | 864 | 865 | | | | | |
| AsAi | C | C | A | G | A | C | Predicted amino acid | | | | |
| E | - | T | - | - | - | - | | | | | |
| Af | T | - | - | - | G | - | | | | | |
| Predicted amino acid | | | | | | | | | | | |
| | 17 | 54 | 61 | 73 | 92 | 92 | | | | | |
| AsAi | Pro | Ala | Met | Glu | Asn | Asn | 101 | | | | |
| E | - | - | - | - | - | - | | | | | |
| Af | - | - | - | - | Ser | - | | | | | |

549, all representing silent mutations and corresponding to isolate HPV18v2E67 as published in the HPV Compendium (Halpern *et al.*, 1997). The African variant exhibits changes at positions 251, 266, 287, 317, 342, 374, 485, 491, 548 and 549, leading to amino acid changes at positions 342 (His for Tyr) and 491 (Asn for Lys). In the case of E7, we found few changes in relation to the reference clone, probably because it is known to be a more conserved gene. European E7 has only one change at position 751; meanwhile, the African E7 has two changes at positions 640 and 864, the latter leading to one amino acid change at position 92 (Asn for Ser). The E7 genes from our European and African variants correspond, respectively, to isolates 101 and 4039 reported in the HPV Compendium (Halpern *et al.*, 1997).

E6 transcriptional patterns in cell lines and cervical tumours

To evaluate whether nucleotide changes in E6 could have an effect on its expression, transcriptional patterns were analysed. pcDNA plasmids harbouring reference, European or African E6 oncogenes were transfected into different cell lines. After selection, G418-resistant clones were assessed for the presence of E6 by PCR and transcriptional patterns were analysed through RT-PCR (Fig. 1a, b). Evident differences were found at the transcriptional level between the African and the other two isolates, in particular the relative levels of E6 and E6*I transcripts, suggesting differences at the RNA-processing level. Fig. 1(a) shows the presence of the two transcripts in all clones: that of 477 nt corresponds to the full-length E6 transcript and that of 295 nt to the E6*I transcript. Sequencing the corresponding PCR products confirmed the nature of the observed RT-PCR products. The most important finding in this assay was the different proportion of each transcript within the different E6 isolates. In the clones with the Asian–Amerindian and the European E6, we detected higher levels of full-length E6 transcript in relation to E6*I. In contrast, expression of E6*I was evidently favoured in clones with the African E6, where levels of the full-length E6 transcript were either greatly reduced or minimal.

As shown in Fig. 1(b), a semi-quantitative comparison of RT-PCR products obtained from E6 or the actin gene showed that equivalent levels of RNA were used in each assay. The E6*I transcript was predominantly found in C33 clones containing the African E6, confirming that differences in the relative levels of E6 transcripts were found independently of the cell line used. In addition, differences in expression patterns were not due to intrinsic cellular variations or to artefacts in the expression plasmids, as different E6 variants cloned in either pcDNA or pXJ40FLAG vectors and transfected in HaCat or NIH 3T3 cell lines exhibited similar expression patterns (data not shown). It is worthwhile mentioning that stably transfected clones were analysed periodically to confirm the observed phenotypes.

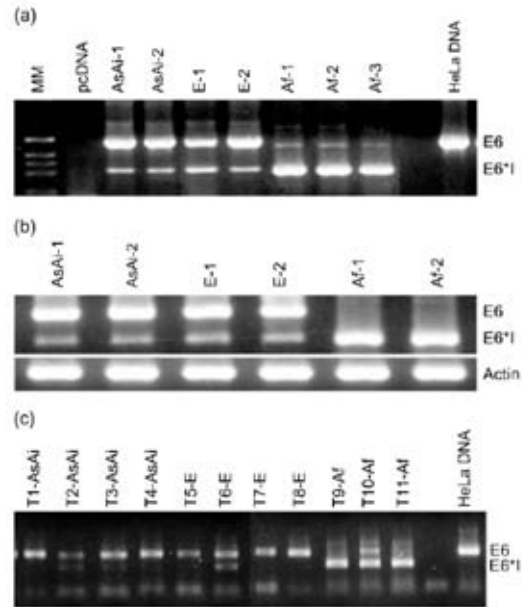


Fig. 1. Differential splicing of E6 transcripts within type 18 variants. RT-PCR analysis of E6 transcripts in different transfected cell clones and human tumours. (a) RNA extracted from MCF7 cell clones transfected with different E6 variants, cloned in the pcDNA expression vector, was used to analyse E6 transcriptional patterns. DNA extracted from HeLa cells was included as a PCR control. Clones contained either the empty vector or E6 of the Asian–Amerindian (AsAi), European or African variants. Numbers indicate different MCF7 clones analysed. The expected E6 transcripts are shown: full-length (477 bp) and E6*I (295 bp). pcDNA represents mRNA from cells transfected with the empty vector. (b) Semi-quantitative RT-PCR products from C33 clones transfected with different E6 isolates were analysed. The same amount of cDNA was used for RT-PCR of E6 or a fragment of the actin gene. (c) E6 transcriptional patterns from RNA extracted from tumours (T) identified as positive for different HPV18 isolates. RNA was extracted from frozen biopsies and RT-PCR was performed with E6-specific primers. PCR products were analysed in a 2% agarose gel. T1–T4 correspond to tumours with the reference variant, T5–T8 to the European variant and T9–T11 to the African variant.

In order to define the E6 transcriptional patterns in RNA obtained from cervical tumours positive for different HPV18 isolates and to compare these patterns with results obtained in the transfected stable clones, RT-PCR was performed in material obtained from four tumour samples containing the reference E6, six samples with the European variant and three samples with the African isolate. Fig. 1(c) shows that E6 expression in tumours harbouring the African isolate is similar to that obtained in cell clones,

with a clear higher proportion of E6*1 than the full-length E6 transcript. Tumours harbouring reference E6 (Asian–Amerindian) have higher expression of the full-length E6 transcript, whereas tumours with the European isolate show a mixed pattern, including cases with a higher proportion of the E6*1 transcript (data not shown), but the majority (four out of six) presented a higher proportion of the full-length E6 transcript.

E6-protein levels in transfected cells

When analysing E6-protein expression in transfected cells, as shown in Fig. 2(a), we noticed a correlation between the previously observed E6 transcriptional patterns and E6 protein-expression levels. A clear reduction of E6 levels was seen in clones with African E6, whereas no difference was found in E6-protein levels between the reference or European clones. Nevertheless, under our conditions, we were unable to detect the E6*1 protein in any case.

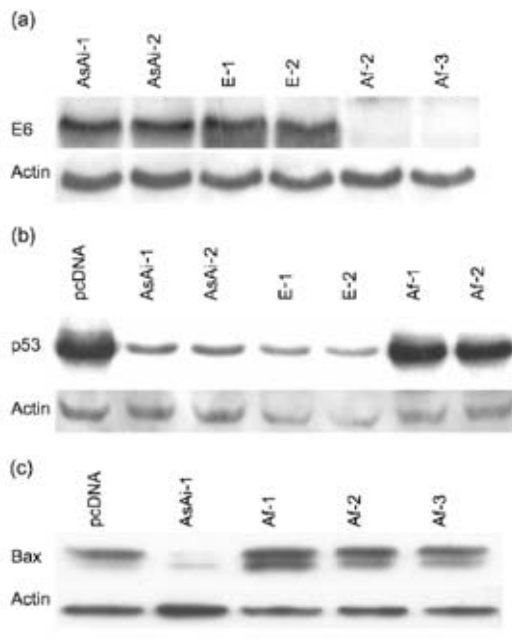


Fig. 2. Effect of differential transcriptional patterns of E6 within HPV18 variants on E6 levels and cellular proteins. (a) Western blot analysis of E6-protein levels. Total protein extracted from MCF7 cells harbouring either reference (AsAi), European (E) or African (Af) E6 was analysed by immunoblot with anti-E6 antibodies. (b) Western blot analysis of p53-protein levels in MCF7 cells expressing different isolates of the E6 oncoprotein. (c) Western blot analysis of Bax-protein levels in cell lines transfected with different HPV18 E6 isolates. Lower panels show immunoblots of the same membranes with anti-actin antibodies as a protein-loading control.

These results suggested that the reduction in functional full-length E6 may explain in part differences in biological behaviour between cervical lesions infected with distinct HPV18 variants. It therefore remained to be resolved whether differences in E6-protein levels correlated with levels of E6 target proteins.

Effect on cellular proteins of differential expression of E6 within HPV18 variants

The transforming properties of E6 result from its ability to form complexes with and modulate the action of an important array of cellular proteins, some of which are involved in cell growth and differentiation. As p53 is nowadays the most-studied E6 cellular target, we were interested in evaluating whether changes in transcriptional and translational patterns of African E6 could be reflected in differences in p53 steady-state levels. As expected, cells transfected with reference or European E6 clones showed a clear reduction in p53 levels, in comparison to cells transfected with the vector alone (Fig. 2b). Interestingly, clones with African E6 showed higher levels of p53, similar to clones harbouring the vector alone. This effect may be due to the reduction of E6-protein levels found in clones harbouring this variant.

It is feasible that steady-state levels of proteins responding to p53 could also be affected in the transfected clones. Therefore, we analysed the levels of Bax protein, a pro-apoptotic member of the Bcl2 family known to be increased in response to p53 levels. Fig. 2(c) shows that, indeed, steady-state levels of Bax protein show a relationship with those of p53. Clones harbouring the reference E6 (Asian–Amerindian) have clearly lower levels of Bax than clones with the vector alone or African E6. This suggests that cells harbouring this E6 might maintain higher levels of p53 and proteins regulated by it, affecting its transforming ability.

In vitro degradation of p53 is not affected by variations in E6

Although the changes already found at the transcriptional and translational levels of African E6 appear to have important biological consequences, it remained to be determined whether the two amino acid changes found in this protein could affect its ability to promote *in vitro* degradation of p53 via the ubiquitin pathway. To achieve this goal, we used an *in vitro* protein-translation system with reticulocyte lysate, where no splicing of E6 is expected and the proteolysis–ubiquitination pathway remains active. No apparent differences were observed in levels of *in vitro*-translated p53 in the presence of Asian–Amerindian or African E6 proteins (Fig. 3). Therefore, it appears that the two amino acid changes between these E6 proteins do not affect their ability to promote p53 degradation *in vitro*. This suggests that, although very low levels of the E6 protein are present in clones containing African E6, it may maintain the same, although highly reduced, functional activity as the reference clone in promoting p53 degradation.



Fig. 3. No differences in *in vitro* degradation of p53 by different E6 variants. p53 protein was translated *in vitro* in the presence of [³⁵S]cysteine and incubated with 5 µl of each *in vitro*-translated HPV18 E6 protein. To confirm concentration-dependent degradation, E6 input was doubled. Remaining p53 levels were visualized by fluorography.

Cells harbouring E6 variants exhibit differences in tumour formation

The ability of these HPV18 variants to achieve anchorage-independent growth was examined by culture in soft agarose. NIH 3T3 cells containing plasmids with reference, European or African E6 were harvested and seeded in soft agarose. After 2 weeks incubation, pictures of colonies were taken and colonies were counted. Whilst the three E6 isolates were able to form colonies in suspension, cells containing the vector alone were not able to form colonies. Interestingly, as shown in Table 3, the number of colonies was higher with Asian–Amerindian and European compared with African E6. It is worth mentioning that the colonies were visibly smaller for cells with African E6 than for those with the other E6 variants.

To further corroborate the *in vitro* results, we evaluated the ability of the above-mentioned transfected cells to form tumours *in vivo*. NIH 3T3 cells with reference (Asian–Amerindian) E6 generated non-regressing tumours that started to appear at 2 weeks and reached volumes greater than 100 mm³ at 4 weeks (Table 3). Cells with European E6

Table 3. Anchorage-independence assay in soft agar and tumour volume in BALB/c-Nu nude mice

For the anchorage-independence assay in soft agar, data represent range values from four independent experiments and the median value is indicated in parentheses. Tumour volume in BALB/c-Nu nude mice injected with NIH 3T3 cells transfected with HPV18 E6 variants and pcDNA vector is shown; the ranges in the obtained tumour volumes are presented.

| | Anchorage-independence assay (no. colonies) | Tumour volume (mm ³) at 4 weeks after injection |
|-----------|---|---|
| pcDNA | 3–5 | 0 |
| E6 (AsAi) | 57–82 (57) | 113–130 |
| E6 (E) | 37–59 (45) | 103–182 |
| E6 (Af) | 5–18 (8) | 1–4–8 |

did not generate tumours until the third week but, at 4 weeks, tumour volumes reached dimensions greater than 100 mm³. In contrast, cells with African E6 did not generate tumours until 4 weeks and at that moment, tumour volumes were not greater than 8 mm³; nevertheless, at 9 weeks, these tumours reached a volume of about 100 mm³. Cells transfected with the vector alone did not generate tumours, even at 4 or 9 weeks. Histomorphological analysis of stained sections from these tumours showed a high mitotic index, large pleomorphic nuclei and prominent nucleoli in tumours with reference Asian–Amerindian or European E6, but a lesser mitotic index in tumours with African E6.

A conserved site among high-risk HPVs favours E6 transcript processing

E6 from type 18 is translated from a single bicistronic E6E7 mRNA, but alternatively spliced mRNAs are also frequently formed, generating E6*1–E6*IV mRNAs that potentially encode proteins with the same N-terminal region as seen in the full-length E6 protein (Czegledy *et al.*, 1994). Nevertheless, the mechanisms involved in such splicing are not well-known; our results show that clones harbouring African E6 present a higher proportion of the E6*1 transcript, in relation to the full-length E6. Therefore, we proceeded to determine which nucleotide changes in E6 could be implicated in altering such transcriptional patterns. We introduced every change present in African E6 into the reference clone, except for those changes shared with the European E6. As shown in Fig. 4(a), replacement of nt 491 (C–A) changes the E6 transcriptional pattern obtained with the reference clone, generating a pattern similar to that of

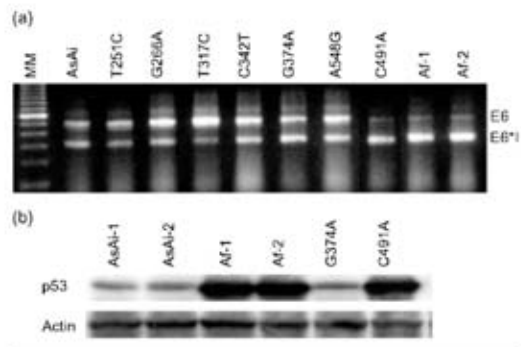


Fig. 4. Mutation of nt 491 alters the transcriptional pattern of E6 variants. (a) Expression analysis of mutants was performed through RT-PCR. Site-directed mutagenesis was done in the reference E6 gene (AsAi). MCF7 cells were transfected with mutant plasmids, Asian–Amerindian or African isolates as controls of transcriptional patterns. Nucleotide changes and positions are indicated. (b) Western blot of p53 protein in MCF7 cells transfected with E6 mutants (at nt 374 and 491).

the African E6, with a higher proportion of E6*1 than full-length E6. It is worth mentioning that nt 491 corresponds to aa 129, a position that is highly conserved within oncogenic HPV types (Pim *et al.*, 1994). Meanwhile, no other change produced such an effect, including that at position G374A, which is located near the spliceosome branch point (Brow, 2002). When comparing p53 steady-state levels between cell clones with E6 mutants (C491A and G374A), we confirmed the correlation between E6-expression patterns and p53-protein levels (Fig. 4b). Cells with reference E6 mutated at position 491 (C→A) have similar p53 levels to cells with African E6, whereas cells with the G374A mutant showed no change in E6 transcriptional pattern and, consequently, maintained the same p53-protein levels as cells with the reference E6.

DISCUSSION

Within high-risk HPV, type 18 is of particular importance, as it has been associated with tumours with the worst clinical outcome, compared with those harbouring type 16 (Burger *et al.*, 1996), probably related to early stromal invasion and rapid metastasis (Im *et al.*, 2003). However, in precursor lesions, type 18 is sometimes identified in lesions of lower-grade morphology, in contrast to the typical high-grade lesions associated with HPV16 (McLachlin *et al.*, 1994).

Hecht *et al.* (1995) suggested that genomic variability of different HPV18 isolates might be responsible for the wide spectrum of pathologies associated with this viral type. These authors identified an HPV18 variant absent in cervical cancer, but present in 40% of intraepithelial lesions, suggesting a lower oncogenic potential.

We reported previously the identification of three different HPV18 isolates in the Mexican population (Lizano *et al.*, 1997). Our findings showed an apparent exclusive association between an African isolate and SCC, in contrast to the reference clone, which was found to be associated with other histological types of cervical cancer with worse prognoses. This finding suggested a different biological behaviour for this variant; this is supported by the recent results of De Boer *et al.* (2005), who identified a similar HPV18 variant belonging to the African branch exclusively in SCCs that, although sharing some of the changes with our African isolate, differs in the E7 and LCR sequences. It is worth mentioning that all samples with the African variant previously identified by Lizano *et al.* (1997) had the same conserved changes in E6, E7 and the LCR.

We found that our European variant is similar in the LCR fragment to a European variant reported previously (Ong *et al.*, 1993). Although our African variant is not identical to any known LCR or E6 sequences (De Boer *et al.*, 2005), it has great resemblance to the African branch reported by Ong *et al.* (1993) within the LCR. Interesting differences were found between the African LCR and the reference clone. A 7 bp deletion (positions 7245–7251) and mutations

found at the enhancer region, which is known to harbour consensus sequences for transcriptional factors (AP1, TEF1, OCT1), suggest the likelihood of altered transcriptional functions. Therefore, we are already testing this possibility by determining transcriptional activities of the different HPV18 isolates.

As expected for E7, one of the most conserved genes among HPVs, few changes were found at the nucleotide level and only one amino acid change for the African variant E7 (nt 864, leading to N92S), which does not discard the possibility of an altered E7 function. It is worth mentioning that specific viral sequence variations may lead to altered biological functions of the translated proteins, which might affect the clinical outcome of the infection. The two amino acid changes predicted for the African E6 protein (positions 80 and 129) might suggest changes in its oncogenic function, as these positions are highly conserved within oncogenic HPV types (Pim *et al.*, 1994). Nevertheless, *in vitro* degradation analysis of p53 showed that these changes in E6 do not affect its ability to promote p53 degradation. Although this is one of the most important interactions of E6, it should not leave aside the existence of multiple targets of E6 that might also be affected. It is important to consider that mutations at the amino acid level might affect the protein's ability to interact with cellular proteins and promote transformation; nevertheless, silent changes are no less important, as they could also affect gene expression at the transcriptional level.

When analysing E6 expression, we found that transcriptional patterns were visibly different within HPV18 variants. A higher proportion of the E6*1 transcript in relation to the full-length E6 was found exclusively in cells transfected with the African E6, in clear contrast to that observed with the reference (Asian–Amerindian) or European E6, where full-length E6 transcripts were found in a higher proportion than the E6*1 transcripts. This finding suggests that nucleotide changes present in African E6 may promote its alternative splicing, reducing functional E6-protein levels. These data are supported by results of other authors who found that E2 is downregulated by alternative splicing in tumours harbouring an European HPV16 variant (Ordóñez *et al.*, 2004). Although the proportion of the E6*1 transcript is highly augmented with African E6, we were unable to detect the corresponding protein, which may be related to its intrinsic instability (Pim *et al.*, 1997).

Despite the fact that our analysis with tumours was done with a limited number of cases, we always noticed that similar E6 transcriptional patterns were present in tumours harbouring the African and Asian–Amerindian isolates, suggesting a possible correlation between E6 transcriptional patterns found in tumours and transfected cell lines. However, even though tumours harbouring the European isolate exhibited a mixed pattern of E6 transcripts, the majority of them (four out of six tumours) showed a high proportion of the full-length E6 transcripts. Our results

should be enhanced by the analysis of a greater number of tumours.

In relation to HPV mRNA processing, although it has been shown that changes at donor or acceptor sites affect transcript generation, there is no evidence for the involvement of other sites in this process. Our results obtained through site-directed mutagenesis showed the importance of position 491 in E6 mRNA processing, as reversion of this position in the reference clone changed the E6 transcriptional pattern to that observed in cells transfected with the African E6. As this position is not the donor or acceptor site or the branch point, it should be determined whether mutation of this site may affect the binding of cellular factors involved in formation of the spliceosome.

In this study, we observed that the low levels of full-length E6 transcript in cells transfected with the African E6 led to a reduction in E6-protein levels, a fact that was reflected strongly in p53-protein levels. As expected, cells with the reference E6 showed a reduction in p53 levels, whereas cells with African E6 showed levels of p53 similar to that in cells without E6. We also observed that steady-state levels of the Bax protein correlated with p53 levels observed in different cellular clones. Higher levels of Bax found in cells transfected with the African E6 may alter cell receptivity to apoptotic stimuli. Mutation of reference E6 (C491A) reversed the pattern of E6 transcripts to that of the African E6 and, consequently, exhibited a clear increase in p53 levels. This could explain, in part, the less aggressive behaviour proposed for the African variant.

In order to determine possible functional consequences of our results, we analysed the tumour-forming potential of different HPV type 18 E6 isolates in nude mice. All cells transfected with the different isolates could form tumours sooner or later; the growth rate was clearly slower for tumours with the African E6. These results support the hypothesis that intratype changes in E6 could delay transformation processes of a cell containing the African isolate. This could explain in part a diminished oncogenic potential, as well as a better prognosis, for tumours harbouring African isolates in contrast to other isolates of HPV18.

Sequence variation within one or more viral proteins may lead to altered biological functions and affect the clinical outcome of infection. Multiple mechanisms are involved in cell transformation. Reduction of one or more viral transforming elements does not assure loss of the virus's transforming ability, but may drive differences in the expected biological behaviour, delaying the transformation process.

Although our findings of different proportions of E6 transcripts within HPV18 variants seem to support the observed differences in their biological behaviour, it should be stressed that differences in E6 transcript processing could affect E7 translation, in spite of the fact that previous

reports show that E7 is translated efficiently both from the bicistronic E6E7 mRNA and from its spliced transcript (Stacey *et al.*, 1995). Nevertheless, it remains important to dissect the role of the other viral genes, such as E2, E5 and mainly E7, in modulating the oncogenic potential of different HPV18 variants, as the combined function of different viral genes is critical in cell transformation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by grants from CONACYT-Mexico (28673M and 41313). We thank the Instituto Nacional de Cancerología, SS, Mexico City, for its continuous and valuable support. E. De la C.-H. would like to thank CONACYT-Mexico for supporting his doctoral studies (grant 169956).

REFERENCES

- Bernard, H. U., Chan, S. Y., Manos, M. M., Ong, C. K., Villa, L. L., Delius, H., Peyton, C. L., Bauer, H. M. & Wheeler, C. M. (1994). Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 170, 1077–1085.
- Berumen, J., Ordoñez, R. M., Lázcano, E. & 7 other authors (2001). Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 93, 1325–1330.
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Muñoz, N., Meijer, C. J. L. M. & Shah, K. V. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55, 244–265.
- Brow, D. A. (2002). Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu Rev Genet* 36, 333–360.
- Burger, R. A., Monk, B. J., Kurosaki, T., Anton-Culver, H., Vasilev, S. A., Berman, M. L. & Wilczynski, S. P. (1996). Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 88, 1361–1368.
- Caelles, C., Helmborg, A. & Karin, M. (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370, 220–223.
- Chakrabarti, O., Veeraraghavalu, K., Tergaonkar, V., Liu, Y., Androphy, E. J., Stanley, M. A. & Krishna, S. (2004). Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by Notch signaling and oncogenic Ras. *J Virol* 78, 5934–5945.
- Chen, X., Ko, L. J., Jayaraman, L. & Prives, C. (1996). p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 10, 2438–2451.
- Chipuk, J. E. & Green, D. R. (2004). Cytoplasmic p53: Bax and forward. *Cell Cycle* 3, 429–431.
- Czegledy, J., Evander, M., Hernadi, Z., Gergely, L. & Wadell, G. (1994). Human papillomavirus type 18 E6* mRNA in primary tumors and pelvic lymph nodes of Hungarian patients with squamous cervical cancer. *Int J Cancer* 56, 182–186.
- Dalstein, V., Riethmüller, D., Prêtre, J.-L., Le Bail Carval, K., Sautière, J.-L., Carbillet, J.-P., Kantelip, B., Schaal, J.-P. & Mouglin, C. (2003). Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 106, 396–403.
- De Boer, M. A., Peters, L. A. W., Aziz, M. F., Siregar, B., Cornain, S., Vrede, M. A., Jordanova, E. S. & Fleuren, G. J. (2005). Human

- papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *Int J Cancer* 114, 422–425.
- Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. & Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 8, 2540–2551.
- Halpern, A., McBride, A., Myers, G., Baker, C., Wheeler, C. M. & Doorbar, J. (editor) (1997). *Human Papillomaviruses. A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences*. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory.
- Hecht, J. L., Kadish, A. S., Jiang, G. & Burk, R. D. (1995). Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer* 60, 369–376.
- Hildesheim, A., Schiffman, M., Bromley, C. & 12 other authors (2001). Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 93, 315–318.
- Im, S. S., Wilczynski, S. P., Burger, R. A. & Monk, B. J. (2003). Early stage cervical cancers containing human papillomavirus type 18 DNA have more nodal metastasis and deeper stromal invasion. *Clin Cancer Res* 9, 4145–4150.
- Kämmer, C., Warthorst, U., Torrez-Martinez, N., Wheeler, C. M. & Pfister, H. (2000). Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* 81, 1975–1981.
- Lassus, P., Ferlin, M., Piette, J. & Hübner, U. (1996). Anti-apoptotic activity of low levels of wild-type p53. *EMBO J* 15, 4566–4573.
- Lizano, M., Berumen, J., Guido, M. C., Casas, L. & Garcia-Carranca, A. (1997). Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 89, 1227–1231.
- Mantovani, F. & Banks, L. (2001). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20, 7874–7887.
- McLachlin, C. M., Tate, J. E., Zitz, J. C., Sheets, E. E. & Crum, C. P. (1994). Human papillomavirus type 18 and intraepithelial lesions of the cervix. *Am J Pathol* 144, 141–147.
- Moscicki, A.-B., Hills, N., Shiboski, S. & 9 other authors (2001). Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA* 285, 2995–3002.
- Myers, G., Bernard, H. U., Delius, H., Favre, J., Icenogle, J., Van Ranst, M. & Wheeler, C. M. (editors) (1994). *Human Papillomaviruses. A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences*. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory.
- Ong, C.-K., Chan, S.-Y., Saveria Campo, M. & 8 other authors (1993). Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* 67, 6424–6431.
- Ordóñez, R. M., Espinosa, A. M., Sánchez-González, D. J., Armendáriz-Borunda, J. & Berumen, J. (2004). Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gen Virol* 85, 1433–1444.
- Pim, D. & Banks, L. (1999). HPV-18 E6*1 protein modulates the E6-directed degradation of p53 by binding to full-length HPV-18 E6. *Oncogene* 18, 7403–7408.
- Pim, D., Storey, A., Thomas, M., Massimi, P. & Banks, L. (1994). Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells. *Oncogene* 9, 1869–1876.
- Pim, D., Massimi, P. & Banks, L. (1997). Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. *Oncogene* 15, 257–264.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129–1136.
- Schlecht, N. F., Kulaga, S., Robitaille, J. & 8 other authors (2001). Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 286, 3106–3114.
- Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., O'Connor, P. M. & Fornace, A. J., Jr (1995). Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* 10, 1053–1059.
- Stacey, S. N., Jordan, D., Snijders, P. J. F., Mackett, M., Walboomers, J. M. M. & Arrand, J. R. (1995). Translation of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from bicistronic mRNA is independent of splicing events within the E6 open reading frame. *J Virol* 69, 7023–7031.
- Stöppler, M. C., Ching, K., Stöppler, H., Clancy, K., Schlegel, R. & Icenogle, J. (1996). Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 70, 6987–6993.
- Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M. & 7 other authors (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189, 12–19.
- Werness, B. A., Levine, A. J. & Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248, 76–79.
- WHO (2004). *The World Health Report 2004: Changing History*, Statistical Annex. Geneva: World Health Organization (<http://whqlibdoc.who.int/whr/2004/924156265X.pdf>).
- Xi, L. F., Koutsky, L. A., Galloway, D. A., Kuypers, J., Hughes, J. P., Wheeler, C. M., Holmes, K. K. & Kiviat, N. B. (1997). Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 89, 796–802.
- Zehbe, I., Wilander, E., Delius, H. & Tommasino, M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 58, 829–833.
- Zhang, H.-G., Wang, J., Yang, X., Hsu, H.-C. & Mountz, J. D. (2004). Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. *Oncogene* 23, 2009–2015.
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2, 342–350.



Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population

Marcela Lizano ^{a,*}, Erick De la Cruz-Hernández ^a, Adela Carrillo-García ^a,
Alejandro García-Carrancá ^a, Sergio Ponce de Leon-Rosales ^b, Alfonso Dueñas-González ^a,
Dulce María Hernández-Hernández ^c, Alejandro Mohar ^a

^a Unit of Biomedical Research in Cancer, National Cancer Institute/Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

^b Clinical Epidemiology Unit, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

^c Medical Research Unit in Oncology Diseases, Pathology Department, Oncology Hospital, Centro Médico Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

Received 8 April 2005

Available online 20 January 2006

Abstract

Objective. Several intratype variants of HPV16 and 18 have been identified. These variants are associated with populations from different geographic regions, and show a differential distribution among the severity of the cervical lesion, most likely due to different pathogenic potential. The objective of this study was to investigate the variant distribution of HPV16 and 18 in a Mexican population and its association with the severity of the cervical lesion and the histological lineage of cervical cancer.

Methods. HPV types 16 and 18 detection was performed in 412 samples of preinvasive and invasive specimens from patients attending a Primary Health-Care Center, an Early Cervical Lesion Clinic, or a Cancer Center. Distribution of HPV variants was correlated with the cytological findings and tumor cell types using contingency tables. Statistical difference was tested with the Fisher's Exact Test or its Fisher–Freeman–Halton extension for RxC tables. Alpha value was set at the $P < 0.05$.

Results. Among the 277 women included in this study without cancer, 63.5% (176 cases) had a normal cytology; from the remaining 101 women, 53.5% were LSIL (54 cases), and 46.5% HSIL (47 cases). From a total of 135 invasive carcinomas, 78.5% were squamous (106 cases); 6.6% adenocarcinoma (9 cases); 9.6% adenosquamous (ADSC) (13 cases); and 5.1% were undifferentiated carcinoma (7 cases). HPV16 E and AA-a were evenly distributed among preinvasive and invasive lesions. However, the isolate AA-c was exclusively found in cervical cancer. HPV18 Var-1(E) was almost exclusively found in invasive lesions, while the HPV18 Var-2(A1) predominated in normal or preinvasive lesions. In invasive cancer, this variant was found only in squamous tumors.

Conclusions. The differential distribution of HPV16 and 18 variants in cervical lesions we found further supports experimental data on the different pathogenic potential of HPV16 and 18 variants for cervical cancer development.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: HPV; Intratypic variation; Cervical cancer

Introduction

Invasive cervical cancer (ICC) represents the second most common malignant neoplasia in women worldwide, with about 500,000 new cases diagnosed yearly [1]. This type of cancer includes mainly three histological types, squamous cell

carcinoma, adenocarcinoma, and adenosquamous carcinoma. In Mexico, cervical cancer is the most common malignancy and constitutes the first cause of death by cancer in women from 25–64 years old [2]. Epidemiological studies have clearly established human papillomavirus (HPV) persistent infections as the central cause of ICC [3,4]. Even though there are more than 150 HPV types identified to date [5], only 17 of them, called “high risk types”, are significantly associated to cervical cancer [6]. HPV16 and HPV18 are the HPV types most commonly identified in neoplasias; found in 40–60% and 10–20%, respectively, in ICC [4,7]. It has been shown that ICC

* Corresponding author. Division of Basic Research, Instituto Nacional de Cancerología, SSA Av. San Fernando No. 22, Col. Sección 16, Tlalpan 14080, Mexico City, Mexico.

E-mail address: lizano@servidor.unam.mx (M. Lizano).

emerges from cervical intraepithelial neoplasia (CIN) induced by high risk HPV types persistent infections [8]. However, the vast majority of CIN lesions regress spontaneously and only a few of them persist or progress to invasive carcinoma [4]. By other side, infections induced by high risk HPV can be found in 10% to 16% of healthy women without clinical nor cytological evidence of cervical lesions [9,10]. Therefore, it is assumed that the association of HPV and ICC fulfills the established criteria for causal postulates, but is not necessarily, a direct-and-effect association [11].

It has been proposed that HPV intratypic variations could affect oncogenic potential to cervical cancer development. HPV variants have been found to differ by less than 2% from the reference viral type sequence in coding genes as E6, E7, L1, and L2, and by up to 5% in the LCR non-coding region [12]. An association between HPV16 and HPV18 variants and cervical cancer has been found [13–18]. It has been shown that some variants of HPV16, the most frequent HPV type in ICC, present differences in their biological behavior. Analysis of some HPV16 genes as E6, E7, as well as the LCR, critically involved in viral and cellular regulation, has shown that intratypic sequence variations may alter their biological properties [19–21].

HPV18 is particularly interesting, since it is reported to be mainly associated with adenocarcinoma (ADC), while HPV16 is more frequent in squamous cell carcinoma (SCC) [22,23,7]. Hecht et al. [13] found that certain HPV18 specific isolates predominate in premalignant lesions, while these isolates were absent in cancer. We previously found an HPV18 isolate exclusively associated with SCC [14]. This suggests the possibility that variants of HPV18 may also have a different biological behavior. These findings are supported by recent data of an African variant with similar characteristics [18].

Since infections with HPV18 are less frequently found than HPV16, there is little information with regard to the prevalence of different isolates of this HPV type in premalignant lesions and cervical cancer. Therefore, the aim of this study was to investigate the frequency and distribution of HPV16 and HPV18 intratypic variants found in Mexican women with normal cervical epithelia, low and high grade intraepithelial lesions, and cervical cancer. We also wanted to determine if there exists any association of certain HPV variants and histological features that could help us to define variants at risk for cervical high grade lesions and cancer progression. We think that this information is essential in the development of cervical cancer prevention strategies.

Materials and methods

Study subjects

The study participants corresponded to 135 women newly diagnosed for ICC, with no previous treatment, attending to the National Cancer Institute of Mexico from October 1998 to May 2000. The invited participants signed informed consent according to recommendations of the ethical review committee of the same Institute. Cervical biopsies were taken from these women since either the gynecological exam or the colposcopy revealed a macroscopic cancer lesion. Biopsy sections were read by a single pathologist and only one cytologist. Invasive disease was staged according to criteria of the

Federation International of Gynecology and Obstetrics (FIGO). The second group of participants corresponded to 277 women without the diagnosis of ICC. From this group, 63.5% of the samples had a normal PAP smear and came from patients attending primary health-care clinics of the Mexican Institute of Social Security (IMSS). The remaining samples came from patients referred to the Early Cervical Lesions Clinic from the IMSS because of an abnormal PAP result. All samples were taken consecutively from these women, from October 1998 through January 2000. All of them signed an Informed Consent form. Among the inclusion criteria, was that they should not have received any previous treatment in the last 3 months. Two cervical cell scrapings were collected with cytobrush, from both the ecto- and endocervix. One of the specimens was subjected to routine cytological analysis (Pap smear). Samples were graded according to the Bethesda system for Pap smear classification [24]. Cells present on the cytobrush of the second specimen were suspended in 1 ml of lysis buffer and stored at -20°C until analysis.

DNA extraction and HPV detection

ICC biopsy specimens and cervical swab samples were digested with 1 ml of lysis buffer (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0.1 M pH 8, SDS 0.5%, Proteinase K 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, RNase A 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 55°C for 3 h. DNA was extracted with phenol/chloroform precipitations as described by Sambrook et al. [25]. The obtained DNA was amplified for β -globin (GH20/PC04) in conditions described by Resnick et al. [26] and later submitted to type specific HPV amplification. Primers were designed to amplify the E6 genes of HPV16: E6-5' (5'-GGGATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGA-3'), E6-3' (5'-GGGTTACAGCTGGGTTTCTCTACGTGT-3'); and HPV18: E6-5' (5'-ATGGCGCGCTTTGAAGATCCAACA-3'), E6-3' (5'-GGGTATACTTGTGTTTCTCTGCGTCG-3'). To confirm variant origin, according to data published by Ong et al. [27], HPV18 samples were also submitted to PCR assays with specific primers amplifying a fragment of LCR region: LCR 18A (5'-TTTCGGTTGCCTTTGGCTTATG-3'); LCR18B (5'-CGGTTGCATAAACATATGAT-3'). PCR amplifications were carried out in 20 μl reaction mixture containing 10 pmol of each primer, 1.5 mM MgCl_2 and 1 U TaqGold Polymerase (Applied Biosystems). DNA was amplified with the following steps for both amplification reactions: an initial 10 min denaturation at 94°C , followed by 38 cycles of 94°C for 50 s, 55°C 50 s, and 72°C 50 s, and a final elongation step of 7 min at 72°C . Positive controls with DNA extracted from HeLa (HPV18 positive) or SiHa (HPV16 positive) cell lines, as well as a negative control of a mixture without template DNA, were included in every set of 10 clinical specimens for each PCR run. All products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels stained with ethidium bromide. HPV16 and HPV18 PCR positive samples were directly sequenced with BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), according to manufacturer's protocol. Whenever a sequence with undetermined regions was obtained, both forward and reverse primers were used for its definition. HPV Sequences were aligned using BLASTn software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html>). HPV16 and HPV18 variant identity was established according to the data published by Yamada et al. [28] and Ong et al. [27].

Statistical analysis

Differences of positivity of HPV types 16 and 18 and their variants for each of the cytologic findings and tumor cell types were evaluated using contingency tables. Statistical difference was tested with the Fisher's Exact Test for 2×2 tables or its Fisher-Freeman-Halton extension for RXC tables. Alpha value was set at the $P = 0.05$ level. Analyses were performed with StatXact 4 [29].

Results

HPV types 16 and 18 distribution

The frequency and distribution of different isolates of HPV16 and HPV18 were analyzed in ICC biopsies and samples from cervical smears with high (HSIL) and low (LSIL) grade squamous intraepithelial lesions, as well as Pap smears

diagnosed as normal cytologies. From the total population of 277 women without the diagnosis of ICC, 176 (63.5%) had a normal PAP smear. The remaining 101 were recruited from the Early Cervical Lesion Clinic at the IMSS; within this group, 54 (53.5%) had LSIL and 47 (46.5%) HSIL. The diagnosis of ICC in the 135 biopsies was confirmed by histopathological analysis. This analysis showed that 78.5% of the cases had squamous cell carcinoma (SCC) (106 cases); 6.6% adenocarcinoma (ADC) (9 cases); 9.6% adenosquamous carcinoma (ADSC) (13 cases); and 5.1% were undifferentiated carcinoma (UC) (7 cases).

HPV detection was performed in the DNA extracted from all of these samples through PCR with specific primers from both HPV16 and HPV18. The distribution of HPV16 and 18 types was significantly associated with the cytologic findings ($P = 0.0000$ and 0.0005 , respectively) (Table 1). As it was previously reported, the prevalence of these viral types increases while the lesion grade progresses [30]. From the 135 ICC biopsies analyzed, 50.3% were positive to HPV16 (68 cases), while 15.5% resulted positive to HPV18 (21 cases). In the case of the 176 normal cytologies, 9.1% were positive to HPV16 (16 cases); while 2.8% were HPV18 (5 cases). With respect to the intraepithelial lesions, 36 cases were positive to HPV16, which means a 35.6% from the 101 samples of the original group. Meanwhile, 7 resulted positive to HPV18 (7%).

HPV16 and 18 variant distribution

Intratype variant distribution was determined through E6 sequence in samples positive to HPV16. In the case of HPV18, intratype variation was determined by both E6 and LCR sequences. For HPV16, as it can be seen in Table 2, three different isolates were found: E (European or reference clone), AA-a (Asian–American, subvariant a), and AA-c (subvariant c). The most prevalent isolate found for all types of lesions positive for HPV16 was the E clone, corresponding to 9 of 16 normal cytologies (56.2%), 7 of 13 low grade lesions (53.8%), 17 of 23 high grade lesions (73.9%), and 40 of 68 cervical cancers (58.8%). Isolate AA-a followed in frequency, corresponding to 7 of 16 HPV16 positive normal cytologies (43.7%); 6 of 13 low grade lesions (46%); 6 of 23 high grade lesions (26%); and 22 of 68 cervical cancers (32.3%). Therefore, no significant differences were found in the distribution of these E and AA-a isolates within the distinct grade lesions. However, the isolate AA-c was exclusively found in cervical cancer, despite that it represented only the 8.8% (6 cases) of HPV16 positive samples with ICC.

Table 1
Distribution of HPV16 and HPV18 in Pap smear from normal cytologies, intraepithelial lesions, and biopsies from Invasive Cervical Cancer

| HPV type | Normal cytology <i>n</i> = 176 | LSIL <i>n</i> = 54 | HSIL <i>n</i> = 47 | ICC <i>n</i> = 135 | <i>P</i> values |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|
| HPV16 | 16 (9.1) | 13 (24) | 23 (48.9) | 68 (50.3) | 0.0000 |
| HPV18 | 5 (2.8) | 3 (5.5) | 4 (8.5) | 21 (15.5) | 0.0005 |
| HPV16 and 18 | 21 (11.9) | 16 (29.6) | 27 (57.4) | 89 (65.9) | |

Differences in HPV18 and 16 distributions were observed between normal cytology/LSIL and HSIL/ICC. Percentage is shown in parentheses.

Table 2
Distribution of HPV16 and HPV18 variants in normal cytologies, intraepithelial lesions, and Invasive Cervical Cancer

| Variants | Normal cytology <i>n</i> = 16 | LSIL <i>n</i> = 13 | HSIL <i>n</i> = 23 | ICC <i>n</i> = 68 | <i>P</i> values |
|---------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|
| HPV16 AA-a | 7 (43.7) | 6 (46) | 6 (26) | 22 (32.3) | NS |
| AA-c | 0 | 0 | 0 | 6 (8.8) | |
| E | 9 (56.2) | 7 (53.8) | 17 (73.9) | 40 (58.8) | |
| Variants | Normal cytology <i>n</i> = 5 | LSIL <i>n</i> = 3 | HSIL <i>n</i> = 4 | ICC <i>n</i> = 21 | <i>P</i> values |
| HPV18 Var1(E) | 1 (20) | 0 | 0 | 13 (61.9) | 0.039 |
| Var2(Af) | 3 (60) | 2 (66) | 2 (50) | 5 (23.8) | |
| Ref(AsAi) | 1 (20) | 1 (33) | 2 (50) | 3 (14.2) | |

Variants of HPV16: AA, Asian–American; E, European or reference clone. Variants of HPV18: AsAi, reference clone from the Asian–American branch; Var-1(E), is similar to T18-9 Tanzanian clone from the European branch; Var-2, relative to the African branch. The distribution of HPV18 variants was significantly different between Normal cytology/SIL vs. ICC.

Although the prevalence of HPV18 is lower than for HPV16 in all the different grade lesions, we could observe important associations. Our data show that, in the samples positive for HPV18, an isolate from the African branch, Var2(Af), predominate in normal cytologies (3/5) and in intraepithelial lesions (4/7); meanwhile Var1(E), from the European branch, is the isolate most frequently found in ICC (13/20). It is worth to mention that only 1 case of Var1(E) was found in both normal cytologies and SILs. Even in a low frequency, the HPV18 reference clone that belongs to the Asian–Amerindian branch (AsAi), is homogeneously distributed in all clinical groups.

Distribution of HPV variants according to histopathology of ICC

Variant distribution was grouped according to histopathological diagnosis. In 62 SCC tumors positive to HPV16 and HPV18, 80.6% were positive to HPV16, and 19.3% corresponded to HPV18. This relation was found significantly different for ADC and ADSC tumors (20 cases), where 55% corresponded to HPV16 and 45% were positive to HPV18 ($P < 0.05$, chi-square test). 16.1% from the HPV16 positive tumors corresponded to ADC/ADSC; 10.2%, to UC; while 73% were SCC. No significant differences in distribution of HPV16 variants among distinct histological types were observed (Table 3).

From the tumors positive to HPV18, 57.1% were SCC; 42.8%, were both, ADC and ADSC. Var 1(E) appears to be homogeneously distributed among the distinct histological types of ICC analyzed. However, we found an important association between the HPV18 reference clone (AsAi) and tumors with an adeno origin. Interestingly, Var2(Af) was exclusively found in SCC tumors.

Discussion

Several studies show that HPV intratype variants are distributed differently among geographic regions, observing

Table 3
Distribution of variants in ICC biopsies positive to HPV16 and 18

| Cell type | HPV16 variants | | | No. tumors | HPV18 variants | | | No. tumor |
|-----------------|----------------|----------|----------|------------|----------------|----------|----------|-----------|
| | AA-a | AA-c | E | | Ref(AsAi) | Var1(E) | Var2(Af) | |
| SCC | 16 (72.7) | 4 (66.6) | 30 (75) | 50 | 0 | 7 (53.8) | 5 (100) | 12 |
| ADC | 2 (9) | 1 (16.6) | 1 (2.5) | 4 | 1 (33.3) | 3 (23) | 0 | 4 |
| ADSC | 1 (4.5) | 1 (16.6) | 5 (12.5) | 7 | 2 (66.6) | 3 (23) | 0 | 5 |
| UC | 3 (13.6) | 0 | 4 (10) | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 22 | 6 | 40 | 68 | 3 | 13 | 5 | 21 |
| <i>P</i> values | NS | | | | 0.066 | | | |

Distribution was analyzed according to histological type. Histological diagnosis was previously confirmed through pathologic analysis. SCC, squamous cell carcinoma; ADC, adenocarcinoma; ADSC, adenosquamous carcinoma; and UC, undifferentiated carcinoma. Almost significant differences in distribution of HPV18 variants within the different histological types were observed ($0.5 < P < 0.10$, Fisher's Exact Test).

an important association with the ethnicity of the studied population. Since it is proposed that HPV intratypic variants may differ in biological properties and therefore in oncogenicity, this fact may explain in part the high prevalence of cervical cancer in some countries. Despite that screening programs appear to be getting better results, Mexico, however, maintains a high incidence of cervical cancer [2]. In this study, the presence of HPV16 and 18 variants was examined, with the aim of determining its distribution in normal cervical scrapes, preneoplastic lesions, and invasive cervical cancer (ICC), as well as among different distinct histological origins of ICC, from a Mexican population.

Our results show that HPV16 is more prevalent than HPV18 either in premalignant lesions as in ICC. These data agree with worldwide results where HPV16 is the most prevalent type in ICC from all geographic regions studied followed, in most of the cases, by HPV18 [4,7]. In the same way, the proportion of both HPV types clearly augments in accordance to the grade of the lesion, from normal cytology to ICC; this is supported by previous data of Schelcht et al. [31], where the presence of high risk HPV types is higher as the lesion evolves.

In relation to HPV16 and 18 distributions according to the histological type of ICC, we found important differences. In squamous tumors positive to HPV16 and 18, the presence of HPV16 was four times higher than for HPV18. Whereas in tumors with adeno origin (ADSC and ADC), we found a similar proportion for both types. Nevertheless, various reports have shown that the prevalence of HPV18 in adenocarcinomas is higher than for any other high risk HPV type [7,18]. This difference may be the reflect of a particular distribution of the HPV18 that we found in ICC, where 57% of the tumors positive to HPV18 were associated to SCC, harboring specific HPV18 variants.

When analyzing HPV16 variant distribution, we only found isolates belonging to the European and Asian–American branches [28]. The HPV18 isolates identified in our study belong to the European, Asian–Amerindian, and African branches [27]. No significant association of HPV16 variants and cytological findings was found. Nevertheless, we found that the isolate subclass AA-c was exclusively present in ICC, while this variant was absent from either normal cytologies or premalignant lesions (Table 2). Similar findings were obtained in a study with samples from the southeast of the Mexican Republic, where AA isolates were absent from LSILs [32]. In

another work with Mexican samples, AA-c variant was identified with a high prevalence in younger women with cervical cancer [17]. These authors found that almost a quarter of cervical cancers analyzed in such study could be attributable to AA variants, explaining in part the high incidence of cervical cancer in Mexican women. We indeed found that 20% of the studied ICCs were positive to AA variants. However, we found a smaller positivity to the AA-c isolate (4.4% vs. 11.0%), fact that may be explained from differences in geographic distribution of the population studied. In addition, an epidemiological study performed on a Brazilian population showed that HPV16 infections with non-European variants have a tendency to persist over European variants [33]. A higher oncogenicity has been previously proposed for the AA variants through the analysis of the activity of p97 promoter, where AA-c has a higher transcriptional activity than promoters of HPV16 E variants [20]. Recently, Ordoñez et al. [34] demonstrated that even this variant is present in more aggressive tumors; it maintains an intact ORF E2 gene, whose expression is down-regulated by an alternative splicing.

In the case of HPV18 variant distribution, we obtained significant results. There is a clear difference between variant distribution and cytological findings. The presence of Var-1(E) mainly in ICCs and its absence in SIL could be indicative of a higher oncogenicity for this isolate, possibly influencing infected cervical epithelia to a faster progression to cervical cancer. Meanwhile, the Var-2(Af) isolate is present in more than half of the normal cytologies and premalignant lesions positive to HPV18, suggesting a different biological behavior and possibly a slower progression rate for lesions with this variant. In a previous report, a decreased oncogenic potential is proposed for an HPV18 African isolate, which was found predominately in premalignant lesions [13]. Further E2 gene sequence analysis showed a similarity between Var-2(Af) and such isolate (data not shown). The proposal of an association of Var-2(Af) with a decreased oncogenic potential is encouraged by data obtained through the histological analysis of the tumors. Var-2(Af) was exclusively found in SCC, which have a relative better prognosis than ADC/ADSC, where Var-1(E) and Ref(AsAi) were the prevailing types. This finding was previously reported [14] and recently reinforced by data obtained by De Boer et al. [18]. Functional analysis of the LCR from HPV18 variants was performed by Slichero et al. [35], where they found that Asian–Amerindian isolates have a higher transcriptional activity than

European variants. However, transcriptional activity of African isolates has not been tested. Recently, we have reported that a differential splicing within the HPV18 E6 variant oncogenes may be involved in differences in biological behavior, suggesting that a lower oncogenicity for the African HPV18 isolate could be the result of the presence of lower levels of E6 protein [36].

At present, various studies have been conducted to establish HPV variant distribution in different populations, and functional activities of viral variant proteins have been compared. Our study adds information about HPV16 and 18 variant distributions along different clinical outcomes constituting the natural history of HPV infection. The results mark the importance of continuing epidemiological studies of high risk HPV variants covering different features as ethnicity, HLA haplotype, infection persistence, and risk factors, as well as biological behavior, in order to distinguish variants at risk for cervical cancer development.

Acknowledgments

This work was partially supported by CONACYT, grants 41313 and 2004-01-067. We are grateful to Miriam Guido and Manuel Gutiérrez for their valuable participation.

References

- [1] World Health Report 2004: Changing History. Statistical annex. World Health Organization, <http://www.who.int/whr/2004/en/index.htm>.
- [2] Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas RHNM. Dirección General de Epidemiología SSA. México. 2002.
- [3] Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch FX, Ummur KJA, Shan KV. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189(1):12–9.
- [4] Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55(4):244–65.
- [5] de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324(1):17–27.
- [6] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348(6):518–27.
- [7] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;88(1):63–73.
- [8] Walboomers JM, Meijer CJ. Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *J Pathol* 1997;181(3):253–4.
- [9] Kjaer SK, van den Brule AJ, Bock JE, Poll PA, Engholm G, Sherman ME, et al. Determinants for genital human papillomavirus (HPV) infection in 1000 randomly chosen young Danish women with normal Pap smear: are there different risk profiles for oncogenic and nononcogenic HPV types? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6(10):799–805.
- [10] Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001;91(3):412–20.
- [11] Wright Jr TC, Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. *N Engl J Med* 2003;348(6):489–90.
- [12] Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994;170(5):1077–85.
- [13] Hecht JL, Kadish AS, Jiang G, Burk RD. Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer* 1995;60(3):369–76.
- [14] Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, Garcia-Carranca A. Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(16):1227–31.
- [15] Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(11):796–802.
- [16] Zebbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 1998;58(4):829–33.
- [17] Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, et al. Asian–American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case–control study. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(17):1325–30.
- [18] De Boer MA, Peters LA, Ariz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, et al. Human papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *Int J Cancer* 2005;114(3):422–5.
- [19] Stoppler MC, Ching K, Stoppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 1996;70(10):6987–93.
- [20] Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 8):1975–81.
- [21] Chakrabarti O, Veeraghavulu K, Tergaonkar V, Liu Y, Androphy EJ, Stanley MA, et al. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras. *J Virol* 2004;78(11):5934–45.
- [22] Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, Anton-Culver H, Vasilev SA, Berman ML, et al. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(19):1361–8.
- [23] Im SS, Wilczynski SP, Burger RA, Monk BJ. Early stage cervical cancers containing human papillomavirus type 18 DNA have more nodal metastasis and deeper stromal invasion. *Clin Cancer Res* 2003;9(11):4145–50.
- [24] Davey DD. Cervical cytology classification and the Bethesda system. *Cancer J* 2003;9(5):327–34.
- [25] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
- [26] Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK, Eichinger GH, Fox HS, ter Schegget J, Manos MM. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 1990;82(18):1477–84.
- [27] Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* 1993;67(11):6424–31.
- [28] Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 1997;71(3):2463–72.
- [29] Cytel software Corp. StatXact 4 for windows. Statistical software for exact nonparametric inference. Cambridge, 1999.
- [30] Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frias-Mendivil M, Solorza G, Lizano M. Usefulness of combining universal oligonucleotides in detecting human papillomavirus in cervical cancer and premalignant lesions. *Salud Publica Mex* 2004;46(1):7–15.
- [31] Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001;286(24):3106–14.

- [32] Gonzalez-Losa MR, Laviada Mier y Teran MA, Puerto-Solis M, Garcia-Carranca A. Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer. *J Clin Virol* 2004;29(2):95–8.
- [33] Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Roban T, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 12):2959–68.
- [34] Ordoñez RM, Espinosa AM, Sanchez-Gonzalez DJ, Armendariz-Borunda J, Berumen J. Enhanced oncogenicity of Asian–American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gen Virol* 2004;85(Pt 6):1433–44.
- [35] Sichero L, Franco EL, Villa LL. Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J Infect Dis* 2005;191(5):739–42.
- [36] De la Cruz-Hernández E, Garcia-Carranca A, Mohar-Betancourt A, Dueñas-González A, Contreras-Paredes A, Pérez-Cárdenas E, et al. Differential Splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J Gen Virol* 2005;86:2459–68.

12. REFERENCIAS

1. Ades S, Koushik A, Duarte-Franco E, Mansour N, Arseneau J, Provencher D, Gilbert L, Gotlieb W, Ferenczy A, Coutlée F, Roger M, Franco EL; Biomarkers of Cervical Cancer Risk (BCCR) Study Team. **Selected class I and class II HLA alleles and haplotypes and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia.** *Int J Cancer.* 2008; 122(12): 2820-6.
2. Aho J, Hankins C, Tremblay C, Forest P, Pourreaux K, Rouah F, Coutlée F; Canadian Women's HIV Study Group. **Genomic polymorphism of human papillomavirus type 52 predisposes toward persistent infection in sexually active women.** *J Infect Dis.* 2004; 190(1): 46-52.
3. Antinore MJ, Birrer MJ, Patel D, Nader L, McCance DJ. **The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors.** *EMBO J.* 1996; 15(8): 1950-60.
4. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowsert LM, Olson C, Brown JC. **Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction.** *Biophys J.* 1991; 60(6): 1445-56.
5. Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR, Vousden KH. **The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation.** *EMBO J.* 1990; 9(1): 153-60.
6. Berezutskaya E, Yu B, Morozov A, Raychaudhuri P, Bagchi S. **Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein.** *Cell Growth Differ.* 1997; 8(12): 1277-86.
7. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. **Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications.** *Int J Cancer.* 2006; 118(5): 1071-6.
8. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A. **Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study.** *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(17): 1325-30.
9. Bontkes HJ, van Duin M, de Gruijl TD, Duggan-Keen MF, Walboomers JM, Stukart MJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Scheper RJ, Stevens FR, Dyer PA, Sinnott P, Stern PL. **HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants.** *Int J Cancer.* 1998; 78(2): 166-71.

10. Bosch FX, de Sanjosé S. **Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality.** J Natl Cancer Inst Monogr. 2003; (31): 3-13.
11. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. **The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer.** J Clin Pathol. 2002; 55(4): 244-65.
12. Boyer SN, Wazer DE, Band V. **E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway.** Cancer Res. 1996; 56(20): 4620-4.
13. Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. **The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth.** EMBO J. 1999; 18(9): 2449-58.
14. Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, Anton-Culver H, Vasilev SA, Berman ML, Wilczynski SP. **Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer.** J Natl Cancer Inst. 1996; 88(19): 1361-8.
15. Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Gonzalez-Guerrero JF, Williamson AL, Hagmar B, Wiley DJ, Villarreal L, Bernard HU, Barrera-Saldaña HA. **Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants.** Virology. 2004; 319(2): 315-23.
16. Casas-Cordero M, Morin C, Roy M, Fortier M, Meisels A. **Origin of the koilocyte in condylomata of the human cervix: ultrastructural study.** Acta Cytol. 1981; 25(4): 383-92.
17. Chakrabarti O, Veeraraghavalu K, Tergaonkar V, Liu Y, Androphy EJ, Stanley MA, Krishna S. **Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras.** J Virol. 2004; 78(11): 5934-45.
18. Chan PK, Lam CW, Cheung TH, Li WW, Lo KW, Chan MY, Cheung JL, Cheng AF. **Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer.** J Natl Cancer Inst. 2002; 94(16): 1249-53.
19. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. **Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis.** Br J Cancer. 2003; 88(1): 63-73.
20. Crum CP, Abbott DW, Quade BJ. **Cervical cancer screening: from the Papanicolaou smear to the vaccine era.** J Clin Oncol. 2003; 21(10 Suppl): 224s-230s.

21. de Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, Jordanova ES, Fleuren GJ. **Human papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries.** *Int J Cancer.* 2005; 114(3): 422-5.
22. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. **Classification of papillomaviruses.** *Virology.* 2004; 324(1): 17-27.
23. Deau MC, Favre M, Orth G. **Genetic heterogeneity among human papillomaviruses (HPV) associated with epidermodysplasia verruciformis: evidence for multiple allelic forms of HPV5 and HPV8 E6 genes.** *Virology.* 1991; 184(2): 492-503.
24. Doyle DA, Lee A, Lewis J, Kim E, Sheng M, MacKinnon R. **Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ.** *Cell.* 1996; 85(7): 1067-76.
25. Dürst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. **The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours.** *J Gen Virol.* 1985 Jul;66 (Pt 7):1515-22.
26. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. **The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product.** *Science.* 1989; 243(4893): 934-7.
27. Eriksson A, Herron JR, Yamada T, Wheeler CM. **Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region.** *J Gen Virol.* 1999; 80(Pt 3): 595-600.
28. Glaunsinger BA, Lee SS, Thomas M, Banks L, Javier R. **Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins.** *Oncogene.* 2000; 19(46): 5270-80.
29. Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, Iftner T. **Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA.** *J Virol.* 1996; 70(4): 2339-49.
30. Guccione E, Massimi P, Bernat A, Banks L. **Comparative analysis of the intracellular location of the high- and low-risk human papillomavirus oncoproteins.** *Virology.* 2002; 293(1): 20-5.
31. Hecht JL, Kadish AS, Jiang G, Burk RD. **Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential.** *Int J Cancer.* 1995; 60(3): 369-76.
32. Heinzl PA, Chan SY, Ho L, O'Connor M, Balaram P, Campo MS, Fujinaga K, Kiviat N, Kuypers J, Pfister H, et al. **Variation of human papillomavirus type 6**

- (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world.** *J Clin Microbiol.* 1995; 33(7): 1746-54.
33. Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Sherman ME, Wacholder S, Chen S, Rodriguez AC, Burk RD. **Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica.** *J Infect Dis.* 2005; 191(11): 1796-807.
34. Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez A, Bratti MC, Sherman ME, Scarpidis U, Lin QQ, Terai M, Bromley RL, Buetow K, Apple RJ, Burk RD. **Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer.** *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(4): 315-8.
35. Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, et al. **The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations.** *J Virol.* 1993; 67(11): 6413-23.
36. Howley, P. M. & Lowy, D. R. (2001). **Papillomaviruses and their replication.** In *Fields Virology*, 4th edn. D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 2001. pp. 2197–2229.
37. Hubert WG. **Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle.** *J Virol.* 2005; 79(10): 5914-22.
38. IARC. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human Papillomaviruses**, vol 64. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1995.
39. Im SS, Wilczynski SP, Burger RA, Monk BJ. **Early stage cervical cancers containing human papillomavirus type 18 DNA have more nodal metastasis and deeper stromal invasion.** *Clin Cancer Res.* 2003; 9(11): 4145-50.
40. Jiang M, Milner J. **Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference.** *Oncogene.* 2002; 21(39): 6041-8.
41. Jones DL, Alani RM, Münger K. **The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2.** *Genes Dev.* 1997; 11(16): 2101-11.
42. Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. **Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants**

- and functional consequences for P97 promoter activity.** *J Gen Virol.* 2000; 81(Pt 8): 1975-81.
43. Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M. **Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(21): 11612-6.
44. Kühne C, Gardiol D, Guarnaccia C, Amenitsch H, Banks L. **Differential regulation of human papillomavirus E6 by protein kinase A: conditional degradation of human discs large protein by oncogenic E6.** *Oncogene.* 2000; 19(51): 5884-91.
45. Lacey CJ, Lowndes CM, Shah KV. **Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease.** *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 3: S35-41.
46. Lichtig H, Algrisi M, Botzer LE, Abadi T, Verbitzky Y, Jackman A, Tommasino M, Zehbe I, Sherman L. **HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6.** *Virology.* 2006; 350(1): 216-27.
47. Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, García-Carrancá A. **Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer.** *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89(16): 1227-31.
48. Lizano M, De la Cruz-Hernández E, Carrillo-García A, García-Carrancá A, Ponce de Leon-Rosales S, Dueñas-González A, Hernández-Hernández DM, Mohar A. **Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population.** *Gynecol Oncol.* 2006; 102(2): 230-5.
49. Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, Singer A. **Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities.** *Int J Cancer.* 1996; 69(5): 364-8.
50. Longworth MS, Laimins LA. **Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68(2): 362-72.
51. Mantovani F, Banks L. **The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression.** *Oncogene.* 2001; 20(54): 7874-87.
52. Masson M, Hindelang C, Sibling AP, Schwalbach G, Travé G, Weiss E. **Preferential nuclear localization of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein in cervical carcinoma cells.** *J Gen Virol.* 2003; 84(Pt 8): 2099-104.

53. Mayo LD, Donner DB. **The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network.** Trends Biochem Sci. 2002; 27(9): 462-7.
54. McIntyre MC, Frattini MG, Grossman SR, Laimins LA. **Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding.** J Virol. 1993; 67(6): 3142-50.
55. McIntyre MC, Ruesch MN, Laimins LA. **Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107.** Virology. 1996; 215(1): 73-82.
56. McIntyre P. **Finding the viral link: the story of Harald zur Hausen.** Cancer World. 2005: 32-7.
57. McLachlin CM, Tate JE, Zitz JC, Sheets EE, Crum CP. **Human papillomavirus type 18 and intraepithelial lesions of the cervix.** Am J Pathol. 1994; 144(1): 141-7.
58. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. **Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer.** N Engl J Med. 2003; 348(6): 518-27.
59. Nakagawa S, Huibregtse JM. **Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase.** Mol Cell Biol. 2000; 20(21): 8244-53.
60. Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Pfister H, Tay SK, ter Meulen J, Villa LL, et al. **Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups.** J Virol. 1993; 67(11): 6424-31.
61. Ordóñez RM, Espinosa AM, Sánchez-González DJ, Armendáriz-Borunda J, Berumen J. **Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription.** J Gen Virol. 2004; 85(Pt 6): 1433-44.
62. Ozbun MA, Meyers C. **Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b.** J Virol. 1998; 72(4): 2715-22.
63. Pardee AB, Li CJ, Reddy GP. **Regulation in S phase by E2F.** Cell Cycle. 2004; 3(9): 1091-4.
64. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. **Global cancer statistics, 2002.** CA Cancer J Clin. 2005; 55(2): 74-108.

65. Parkin DM, Bray F. **Chapter 2: The burden of HPV-related cancers.** *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3: S11-25.
66. Pim D, Banks L. **HPV-18 E6*I protein modulates the E6-directed degradation of p53 by binding to full-length HPV-18 E6.** *Oncogene*. 1999; 18(52): 7403-8.
67. Pim D, Massimi P, Banks L. **Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth.** *Oncogene*. 1997; 15(3): 257-64.
68. Pim D, Storey A, Thomas M, Massimi P, Banks L. **Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells.** *Oncogene*. 1994; 9(7): 1869-76.
69. Pim D, Thomas M, Javier R, Gardiol D, Banks L. **HPV E6 targeted degradation of the discs large protein: evidence for the involvement of a novel ubiquitin ligase.** *Oncogene*. 2000; 19(6): 719-25.
70. Registro histopatológico de Neoplasias malignas, RHNM. Dirección general de epidemiología SSA. México. 2002.
71. Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH. **Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1/E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments.** *J Virol* 1997; 71(5): 3554-62.
72. Scheffner M, Münger K, Byrne JC, Howley PM. **The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(13): 5523-7.
73. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. **The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53.** *Cell*. 1990; 63(6): 1129-36.
74. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. **Human papillomavirus and cervical cancer.** *Lancet*. 2007; 370(9590): 890-907.
75. Schneider-Gädicke A, Kaul S, Schwarz E, Gausepohl H, Frank R, Bastert G. **Identification of the human papillomavirus type 18 E6 and E6 proteins in nuclear protein fractions from human cervical carcinoma cells grown in the nude mouse or in vitro.** *Cancer Res*. 1988; 48(11): 2969-74.
76. Schneider-Gädicke A, Schwarz E. **Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes.** *EMBO J*. 1986; 5(9): 2285-92.

77. Sichero L, Franco EL, Villa LL. **Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18.** J Infect Dis. 2005; 191(5): 739-42.
78. Stacey SN, Jordan D, Snijders PJ, Mackett M, Walboomers JM, Arrand JR. **Translation of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from bicistronic mRNA is independent of splicing events within the E6 open reading frame.** J Virol. 1995; 69(11): 7023-31.
79. Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. **HPV-mediated transformation of the anogenital tract.** J Clin Virol. 2005; 32 Suppl 1: S25-33.
80. Stewart D, Kazemi S, Li S, Massimi P, Banks L, Koromilas AE, Matlashewski G. **Ubiquitination and proteasome degradation of the E6 proteins of human papillomavirus types 11 and 18.** J Gen Virol. 2004; 85(Pt 6): 1419-26.
81. Stöppler MC, Ching K, Stöppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. **Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation.** J Virol. 1996; 70(10): 6987-93.
82. Stubenrauch F, Hummel M, Iftner T, Laimins LA. **The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes.** J Virol 2000; 74(3): 1178-86.
83. Tang S, Tao M, McCoy JP Jr, Zheng ZM. **The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation.** J Virol. 2006; 80(9): 4249-63.
84. Tao M, Kruhlik M, Xia S, Androphy E, Zheng ZM. **Signals that dictate nuclear localization of human papillomavirus type 16 oncoprotein E6 in living cells.** J Virol. 2003; 77(24): 13232-47.
85. The Human papillomaviruses compendium on line: http://VPHweb.lanl.gov/HTML_FILES/VPHcompintro4.html.
86. The world health report 2004-changing history. statistical annex. World Health Organization. <http://www.who.int/whr/2004/en/index.html>.
87. Tommasino M, Adamczewski JP, Carlotti F, Barth CF, Manetti R, Contorni M, Cavalieri F, Hunt T, Crawford L. **HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A.** Oncogene. 1993; 8(1): 195-202.

88. Trottier H, Franco EL. **The epidemiology of genital human papillomavirus infection.** *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 1: S1-15.
89. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. **Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia.** *J Gen Virol*. 2000; 81(Pt 12): 2959-68.
90. Wang J, Sampath A, Raychaudhuri P, Bagchi S. **Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells.** *Oncogene*. 2001; 20(34): 4740-9.
91. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. **Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53.** *Science*. 1990; 248(4951): 76-9.
92. Wooldridge TR, Laimins LA. **Regulation of human papillomavirus type 31 gene expression during the differentiation-dependent life cycle through histone modifications and transcription factor binding.** *Virology*. 2008; 374(2): 371-80.
93. Xi LF, Critchlow CW, Wheeler CM, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Hawes SE, Surawicz C, Goldbaum G, Holmes KK, Kiviat NB. **Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants.** *Cancer Res*. 1998; 58(17): 3839-44.
94. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, Kiviat NB. **Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia.** *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89(11): 796-802.
95. Xi LF, Koutsky LA, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Winer RL, Ho J, Kiviat NB. **Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007; 16(1): 4-10.
96. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. **Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective.** *J Virol*. 1997; 71(3): 2463-72.
97. Zehbe I, Mytilineos J, Wikström I, Henriksen R, Edler L, Tommasino M. **Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women.** *Hum Immunol*. 2003; 64(5): 538-42.
98. Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, Klimek F, Andersson S, Tommasino M. **p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development.** *Cancer Res*. 2001; 61(2): 608-11.

99. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. **Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype.** Cancer Res. 1998; 58(4): 829-33.
100. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Dürr P. **Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein.** Oncogene. 1996; 13(11): 2323-30.
101. Zhao Y, Lu S, Wu L, Chai G, Wang H, Chen Y, Sun J, Yu Y, Zhou W, Zheng Q, Wu M, Otterson GA, Zhu WG. **Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21(Waf1/Cip1).** Mol Cell Biol. 2006; 26(7): 2782-90.
102. Zheng ZM, Baker CC. **Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation.** Front Biosci. 2006; 11: 2286-302.

13. LISTA DE ABREVIACIONES

AA: Asiático americana.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

Af: Africana.

As: Asiática.

AsAi: Asiático amerindia.

CaCU: Cáncer Cérvico-Uterino.

E: Europea.

GFP: Proteína Verde Fluorescente.

NA: Norteamericana.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RHNM: Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas.

RLC: Región Larga de Control.

RT-PCR: Transcripción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

S³⁵: Radioisótopo Azufre-35.

VPH: Virus del Papiloma Humano.