UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFECTO DE LAS VARIACIONES INTRATIPO DE LOS GENES E1, E2 Y REGIÓN LARGA DE CONTROL DE VIRUS PAPILOMA HUMANO TIPO 18 SOBRE LA REPLICACIÓN VIRAL.

T E S I S

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
PRESENTA:

ALFREDO AMADOR MOLINA.

DIRECTORA DE TESIS: Dra. MARCELA LIZANO SOBERÓN.

México D.F. ABRIL 2009.

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

EFECTO DE LAS VARIACIONES INTRATIPO DE LOS GENES E1, E2 Y REGIÓN LARGA DE CONTROL DE VIRUS PAPILOMA HUMANO TIPO 18 SOBRE LA REPLICACIÓN VIRAL.

RECONOCIMIENTOS:

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Marcela Lizano Soberón en el laboratorio cuatro de investigación básica en el Instituto Nacional de Cancerología.

El comité tutoral que asesoró el desarrollo de la tesis estuvo formado por:

Dra. Marcela Lizano Soberón Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Alejandro García Carrancá Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Carlos Federico Arias Ortíz Instituto de Biotecnología, UNAM

Este proyecto contó con el apoyo financiero de CONACYT fondo: i0003; referencia: 60722 y apoyo parcial del Instituto Nacional de Cancerología.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día._____

El jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente Dr. Alejandro García Carrancá Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Vocal Dr. Jesús Santaolalla Tapia Instituto de Biotecnología, UNAM

Secretario Dra. Leticia Rocha Zavaleta Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Suplente Dr. Ramón A. González García Conde Instituto de Biotecnología, UNAM

Suplente Dr. Luis Padilla Noriega Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

CONTENIDO

Carátula

Reconocimientos

Índice

Relación de figuras

Relación de tablas

Resumen

Introducción

Justificación

Hipótesis

Objetivo general

Objetivos específicos

Discusión

Conclusiones

Referencias

ÍNDICE

	RESUMEN	**1**
1. -	**INTRODUCCIÓN**	**3**
1. -	ASPECTOS BÁSICOS DEL CÁNCER	**3**
1.1. -	EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DEL CÁNCER CERVICOUTERINO	**6**
1.2. -	EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	**11**
1.3. -	GENES VIRALES Y REGIONES NO CODIFICANTES DE CONTROL	**12**
1.4. -	REPLICACIÓN DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO.	**22**
1.5. -	TIPIFICACIÓN DE VPH Y SU IMPORTANCIA BIOLÓGICA	**25**
2. -	**JUSTIFICACIÓN**	**26**
3. -	**HIPÓTESIS**	**27**
4. -	**OBJETIVO GENERAL**	**27**
4. 1.-	**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**	**27**
5. -	**MATERIALES Y MÉTODOS**	**27**
6. -	**RESULTADOS**	**44**
6.1. -	SECUENCIACIÓN DE LAS TRES VARIANTES DEL GEN E1 DE VPH-18	**44**
6.2. -	CLONACIÓN DEL GEN E1 EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN PXJ40	**46**
6.3. -	VERIFICACIÓN DEL INSERTO “LCR” EN EL VECTOR PGL2-BASIC	**46**
6.4. -	VERIFICACIÓN DEL INSERTO E2 EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN PCG	**47**
6.5. -	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES E1 Y E2 POR RT-PCR	**47**
6.6. -	DETECCIÓN DE LOS PLASMIDOS pGL2-LCR INTRODUCIDOS POR LIPOFECCIÓN	**48**
6.7. -	ANÁLISIS DE LA REPLICACIÓN DE VPH-18 MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL	**50**
7. -	**DISCUSION**	**52**
8. -	**CONCLUSIONES**	**59**
9. -	**REFERENCIAS**	**60**

RESUMEN:

Actualmente el Cáncer Cervicouterino (CaCU) es la 2ª causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas, siendo el Virus de papiloma humano (VPH) el agente etiológico. Estos virus se clasifican en “alto” o “bajo riesgo oncogénico”. Los tipos de alto riesgo más frecuentes son VPH 16 y 18. Para que una lesión positiva a VPH evolucione hasta un CaCU es indispensable que el paciente presente una infección persistente sin embargo esto no asegura que todas las lesiones positivas a VPH evolucionen hasta CaCU, ya que hoy en día es bien conocido la intervención de otros factores para que se desarrolle un CaCU, como por ejemplo: un estado inmunodeficiente, mala nutrición, desequilibrios hormonales, factores genéticos y epigenéticos desregulados del individuo, así como carga viral y mutaciones intra-tipo de VPH (Von Knebel Doeberitz, 2002). Actualmente el VPH 16 es el más prevalente en CaCU en México y en el mundo, seguido por el tipo viral 18, sin embargo actualmente se conoce que las lesiones producidas por VPH18 son más agresivas y de peor pronóstico que el tipo viral 16. Por este motivo el trabajo realizado en este grupo de investigación se enfoca al tipo viral 18. Particularmente en México se han aislado tres variantes de VPH 18 (Variante Asiático-Americana o referencia, Variante Africana y Variante Europea). Estos aislados presentan ciertas asociaciones con diferentes estirpes histológicas de CaCU, que sugieren diferencias en patogenicidad (Lizano Soberón y Col, 2006). Se conoce en trabajos recientes que mutaciones intratipo de VPH 18 en E6 y “LCR” (Región Larga de Control) repercuten en su funcionamiento biológico (López-Saavedra, 2009 en prensa, De la Cruz and Col, 2005). En este trabajo se analiza el efecto biológico de las mutaciones intratipo de VPH18 en elementos virales necesarios para la replicación (E1, E2 y “LCR”), debido a que la replicación viral puede ser un elemento determinante en la carga viral, la cual ha sido asociada con el pronóstico de lesiones de cérvix asociadas a VPH. De esta manera, resulta muy importante determinar si las variaciones intratipo de VPH18 en genes implicados en la replicación viral influyen en este mecanismo viral, de tal manera que conocer la tasa replicativa de las variantes de VPH18 nos dará información valiosa para entender su papel dentro de la historia natural de infección.

En primer lugar se identificaron las mutaciones en el gen E1 mediante secuenciación de las variantes Europea, Asiática Amerindia y Africana de VPH18. Se encontraron pocos cambios en nucleótidos del gen E1 que dieran cambios en la secuencia predicha de aminoácidos, en relación con la secuencia de referencia; sin embargo la mayoría de estos se presentaron en el sitio de localización nuclear la cual interactúa con la proteína p80 para que E1 pueda localizarse en núcleo. Una vez determinados los cambios en los genes E1, E2, y la región LCR de cada una de las variantes de VPH18, se evaluó el efecto biológico de dichas mutaciones sobre la replicación. Para ello mediante PCR en tiempo real se midió el número de copias del plásmido con el origen de replicación de HPV18. Hasta el momento los resultados indican que solo las mutaciones en “LCR” son biológicamente importantes ya que traen consigo un efecto diferencial en la replicación. Resulta interesante que la mayoría de las mutaciones en la LCR, tanto en variante Africana como en variante Europea se presentan en una región denominada “KE” (Keratinocyte Enhancer), la cual se ha descrito que está implicada en modular la replicación viral. De esta manera el trabajo pretende aportar herramientas para entender por qué lesiones de cérvix positivas a un mismo tipo de VPH presentan un diferente comportamiento clínico.

1. – INTRODUCCIÓN.

1.- ASPECTOS BÁSICOS DEL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por alteraciones en los mecanismos que controlan la proliferación, diferenciación y muerte de las células en los organismos eucariontes. Los procesos de crecimiento y división se encuentran altamente regulados y/o controlados en todas las células de cada individuo, sin embargo existen excepciones como en las células cancerosas las cuales pierden el control de su crecimiento. La capacidad para crecer en condiciones inapropiadas o propagarse indefinidamente puede ser letal para cualquier organismo; sin embargo, es una característica de las células cancerosas, ya que estarán compartiendo con tejidos sanos por la sobrevivencia dentro del organismo.

Se han observado tres etapas generales en una célula con un fenotipo maligno:

- Inmortalización.- Describe la propiedad de las células de crecer en forma indefinida, sin que ocurra ningún otro cambio en su fenotipo.
- Transformación.- Consiste en la pérdida del control de los factores que regulan el crecimiento celular, aunados a cambios en el fenotipo celular; por ejemplo, las células transformadas crecen independientes de la presencia o ausencia de factores usualmente necesarios para el crecimiento.
- Metástasis.- Son todos los estados en los cuales la célula cancerígena obtiene la capacidad de invadir tejido normal, así que puede desplazarse desde el tejido de origen a otros tejidos, establecerse y formar un tumor secundario.

(Jiménez García L F, 2003)

La proliferación y diferenciación son dos procesos interdependientes y a la vez mutuamente excluyentes, son característicos del crecimiento y desarrollo de los organismos pluricelulares.

La mayoría de los tumores se origina como resultado de eventos múltiples. Es común que algunos de estos eventos estén relacionados con la activación de oncogenes, o con la inactivación de genes supresores de tumores. El requerimiento de múltiples eventos refleja el hecho de que una célula normal tiene múltiples mecanismos para regular su crecimiento y diferenciación, por lo que se requieren varios cambios separados para perder el control celular. (Chi V. Dang and col, 1997)

La mutación de un gen en una célula ocasiona la aparición de un clon celular diferente, cuya progenie tiene en común el mismo gen mutado. La aparición de una nueva mutación en algún otro gen origina un sub-clon que tiene en común, la mutación de esos dos genes.

La acumulación de mutaciones en el mecanismo de control del ciclo celular puede originar un clon celular capaz de crecer independiente de los estímulos del entorno, de formar un tumor, de crecer a través de membranas basales y de intersticios intercelulares produciendo un tumor infiltrante, proceso que se conoce como cáncer.

El desarrollo de un tumor maligno implica interacciones complejas entre diversos factores tales como factores genéticos, hormonales e inmunológicos.

La carcinogénesis procede a través de múltiples etapas relacionadas entre si, que incluyen:

1. Iniciación
2. Promoción (la cual lleva a la aparición de los tumores benignos)
3. Progresión (conversión del tumor benigno a tumor maligno)
4. Aumento en la evolución de los tumores que conlleva al crecimiento en el grado de malignidad. (Jason H. And Lawrence Loeb, 2005)

Los tumores se clasifican generalmente según el origen de las células de donde surgen y se agrupan en: 1) carcinomas, aquellos que cuyo origen son células epiteliales; 2) sarcomas, cuyo origen son las células del tejido conectivo y las células musculares (tejidos blandos), y 3) aquellos que no se ajustan a ninguna de las dos categorías anteriores y que incluyen la leucemia y los tumores de sistema nervioso. (Atlas of Clinical Oncology. 2001)

El proceso global de transformación, puede ocupar la mayor parte de la vida de un individuo. El tiempo de transición entre las etapas sucesivas puede ser aumentado o inhibido por la presencia de varios agentes o factores. Los datos obtenidos a la fecha por medio de la investigación indican que el 70% de los cánceres humanos se pueden prevenir, puesto que los factores de riesgo, es decir, los factores que determinan la incidencia, son principalmente exógenos. Los agentes exógenos o factores que se han identificado en los humanos incluyen: el hábito de fumar, los químicos ocupacionales y ambientales, la radiación, dieta, estilo de vida, así como virus, bacterias y parásitos. También debe hacerse notar que el factor hereditario tiene un papel importante en la susceptibilidad del individuo y que, en ciertas formas raras de cáncer, este factor juega un papel decisivo en la aparición de la enfermedad. (Julian Peto, 2001)

La aparición de un cáncer requiere la mutación de al menos 2 genes y en muchos casos hasta una docena de ellos, esto habitualmente ocurre por la exposición a factores carcinogénicos. Los carcinógenos son agentes con la capacidad mutagénica en los que la mutación producida no es, en general, letal para la célula. (Jason H. And Lawrence Loeb, 2005)

Se conoce que el desarrollo de diversos tipos de cáncer implica la adquisición progresiva de mutaciones en múltiples genes. La presencia de estas mutaciones conlleva a ciclos repetitivos de proliferación celular, selección y expansión clonal. Parece ser que el desarrollo de la inestabilidad genómica durante este proceso tiene mucha importancia, debido al incremento en la frecuencia de mutaciones que se observan.

Aparentemente, el desarrollo de un fenotipo completamente maligno implica la adquisición progresiva de mutaciones en múltiples genes, incluyendo aquellas que activan la acción de oncogenes dominantes y mutaciones que inactivan genes recesivos que son supresores de tumores. Esto indica que los genes implicados en la tumorogénesis, tienen diversas funciones, tanto bioquímicas como biológicas. Estos genes pueden ser divididos en categorías funcionales:

a) genes involucrados en el control intracelular
b) genes que tienen efecto sobre la superficie celular y extracelular.

La primera categoría incluye varios subgrupos:

- Genes que tienen funciones celulares en respuesta a factores externos: codifican diversos factores de crecimiento, receptores celulares, proteínas de acoplamiento y cinasas que realizan la señalización del citoplasma al núcleo, y factores de transcripción nuclear que incrementan o reprimen la expresión de otros genes.
- Genes relacionados en la replicación y reparación del ADN
- Genes implicados en el control del ciclo celular
- Genes que determinan la muerte celular; implicados en la diferenciación celular, senescencia o apoptosis. (Jason H. And Lawrence Loeb, 2005)

La segunda categoría incluye que genes tienen influencia sobre interacciones con la matriz celular y/o células vecinas. Esta categoría incluye varias proteínas celulares de superficie, moléculas de adhesión celular, proteasas extracelulares y factores de angiogénesis. Las alteraciones de estos genes son especialmente relevantes para la invasión del tumor y metástasis. (Jason H. And Lawrence Loeb, 2005)

Los múltiples e innumerables estudios acerca de la función de los genes que participan en el desarrollo de tumores han llevado a su clasificación en dos grandes grupos, los oncogenes, de naturaleza dominante, y los genes supresores de tumores, de naturaleza recesiva. En el caso de los oncogenes, las alteraciones que éstos sufren los activan, mientras que en el segundo caso, resultan en la perdida de su función. Aunque esta situación no siempre es tan tajante, que incluso resulta ambigua para algunos genes.

El cáncer también puede tener un agente etiológico viral, que puede ser un retrovirus ó un virus de DNA. En particular el descubrimiento del virus de sarcoma de Rous abrió el camino para que muchos investigadores buscaran la existencia de agentes similares, todos capaces de inducir la formación de tumores en animales (Peyton Rous, 1911). Los retrovirus portan genes cuyo estudio permitió que a la fecha se conozcan más de un centenar de genes involucrados en procesos fundamentales, como el control del crecimiento, la diferenciación, la muerte y ciclo celular. Los adenovirus y más recientemente los *papilomavirus*, han permitido identificar la naturaleza de proteínas clave en el control de la muerte programada y el ciclo celular, dado que al interaccionar con estos productos, alteran los mecanismos que controlan dichos procesos.

1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DEL CÁNCER CÉRVICOUTERINO

Dentro de los diversos factores etiológicos virales que inducen cáncer, uno de los más importantes son los *papilomavirus,* los cuales son el agente causal de cáncer cérvico uterino (CaCU).

El CaCU representa la segunda causa de morbilidad y mortalidad por cáncer en mujer mexicanas, y la quinta causa de muerte por cáncer en toda la población mexicana (BASE DE DATOS, SSA, 2006.) (Fig. 1 y 2).

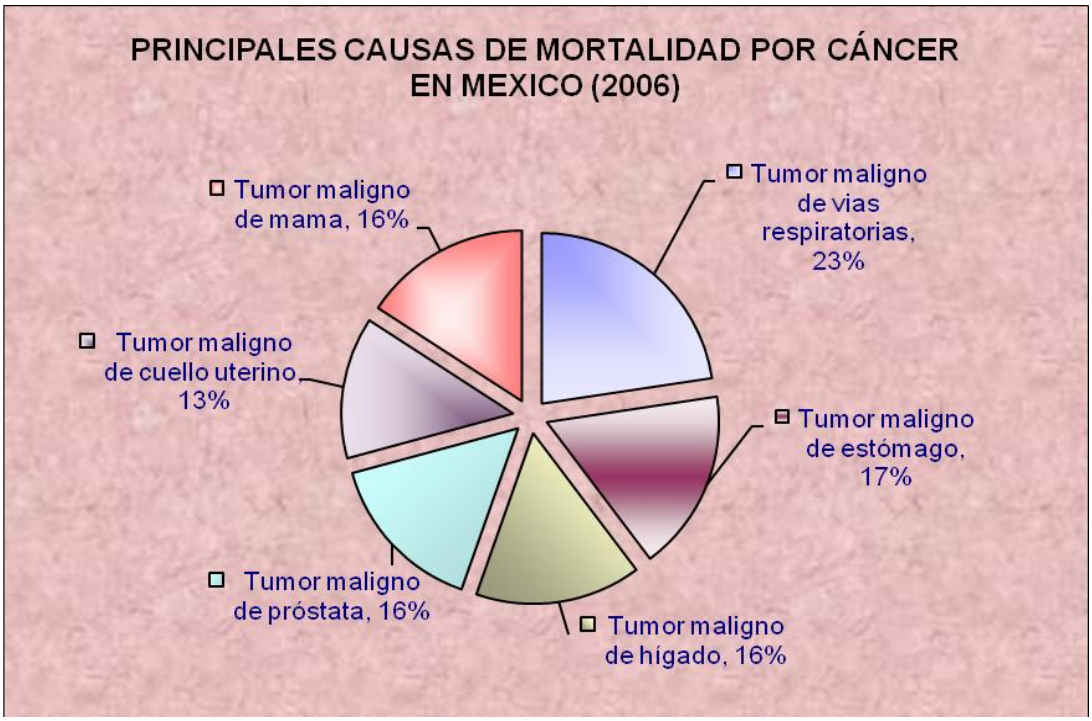


Fig. 1: Principales causas de muerte por cáncer en México del 2005. (BASE DE DATOS, SSA, 2006.)

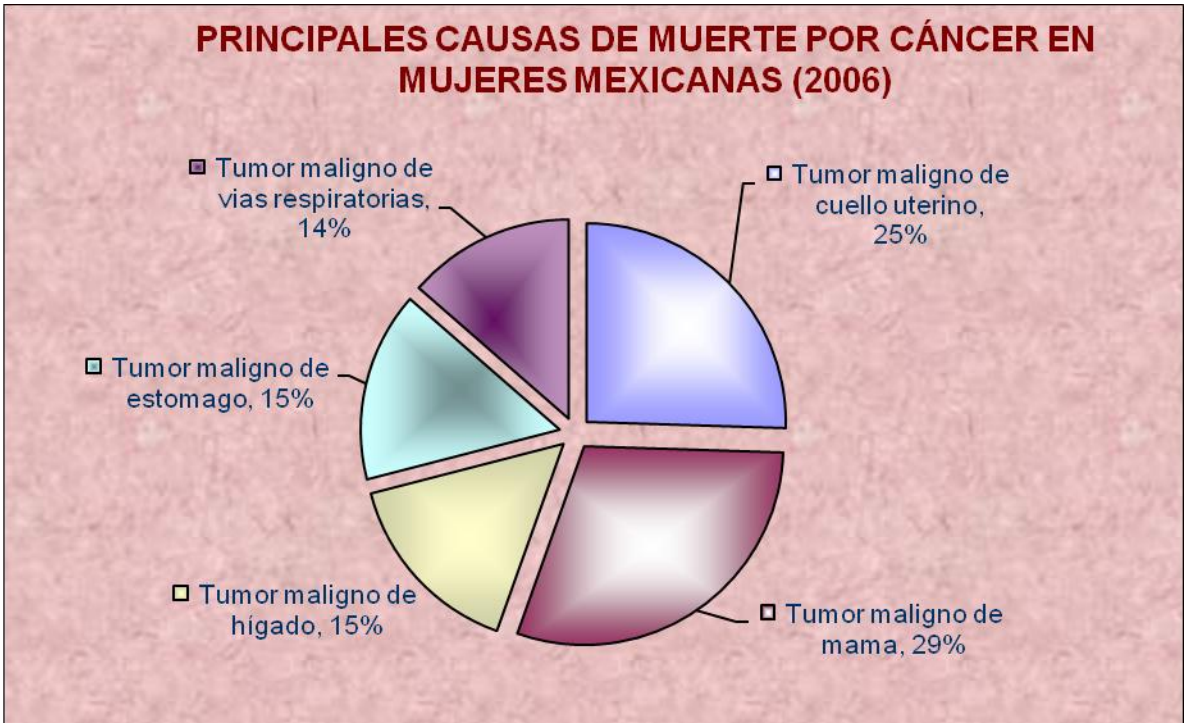


Fig. 2: Muertes por Cáncer en mujeres mexicanas, en 2005. (BASE DE DATOS, SSA, 2006.)

El cuello uterino o cérvix, es la parte inferior o abertura del útero. El cuello uterino esta compuesto por exocérvix y endocérvix. El exocervix es la porción vaginal del cérvix que se extiende hacia del orificio cervical. En el cuello uterino se encuentran dos tipos de epitelio: el epitelio escamoso no queratinizado que recubre la superficie vaginal del exocervix y el epitelio columnar mucosecretor, que constituye el recubrimiento epitelial del endocervix. Existe una zona en el cuello uterino, en donde los dos epitelios se unen en un punto llamado unión escamo-columnar en la cual se encuentra la zona de transformación (ZT); esto debido a que el epitelio columnar se encuentra en constante transformación hacia el epitelio escamoso.

La unión entre el epitelio columnar del endocervix y el epitelio escamoso del exocervix es un sitio de cambios continuos, por lo tanto es el sitio ideal para el desarrollo de lesiones malignas, tales como displasias y principalmente CaCU. (Atlas of Clinical Oncology, 2001)

El epitelio escamoso estratificado se compone de varias capas: capa de células basales, que corresponde a una hilera de células adheridas a la membrana o estrato basal y que constituye la fuente de regeneración epitelial; una capa de células intermedias que forma la mayor parte del epitelio, llamado estrato espinoso y una capa superficial de células escamosas (Fig. 3).

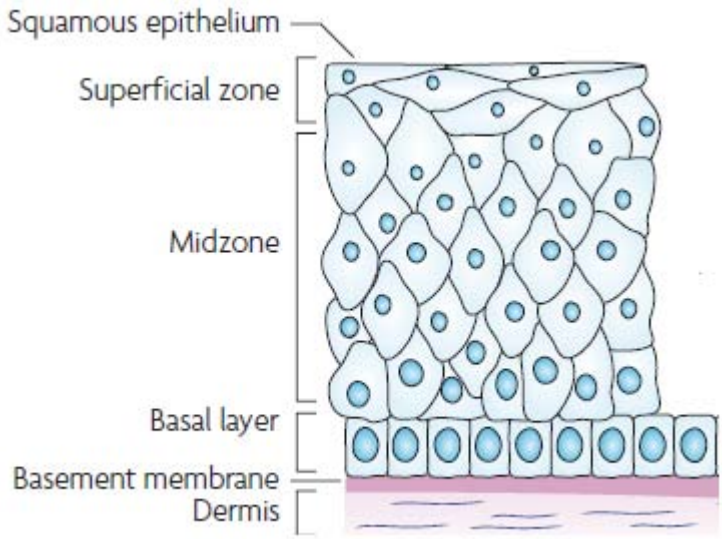


FIG. 3: Epitelio escamoso estratificado de Cervix (Ciaran, B.J. and Col, 2007)

El CaCu se origina en la zona de transformación del cérvix, y generalmente se produce como un cambio gradual que pasa por diferentes etapas.

Algunas mujeres que experimentan cambios precancerosos del cérvix desarrollan cáncer. Por lo general esto puede tardar hasta una década pero a veces puede suceder en menos de un año. Las lesiones precursoras del CaCU son conocidas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC). (Atlas of Clinical Oncology. 2001)

En la Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) hay una deficiencia del proceso organizado de crecimiento. En la NIC-1 hay alteraciones en el arreglo regular de la tercera parte inferior del epitelio, conservando las otras dos terceras partes de su arquitectura normal. La regularidad de las células basales dispuestas en empalizadas se pierde y se distribuye en forma desordenada; los cambios celulares más superficiales son muy escasos y están constituidos por células que presentan abundante citoplasma y ligero crecimiento del núcleo (Fig. 4).

En la NIC-2 solamente la tercera parte superior del epitelio tendrá caracteres morfológicos normales en su estratificación y maduración, y las dos terceras partes inferiores estarán sustituidas por numerosas células que se disponen en forma desordenada.

La celularidad en el frotis es mayor, correspondiendo a un mayor número de elementos con atípias de estratos intermedios y basales, de forma oval o alargada; el citoplasma es a menudo cianófilo. Los núcleos son grandes, con pérdida de la relación núcleo/citoplasma (Fig. 5.). (Atlas of Clinical Oncology; 2001)

En la NIC-3, Las células son de aspecto inmaduro, carecen de citoplasma y lo más notorio es la presencia de núcleos de forma regular, hipercrómicos y de cromatina granular e irregular. Hay numerosas mitosis anormales en todo el espesor de la lesión.

En la displasia grave, todas las células anormales se encuentran confinadas por medio de la membrana basal (Fig. 6.). (Atlas of Clinical Oncology; 2001)

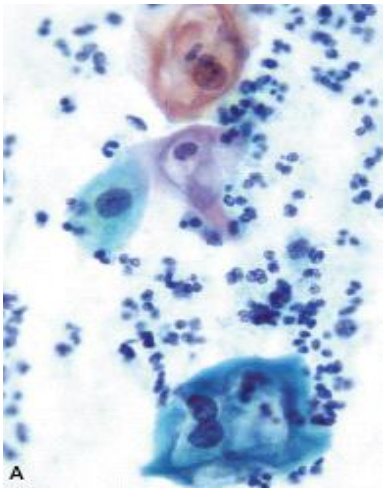


Fig. 4: Citología de NIC-1

Panel A: los cambios celulares más superficiales son muy escasos y están constituidos por células que presentan abundante citoplasma y ligero crecimiento del núcleo.

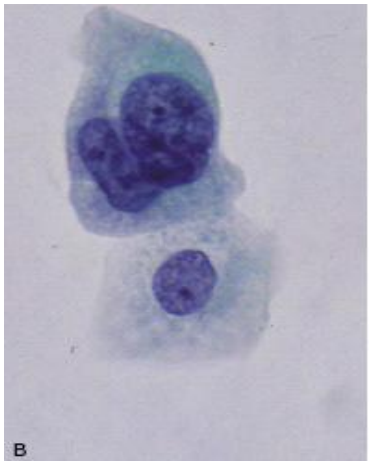


Fig. 5: Citología de NIC-2

Panel B: elementos con atípias de estratos intermedios y basales, de forma oval o alargada; el citoplasma es a menudo cianófilo. Los núcleos son grandes, con pérdida de la relación núcleo/citoplasma.

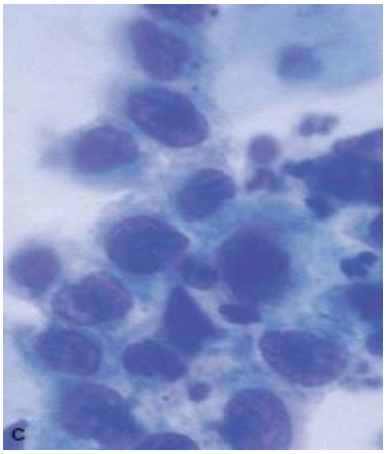


Fig. 6: Citología de NIC-3

Panel C: as células son de aspecto inmaduro, carecen de citoplasma y lo más notorio es la presencia de núcleos de forma regular, hipercrómicos y de cromatina granular e irregular.

(American Cancer Society; Atlas of Clinical Oncology; Hamilton London. 2001)

Al igual que en la NIC-3, en carcinoma *in situ* la alteración está presente en todo el espesor del epitelio y todas las células anormales se encuentran confinadas por medio de la membrana basal, la diferencia entre NIC-3 y el carcinoma *in situ* es presencia de una capa superficial de células diferenciadas en el primer caso, y ausentes en el carcinoma *in situ*.

En el cáncer invasor las células tienen la capacidad de migrar a otros tejidos a través de la microvasculatura que envuelve al tumor maligno. Esta vasculatura se forma por el proceso llamado angiogénesis, cuyo principal estimulo es la liberación por células tumorales de factores de crecimiento epitelial; de esta forma el cáncer puede invadir otros órganos.

De acuerdo con el tipo de células o estirpe celular que origina el cáncer de cérvix, este puede ser: de tipo epidermoide o escamoso, adenocarcinoma, mixto o adenoescamoso, así

como de otras variedades menos frecuentes, como el de células pequeñas. El comportamiento biológico de estos tipos histológicos varía, siendo en general el adenocarcinoma y los carcinomas adenoescamosos más agresivos que los epidermoides, por lo cual presentan un peor pronóstico. (Atlas of Clinical Oncology. 2001)

La etiología del CaCU lo ha catalogado como una enfermedad de transmisión sexual que implica a un organismo infeccioso como principal agente etiológico. Actualmente, se considera al virus del papiloma humano (VPH) como el agente más importante en la etiología del CaCU. (Zur Hausen H, 2002)

La relación entre el cáncer cérvicouterino y el *VPH*, fue demostrado a principios de la década de 1980 por el doctor Harald zur Hausen. El VPH está implicado en el 99.7 % de los casos de cáncer cervicouterino de células escamosas y la infección es un requisito necesario para el desarrollo de esta enfermedad. (Zur Hausen H, 2002.). La infección por VPH es causa de otros carcinomas ano-genitales incluyendo; pene, vagina, vulva y ano. El Dr. Harald zur Hausen fue el primero en demostrar, por medio de experimentos de hibridación, que las verrugas genitales y los tejidos de cáncer de cérvix, contienen genomas del virus del papiloma humano.

La detección temprana y el tratamiento oportuno del VPH en lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión del cáncer. Los métodos principales de diagnóstico han sido la citología y la histopatología**.** Recientemente se han introducido los métodos moleculares para detectar VPH en muestras clínicas. El método citológico de Papanicolaou busca cambios en las células de la zona de transformación.

Las pacientes con resultados de Papanicolaou anormales que no tienen una lesión cervical seria son evaluadas por colposcopía y por toma de biopsia o cono. (Burd E. 2003)

La escisión es el tratamiento preferido para las lesiones escamosas no invasivas. El cáncer de tipo invasor, puede tener diversos tratamientos, desde radioterapia, radioterapia dirigida, quimioterapia, inmunoterapia, entre otras.

Recientemente se han desarrollado vacunas a partir de la expresión de los genes L1 y L2 de VPH 16 en células eucariontes (virus - like particles, VLP) (Kawana K. and col. 2002). Posteriormente otros científicos detallaron la técnica y demostraron que solo L1 era suficiente para el ensamble de las VLP's (Ault KA, and col, 2004). Actualmente se tienen dos estrategias fundamentales en el desarrollo de vacunas contra VPH, una de ellas es el desarrollo de vacunas terapéuticas las cuales tienen como blanco, inducir la inmunidad

celular dirigida contra células epiteliales infectadas con VPH. La segunda estrategia es el desarrollo de vacunas profilácticas las cuales inducen una neutralización por anticuerpos dirigidas contra L1 del virus, esta es eficiente siempre y cuando sea administrada antes de la infección con VPH (Tjalma WAA and col. 2004,). En la actualidad se tienen dos vacunas muy exitosas, las dos de ellas se encuentran actualmente en el mercado farmacéutico, la primera de ellas es una vacuna bivalente la cual protege contra los tipos virales 16 y 18 y esta siendo fabricada por la empresa farmacéutica GSK (Glaxo Smith Kline), y la otra es la vacuna cuadrivalente, la cual protege contra los tipos virales, 6, 11, 16 y 18, la cual esta siendo fabricada por la empresa farmaceutica "MERCK" y actualmente se le encuentra en el mercado farmacéutico. (Inmunnisation Handbook 2006)

1.2. EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El VPH como todos los *papillomavirus* pertenece a la familia *Papillomaviridae*, una familia que fue recientemente reconocida como distinta de los *polyomavirus* por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los virus (Modis Y, and col. 2002). Son virus no envueltos de forma icosahédrica, contienen material genético de ADN de doble cadena circular, estos virus son de 55 nm de diámetro aproximadamente, el genoma es aproximadamente de 8kb, y están compuestos de 72 capsómeros aproximadamente, (Mugner K, et al. 2004).

El genoma de VPH está constituido por siete genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6, E7, E8), por dos genes tardíos (L1 Y L2) y por una región larga de control (LCR), la cual controla la expresión de los genes tempranos (Burd E. 2003). (Fig. 7).

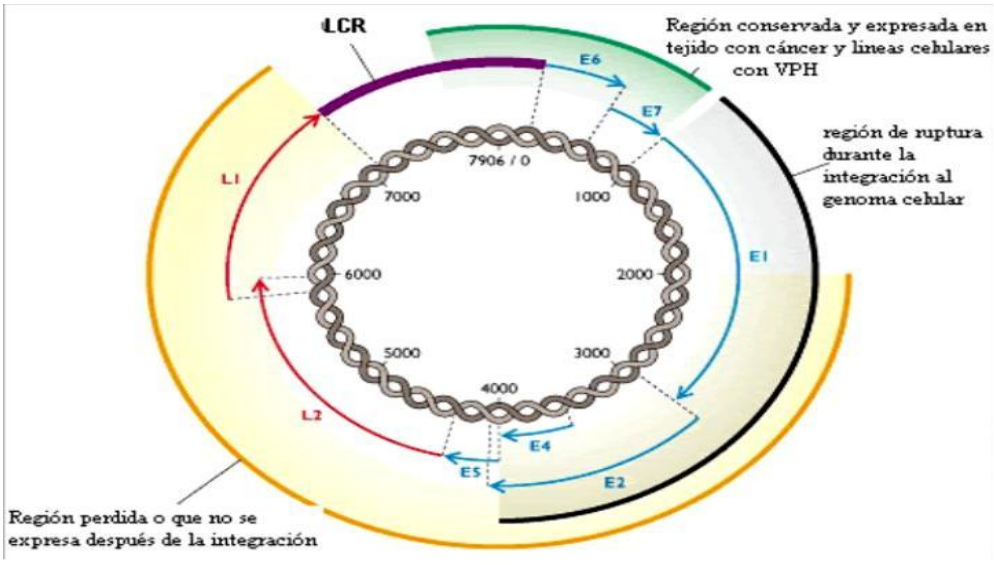


Fig. 7: Representación del genoma de VPH: La dirección de las flechas, indica la dirección en la que se trascribe cada uno de los genes, la cual es de 5´ a 3´. **(telemedicine.org/warts/cutmanhpv.htm)**

Los *VPH*, se han clasificado en virus de alto o bajo riesgo, de acuerdo a su potencial oncogénico que presentan para el desarrollo de lesiones cancerosas. Dentro de esta clasificación podemos encontrar ejemplos representativos de cada grupo en la siguiente tabla.

Tabla 1: rincipales VPH´s de alto y bajo riesgo oncogénico. (W. A. A. TJALMA, et al; 2004)

VIRUS DE ALTO RIESGO:
16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82.
VIRUS DE BAJO RIESGO:
6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81.
VPH PROBABLEMENTE CARCINOGENICOS:
26, 53, 66.

1.3. GENES VIRALES Y REGIONES NO CODIFICANTES.

Gen E1:

Es el más grande y de los más conservados entre los virus del papiloma, su secuencia es de aproximadamente 2 kb, la proteína codificada es de 67.5 a 76.2 kDa aproximadamente, (de 593 a 681 aminoácidos).

La proteína E1 es un factor necesario para la replicación del genoma viral, en su ausencia, el genoma viral solo se mantiene a través de su integración en el genoma celular. E1 forma hexámeros y dobles hexámeros en el origen de replicación. El hexámero rodea al ADN de modo que el sustrato pasa a través del centro del anillo hexámerico. La unión de E1 al sitio de origen causa una curvatura, crítica para el correcto ensamblaje del complejo de iniciación y para las primeras etapas de desenrrollamiento de la doble hélice. E1 interacciona directamente con la ADN polimerasa α y la replicación necesita las proteínas RPA (*replication protein auxiliary*), para estabilizar la cadena sencilla del duplex abierto, topoisomerasas I y II y los cofactores PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) y RFC (factor de replicación C).

E1 es una helicasa hexamérica 3' → 5' dependiente de ATP. Estas funciones de ATPasa y de helicasa hacen de esta proteína viral la única con actividad enzimática y se hallan codificadas en el domino carboxilo terminal. (Van. G. Wilson. 2002. Viruses Genes)

E1 se une al origen de replicación en la LCR, en una secuencia palindrómica de 18 pb rica en A y T, formando hexámeros y dobles hexámeros que rodean al ADN (Fouts ET, and col,1999. Liu JS, et al 1998,). La unión de E1 a su sitio depende de su acomplejamiento con la proteína viral E2, la cual aumenta la especificidad de E1 por su secuencia, así como su capacidad para desenrollar la doble hélice. Las interacciones E2-E1 hacen que E2 atraiga otras moléculas de E1 a un complejo inicial E2-E1-ADN. Conforme se ensamblan oligómeros más grandes de E1, E2 es finalmente desplazado por una reacción dependiente de ATP.

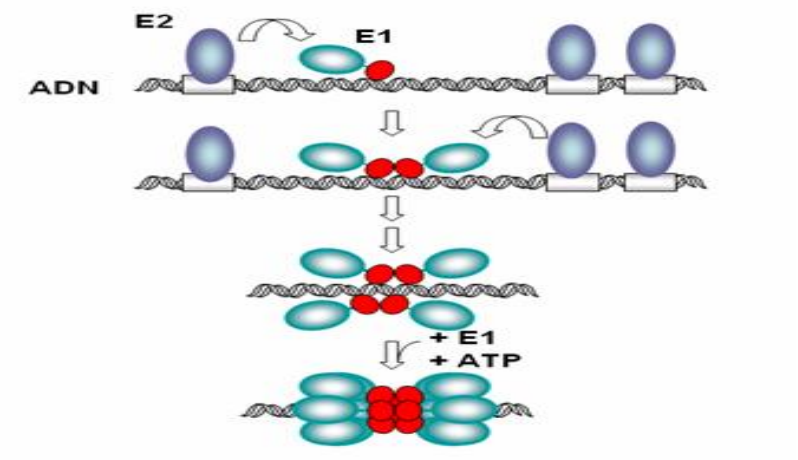
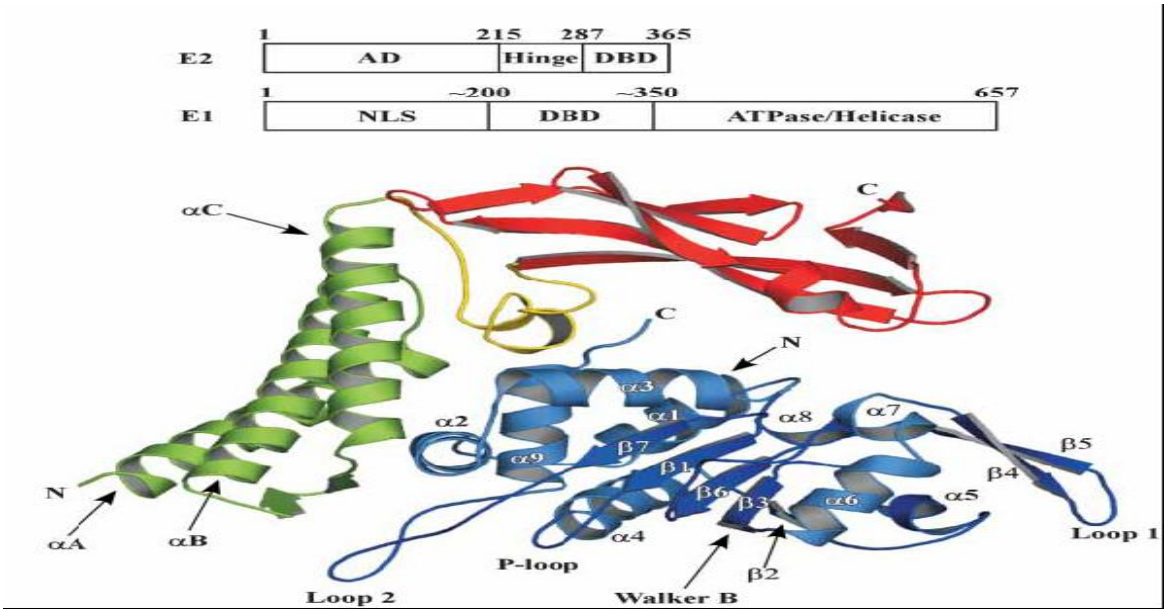


Fig. 8. Función de E1 dentro del origen de replicación
(Adapted from Titolo et al., 2003)

La proteína E1, puede dividirse en tres grandes regiones: Amino terminal, en donde residen sitios de localización nuclear, De unión a DNA, y Carboxilo terminal, en donde residen las funciones de helicasa y ATPasa, así como también es la parte de la proteína con la cual interacciona con la proteína viral E2. La proteína E2 a su vez, interacciona con la proteína viral E1 a través del amino terminal. (Kasukawa, et al.1998; Anitra S. et. al 2003)



(Abbate E, and col 2004.)

Fig. 9. Principales sitios de las proteínas E1 y E2

Gen E2:

Tiene una secuencia de aproximadamente 1100 pb. Codifica para una proteína de aproximadamente 45 kDa. Esta proteína es responsable de regular la activación de la transcripción y la replicación del ADN viral (Hegde, 2002).. Se divide en tres dominios funcionales. El primero, en el extremo amino terminal, es el dominio de activación (E2TAD), de casi 200 aminoácidos. Este se divide en dos sub-dominios. El primero (nt 1 a 92) es el dominio helicoidal formado por tres hélices antiparalelas, mientras que el segundo (nt 110 a 201) por una lámina beta plegada antiparalela. Este es responsable de regular la transcripción y la replicación del ADN viral. Promueve la oligomerización e interacción entre moléculas de E2 unidas al ADN en sitios distantes, provocando una curvatura en el ADN y otros cambios conformacionales. El segundo dominio es el de bisagra o dominio central, de longitud y secuencia variables entre los VPH´s. El tercer dominio, en el extremo carboxilo terminal, es de dimerización y de unión al ADN, de casi 100 aminoácidos. El dímero forma una estructura de barril-β. La hélice α1 contiene a los aminoácidos que directamente interactúan con el ADN. Durante la dimerización, las cadenas β2 y β4 de cada subunidad participan en una red de puentes de hidrógeno, lo que resulta en una estructura barril β de 8 láminas. (Hegde, 2002).

El sitio de unión a E2 (E2BS) consiste de un palíndromo de 12 pb, ACCgNNNNcGGT que sufre un cambio conformacional al unirse la proteína. Las letras en minúsculas son las

bases preferenciales pero no requeridas para la unión al ADN. La región espaciadora NNNN es de longitud conservada entre los VPs pero la secuencia varía con el tipo viral. Existen 4 sitios E2BS en la LCR de los VP-AR, ubicados hacia el 5' del promotor viral que regula la expresión de los genes tempranos. La unión de E2 al ADN provoca la represión o activación de dicho promotor, así como la replicación del ADN viral. (Hegde, 2002).

Fig. 10. Regiones amino terminal, carboxilo terminal y de bisagra de la proteína E2

Estructura de E2. Estructuras del dominio amino terminal (a) o dominio de activación, responsable de regular la transcripción y la replicación del ADN viral. Promueve la oligomerización e interacción entre moléculas de E2 unidas al ADN en sitios distantes. El dominio carboxilo terminal (b) es de dimerización y de unión al ADN. Ambos dominios están separados por una región de longitud y secuencia más variables entre los VPs, el dominio de visagra.

E2 también tiene una función anti-proliferativa, pues puede reprimir el crecimiento e inducir apoptosis, ya que la proteína E2 de los virus de alto riesgo se pueden unir a p53. (Parish, et al., 2006). En parte mediante la represión de la transcripción de E6 y E7, así como por el consecuente aumento de P53. E2 induce arresto en G1 por medio de la activación del complejo p21/WAF, inhibidor del complejo ciclina E/CDK2. Este arresto lleva a la célula transformada por VPH a senescencia.

E2 es capaz de interactuar con proteínas activadoras del complejo APC (Anaphase Promoting Complex) como lo son Cdc20 y Cdh y provocar el arresto del ciclo celular en la fase de mitosis. (Thierry, et al., 2005).

Gen E2^E8

Se ha descrito una nueva proteína E2, resultado de una fusión del producto del pequeño marco de lectura E8 con parte de la proteína E2. Esta proteína de 20 kDa reprime la replicación viral, así como la transcripción y por tanto se creé que es importante para el mantenimiento del estado latente observado en las células basales del epitelio infectado. (Stubenraunch F, et al. 2001)

Gen E5:

El gen E5, de aproximadamente 270 pb codifica para una proteína de 90 aminoácidos con un peso molecular de 14 kDa. Es una proteína de membrana e hidrofóbica. Se halla principalmente en el retículo endoplásmico y Golgi, pero también en la membrana citoplasmática. (Cartin and Alonso A. 2003)

La función principal de E5 es regular la actividad de los receptores de factores de crecimiento, como el del factor de crecimiento epidermal (EGFR) o el del crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR). (Cartin and Alonso A. 2003)

La proteína E5 de VPH – 16 y de VPB– 1 (Virus del Papiloma Bovino) se une a la subunidad de 16 KDa de la ATPasa vacuolar. La ATPasa es un complejo proteico, de unión a membrana, cuya subunidad de 16 KDa forma el poro por lo que pasan los iones H^+ que acidifican el contenido de los endosomas. Se demostró que E5 de VPH – 16 inhibe la acidificación de los endosomas, lo que resulta en la retención del receptor. (Cartin and Alonso A. 2003,)

Se ha documentado que E5 puede inhibir por acidificación de los endosomas, la interacción de los péptidos antigénicos con las moléculas del MHC-II (complejo mayor de histocompatibilidad tipo II). La molécula del MHC-II es una proteína heterodimérica compuesta de las subunidades α y β. Esta molécula entrega péptidos antigénicos desde los compartimentos endocíticos hasta la superficie celular para ser reconocidos por las células T $CD4^+$. Los antígenos del MHC-II son sintetizados en el RE donde las subunidades α y β se asocian a una chaperona llamada *cadena invariante* (Ii). Se ha documentado que los queratinocitos pueden expresar moléculas MHC-II, tales como HLA – DR, – DP y – DQ en muchos desórdenes de la piel, lo que les permite funcionar como células presentadoras de antígenos e inducir una respuesta inmune. Los queratinocitos de prepucio también muestran actividad inmune (expresando HLA – DR, - DM y Ii) cuando son estimulados por interferón *γ*. La degradación proteolítica secuencial de Ii es dependiente del pH, por tanto E5 afecta la maduración de la molécula αβ de MHC-II inhibiendo de la acidificación de los endosomas donde Ii es digerido por proteasas que funcionan solo a pH ácido. E5 entonces podría disminuir el reconocimiento inmune de los queratinocitos infectados interrumpiendo la función de las proteínas MHC clase II. (Zhang B, Ii P, Wang Z, Brahmi Z, et al. 2003.)

Gen E6:

De aproximadamente 450 pb, codifica para una proteína de 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa. La proteína tiene un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares y tiene plena capacidad transformante e inmortalizante. (Kessis T, Slebos R, Nelson W. 1993)

E6 es de las primeras proteínas en expresarse muy tempranamente durante una infección por VPH. Esto le confiere varias funciones que alteran el ambiente celular, como por ejemplo el bloqueo de la apoptosis mediante la degradación de p53, la alteración de la transcripción de genes celulares y el incremento de la vida celular por la sobreactivación de la telomerasa. La acción clave de E6 en los VPH de alto riesgo (E6 – AR) es inhibir la función de P53, una proteína supresora de tumores, mediante su degradación por la vía de la ubiquitina (Veldman T, Liu X, et al. 2003). Para ello E6 requiere a la proteína celular asociada a E6 (E6-AP). Esta proteína reemplaza a Mdm2 la cual es una oncoproteína celular que en células normales no infectadas cumple con el papel de degradar a p53. Este cambio reduce dramáticamente la vida media de p53, de 3 horas hasta 20 minutos, ocasionando una disminución en el nivel de esa proteína en las células de cáncer de cérvix a menos de la mitad del nivel presente en las células normales. (*Ver figura 1.1.8).* La mayoría de las proteínas E6 de los VPH de bajo riesgo (E6 – BR) no se unen a P53 o lo hacen débilmente y no lo degradan. (Mc MurrayH.R., Nguyen D, and Col. 2000)

E6 también puede retener a p53 en el citoplasma bloqueando su translocación al núcleo y así inhibiendo su función independientemente de su degradación. En consecuencia E6 inhibe la capacidad de p53 para activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco. E6 puede superar la apoptosis dependiente e independiente de p53. Ya que se ha visto que E6 interactúa con Bak la cual es una proteína proapoptótica que se expresa en altos niveles en las capas superiores del epitelio en diferenciación. En consecuencia, el incremento de p53, debido a la proliferación inducida por el VPH, así como la inducción de apoptosis, probablemente mataría a una célula infectada por VPH antes de que este virus se replicara. Por tanto la modulación de los niveles de p53 por parte de E6 es importante para una infección productiva. (Rapp L, Chen J.J. 1998,)

Actualmente se han documentado cerca de 20 proteínas celulares con las que E6 puede interactuar, afectando principalmente el ciclo celular, apoptosis, proliferación celular, diferenciación celular, reparación de ADN, etc.

Gen E7:

De 300 a 320 pb, codifica para una proteína de aproximadamente 100 aminoácidos con un peso molecular de 10 kDa. E7 tiene la mayor capacidad transformante y actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia RB, que a su vez interactúan con factores de transcripción (Mc MurrayH.R., Nguyen D, and Col. 2000). La familia pRB controla la replicación celular. La unión de E7 a la forma activa de pRB conduce a la liberación de los factores de transcripción E2F independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos, lo que promueve el progreso de la fase S del ciclo celular y por tanto la replicación celular (Angeline M, Eric Merle and Junona Moroianu. 2003). E7 también se asocia con otras proteínas tales como desacetilasas de histonas, AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como p21 y p27. Como resultado de la liberación del factor de transcripción E2F se expresa ciclina E, importante para el progreso de la fase S. Estas interacciones inducen múltiples respuestas celulares, incluyendo la estabilización de P53 que normalmente contrarrestaría esta replicación celular, anormalmente estimulada, mediante el incremento de la apoptosis. Sin embargo la proteína E6 – AR degrada a P53 y por tanto bloquea esta respuesta celular. El gen E7 también interactúa con muchos blancos celulares, tales como Rb, p107, p130, ciclina A, cíclina E, desacetilasa de histonas y Ap-1. (Reinstein E, Scheffner M, et al. 2000) *(Fig. 11 y 12).*

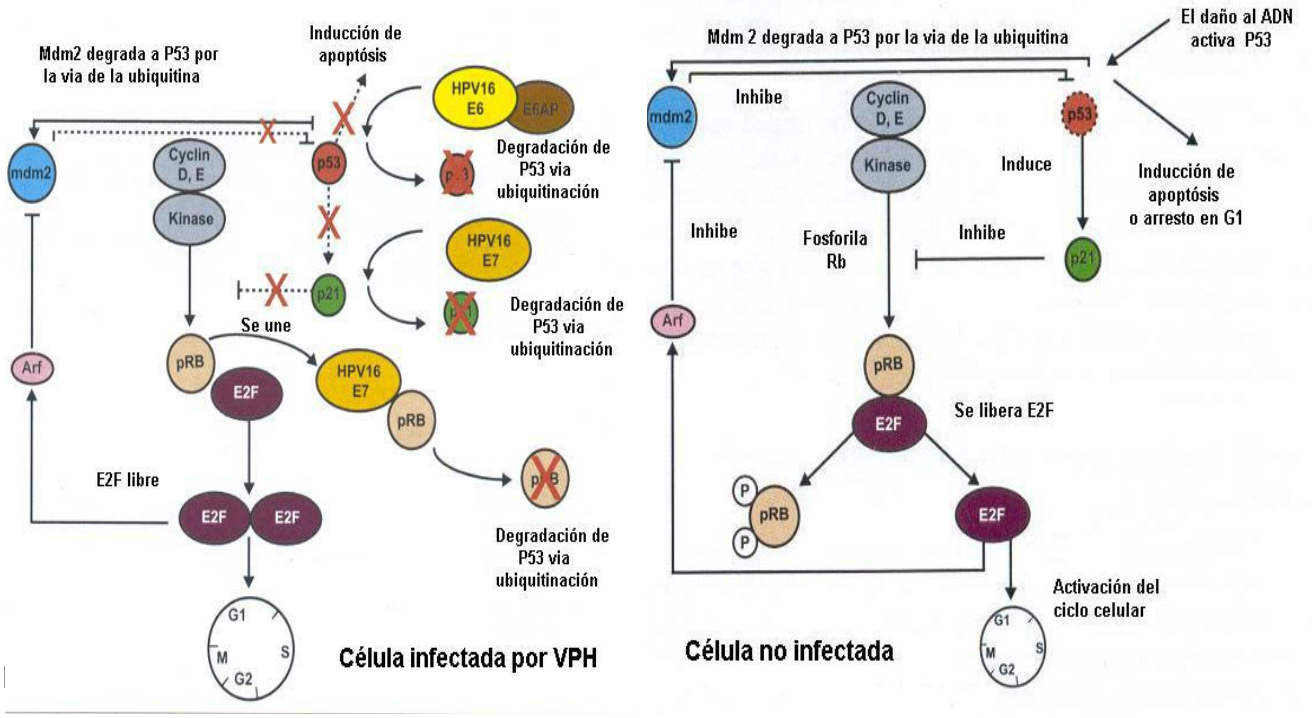


Fig. 11: Efecto de E6 y E7 en el ciclo celular.

En el panel A, podemos observar el efecto normal de p53, E2F y Rb en una célula no infectada y cómo influyen en ciclo celular; y en el panel B, podemos observar el efecto de las oncoproteínas de VPH que tienen con las proteínas apoptóticas p53 y pRb, y con la proteína de transcripción E2F. (Mc Murray H. R, 2000.)

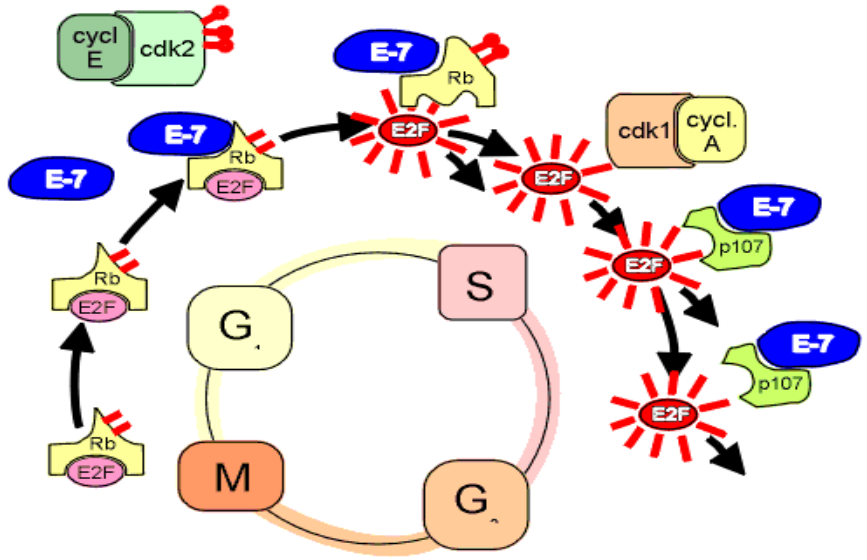


Fig. 12: Efecto de E7 en ciclo Celular

En esta figura podemos observar el efecto que tiene la oncoproteína E7 en la interacción con pRb y la promoción del progreso de la fase S del ciclo celular. (Mügner K, and Col. 2009)

Paradójicamente, la activación inapropiada del ciclo celular y de la proliferación activa la muerte celular programada (apoptosis), lo que conlleva a la reducción del tiempo de vida de la célula infectada. Este efecto es contrarrestado por la maquinaria viral a través del E6, que previene la apoptosis dentro de las células infectadas. De esta forma ambos genes poseen funciones complementarias para la replicación del virus, el E7 promueve la replicación del ADN y el crecimiento celular, mientras que el E6 inhibe la apoptosis, prolongando la supervivencia de las células.

Gen E4:

La secuencia codificante de E4, de casi 260 pb y se expresa a partir de un ARNm procesado (E1^E4) de manera abundante durante las etapas tardías del ciclo viral. La expresión precede la síntesis de las proteínas estructurales del virus y al ensamblaje de las partículas virales. La proteína E4 se localiza en parte en los filamentos intermedios de queratina del citoplasma, pero también se halla de manera difusa en regiones perinuclares y citoplasmáticas. E4 causa el colapso de dichas queratinas en la membrana celular y esto se ha relacionado con la liberación de los viriones.

E1^E4 de VPH 16 causa que el ciclo celular se detenga en la fase G2 cuando se expresa en células HeLa y SiHa. Esto sugiere un papel antagónico con la proliferación celular inducida por E7 durante la etapa productiva de la infección, así como el requerimiento de E1^E4 y E2 para inhibir la división celular durante el ciclo viral. (Nakahara T, Nishimura A, Tanaka M. 2002,)

El marco de lectura de E4 está contenido dentro del marco de E2 y las dos proteínas se expresan de ARNm en diferente marco de lectura. E4 puede expresarse junto con E1 y E2 durante la infección. El hecho de que ambos marcos de lectura estén uno sobre el otro y el hecho de que ambas proteínas, E2 y E4, pueden inhibir el ciclo celular, sugiere que cooperan durante el ciclo viral. La expresión elevada de E2 y E4 en células epiteliales en cultivo provoca la acumulación de E2 en el citoplasma. Esto sugiere que la unión de E4 a E2 altera su localización y por tanto su función. (Davy C, Jackson D, Wang Q, Raj K. 2002,)

Genes L1 y L2:

Las proteínas L1 y L2 son los componentes principales de la capside viral de VPH, L2 de 43 a 53 kDa, es la minoritaria de la cápside viral, que como L1, se produce en células que expresan E4. La proteína mayoritaria L1, de 57 kDa y que conforma cerca del 80 % de la cápside, se expresa después de L2. La cápside contiene 360 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros de una partícula icosaédrica. La proteína L2 se acumula en estructuras nucleares conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia pro-monocítica (PML) durante el ensamble del virus y atrae a L1 hacia estos dominios. Se ha sugerido que estos cuerpos PML son el sitio de la replicación del ADN viral y que las proteínas de la cápside se acumulan en este sitio para facilitar el empaquetamiento. (Burd E. 2003; Becker K, Florin L, Sapp C and Sapp M. 2003)

Región Larga de Control:

En el genoma de los VPH se ha identificado una región larga de control (LCR) que es un segmento genómico, que no contiene marco de lectura alguno y que sí tiene numerosos elementos de respuesta que gobiernan la expresión génica y la replicación viral. El tamaño varía según el tipo viral, extendiéndose de un 7 a 11 % del genoma y de casi 850 pb en el caso de los VPH genitales. (Zur Hausen H, 2002; Stubenrauch F and Laimins LA. 1999)

La Región Larga de Control o “LCR" puede dividirse en 3 partes: La región 3´ en donde reside el promotor de genes tempranos así como el origen de replicación viral, una región

enhancer tejido especifico, de alrededor de 230 pb y la región más alejada del 5'. Numerosos factores interaccionan con esta región: por citar algunos, las proteínas virales E1 y E2; proteinas celulares como SP1, AP1 y otros factores que parecen intervenir en la especificidad por el tejido. (Hegde, 2002; Abbate E and col, 2004).

En el origen de replicación existen tres zonas de unión a E2 y solo una para E1. La unión de estas proteínas con sus sitios de unión son vitales para que se lleve a cabo la replicación, sin embargo de los tres sitios para E2, solo dos de ellos son necesarios y fundamentales (sitio 3 y 2) para que ocurra la replicación en HPV18. (Demeret. 1995)

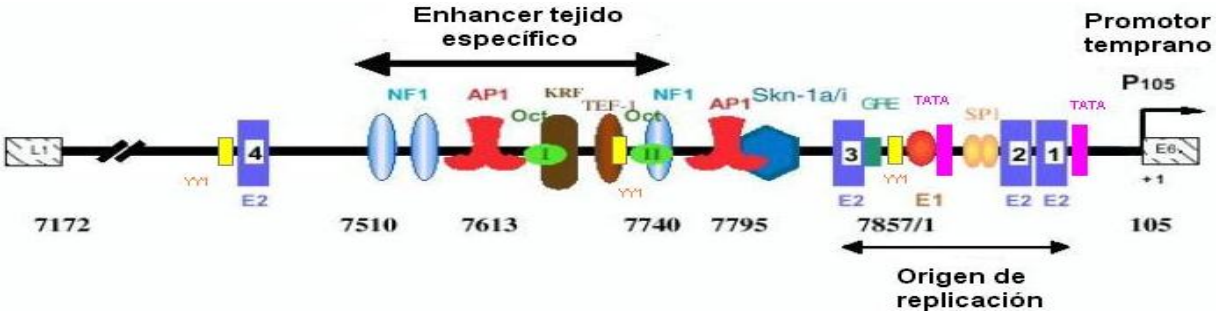


Fig. 13: Región Larga de Control de VPH-18; Se puede observar que contiene una región 5´, una región "enhancer" con múltiples sitios de unión a factores de crecimiento y a la especificidad en el tejido, una región en donde se encuentra el origen de replicación la cual contiene algunos sitios de unión a la proteína E2, los cuales están marcados en la numeración del 1 al 4. También una región 3´ en la cual se encuentra el promotor de los genes tempranos, que para VPH-18 se le denomina p105.

http://www.123bio.net/revues/ibouallaga/index.html

1.4. REPLICACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO

El DNA circular de doble cadena del VPH se mantiene activo como un episoma multicopia en el núcleo de las células epiteliales infectadas. Este proceso es dependiente de la replicación del genoma viral, el cual es dirigido por las proteínas virales E1 y E2 junto con la maquinaria de replicación del DNA de la célula hospedera.

La replicación de HPV, consiste en dos etapas: una etapa persistente también conocida como etapa vegetativa y otra conocida como etapa productiva, también llamada como "long term". En la etapa persistente el genoma viral permanece como un elemento extracromosomal en forma de episoma en las células basales del epitelio estratificado. Al dividirse la célula infectada, una de las células hijas permanece en la parte basal del epitelio, mientras que la otra inicia un proceso de diferenciación en la parte superior del epitelio. El mantenimiento del genoma viral en las células infectadas del epitelio basal es

esencial para el ciclo de vida del virus. Esta etapa persistente se caracteriza por un escaso número de copias genómicas, escasa progenie, la expresión de genes tempranos es escasa, los genes tardíos en esta etapa aun no se transcriben.

En la etapa productiva: El genoma viral 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. Se sintetizan proteínas de la cápside y el ensamblaje de los viriones ocurre exclusivamente en las células diferenciadas. VPH migra a otras capas del epitelio, así como la expresión de los genes tempranos se incrementa, a esta etapa también se le conoce como etapa "long-term" (Hubert. 2005).

Estas dos etapas dentro del ciclo de vida del virus, son de suma importancia para la historia natural de infección, la cual ocurre en epitelios en diferenciación. Es necesario que las partículas virales puedan infectar las células basales (menos diferenciadas) de la membrana del epitelio cervical, y esto lo hace en gran parte y facilitándose mediante micro-abrasiones del tejido cervical. Como ya se había mencionado, cuando el VPH recién ha infectado a una o más células, se establece una etapa vegetativa, que puede durar años y la mayoría de las veces esto ocurre dentro de las neoplasias intraepiteliales tipo 1 (NIC1) y posteriormente, el número de episomas virales se ve incrementado para establecer una etapa productiva, donde se presenta el ensamblaje de nueva partículas virales. Cuando la etapa productiva se ha establecido, el número de copias del virus empiezan a incrementar, y la mayoría de las veces puede apreciarse como lesiones intraepiteliales tipo 2 (NIC2) (Ciaran B. J. et al. 2007) Véase la fig. 14.

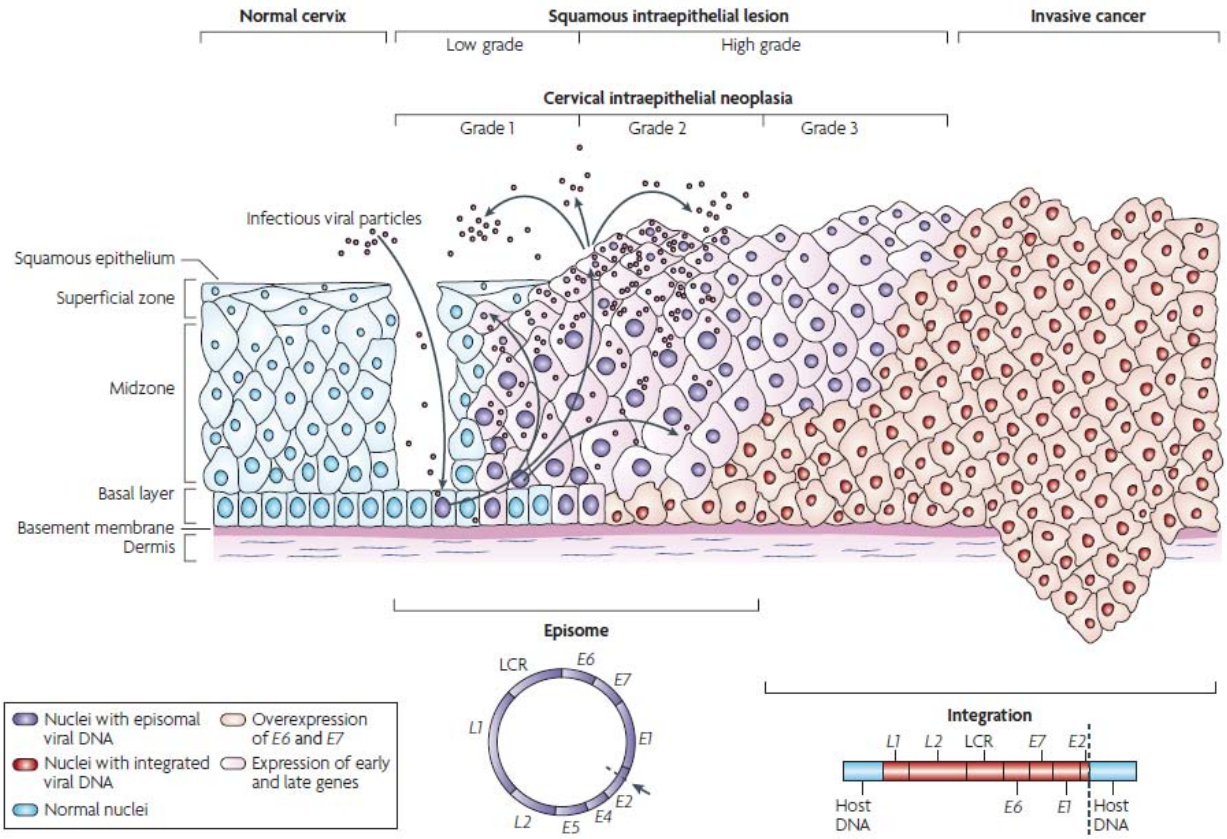


Fig. 1.4.1. Historia Natural de infección de Virus de Papiloma Humano
(Ciaran B. J, and Col. 2007)

Durante el ciclo de vida de los virus de papiloma de alto riesgo, se ha estudiado su manera de replicación durante el ciclo celular en el tejido hospedero. De manera muy frecuente se ha encontrado que la manera de replicarse el episoma viral dentro de la célula infectada es una vez por cada fase de síntesis que ocurre en la célula, a pesar de esto existen algunas discrepancias, puesto que la proteína E1 juega un papel importante aunque aún no del todo esclarecido en este tipo de replicación que tiene la célula. Los altos niveles en expresión de la proteína E1 provoca que el episoma viral no se replique una vez por fase de síntesis, si no que lo haga al azar, es decir que el episoma se replica en cualquier fase del ciclo celular y que inclusive puede ser mas de una vez por fase. Este tipo de replicación dependiente de los niveles de proteína de E1 se ha observado como diferentes modos en que puede replicarse el episoma viral dentro de la fase de mantenimiento del ciclo de vida de los virus de alto riesgo. (Hoffman and col 2006)

Como ya se ha mencionado es de vital importancia para la replicación viral que se forme el complejo proteico de E1-E2, ya que en ausencia de E2, solo altos niveles de E1 puede

multimerizar de manera inespecífica al ADN e iniciar la replicación. (Krista L. Conger, Jen-Sing Liu, and col. 1999) Por lo tanto, es de vital importancia que se expresen de manera eficiente las proteínas E1 y E2.

Por tal motivo es de suma importancia que E2 se una a su sitio de unión al DNA para que pueda unirse con E1. Su unión a DNA lo hace mediante secuencias consenso palindrómicas ($ACCN_6GGT$) llamados sitios de unión a E2 (E2 binding sites: E2BSs) (Hegde. 2002). Los sitios E2BSs son localizados se localizan junto a la secuencia de reconocimiento a E1, en el origen de replicación. E2 promueve la formación del complejo inicial de replicación de DNA de VPH mediante el reclutamiento de la proteína E1 en el origen.

La región larga de control juega un papel muy importante en la regulación de la replicación viral, ya que en ella se encuentra el origen de replicación de VPH. En este origen de replicación, se encuentran 3 sitios de unión a la proteína viral E2 y un sitio de unión a la proteína viral E1, como se había mencionado con anterioridad, sin embargo también juega un papel importante porque se encuentran zonas llamadas KE (keratinocyte enhancer) y AE (auxiliary enhancer), que son necesarias para la correcta expresión de E1 y E2. La zona KE sirve para modular la replicación, ya que este efecto se ha observado en modelos de replicación con VPH-31, en donde mutaciones dirigidas en esta zona afectan los niveles de replicación. (Hubert and col 1999).

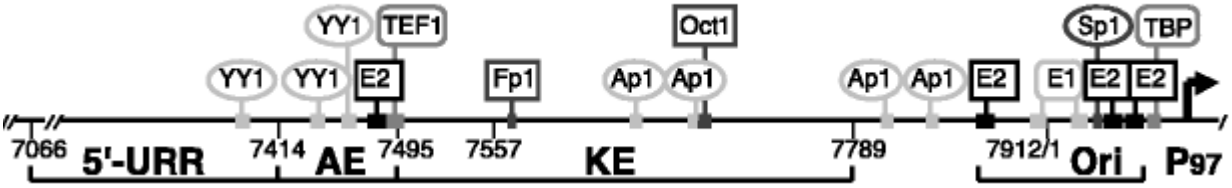


Fig. 15. Regiones “AE” y “KE” dentro de la Región Larga de Control (“LCR”)
En esta imagen se ejemplifica la “LCR” de VPH-31, en donde se muestran las regiones KE y AE.

1.5. TIPIFICACIÓN DE LOS VIRUS DE PAPILOMA HUMANO Y SU IMPORTANCIA BIOLOGICA.

Los Virus de Papiloma se clasifican en 3 niveles taxonómicos: Género, Especie y Tipo (Ulrich Bernard. 2005). Los géneros comparten menos del 60 % de identidad en la secuencia de L1. El gen L1 es el más conservado del genoma viral y se ha usado para identificar nuevos tipos

virales, que son reconocidos solo si la secuencia nucleotídica del gen difiere por poco más del 10 % de aquella del tipo viral conocido más cercano. Diferencias de 2 a 10 % definen a un subtipo viral, mientras que la diferencia entre el 2 y 5% define a una variante intratipo viral. Hasta la fecha se han descrito y secuenciado completamente 118 tipos virales y se ha identificado un número mayor mediante la amplificación de regiones subgenómicas. Las especies de un género comparten una identidad de 60 a 70 % y los tipos virales dentro de una especie comparten de 71 a 89 % de identidad.

Las variantes virales intratipo podrían ser un factor de riesgo que determine la progresión de una neoplasia. Diferentes estudios sugieren que las variantes virales difieren biológicamente en su potencial oncogénico.

Todos los tipos virales tienen variantes genómicas y estas difieren entre sí por 1 – 5 % de su secuencia nucleotídica. Los tipos virales difieren en al menos 10 % de la secuencia genómica. (Rose B, Thompson C, and col. 1997)

Se ha propuesto que variaciones intra-tipo en el genoma de VPH´s de alto riesgo repercuten en diferencias en el comportamiento biológico de las infecciones. En México se han identificado variantes de VPH 18 las cuales pertenecen filogenéticamente a las ramas africanas, europeas y asiático-americana o referencia, respectivamente. Estos aislados presentan ciertas asociaciones con diferentes estirpes histológicas de CaCu, que sugieren diferencias en patogenicidad. (De la Cruz-Hernández, et al., 2005)

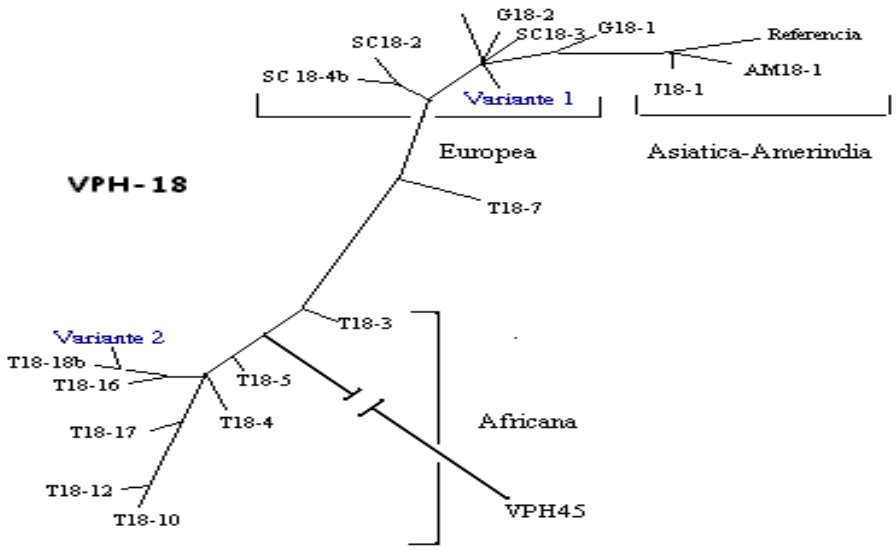


Fig. 16. Árbol filogenético de VPH-18

HPV18 Phylogenetic classification, Ong, 1993

Se ha observado que los cambios en nucleótidos en “LCR” de variantes de VPH-18 (referencia, africana, europea), trae consigo un comportamiento diferencial de acuerdo con su actividad transcripcional entre cada una de las variantes, ya que la variante africana presenta una menor actividad transcripcional con respecto a las variantes Europea y Referencia. (López Saavedra, en prensa).

Recientemente también se han observado diferencias entre el comportamientos biológico diferencial de variantes de VPH-18 en el procesamiento alternativo de la proteína E6, en donde las variantes referencia y europea muestran menos cantidad del transcrito E6*I, el cual es un producto del procesamiento alternativo de la oncoproteína E6, lo que sugiere diferencia en patogenicidad entre variantes de VPH-18. (De la Cruz-Hernández E, 2005,)

3. – HIPÓTESIS:

Dado que E2, E1 y LCR son cruciales para que se lleve a cabo la replicación viral, entonces la variación en secuencia de nucleótidos de VPH-18 puede traer consigo efectos importantes y diferenciales sobre la replicación viral y tener un significado biológico.

4. - OBJETIVO GENERAL:

- Determinar el efecto de las variaciones en la región larga de control (LCR) y de los genes E1 y E2 de las variantes VPH18 (Af, AsAi y E) sobre la replicación viral.

4.1. – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Clonación y secuenciación del gen E1 de variantes de VPH-18, en el vector de expresión pXJ40FT.
- Determinación de la eficiencia de expresión de los genes E2 y E1.
- Mediante co-transfecciones transitorias, analizar el efecto en la replicación de las variaciones en las “LCRs” y los genes E1 y E2 de VPH18.

2. - JUSTIFICACIÓN:

El virus del papiloma humano (VPH) tiene un papel muy importante como agente etiológico del CaCU, principalmente los tipos 16 y 18 considerados de alto riesgo por las lesiones que estos pueden ocasionar y los más frecuentes a nivel mundial. Sin embargo, solo una pequeña porción (aproximadamente un 10%) de las lesiones cervicales infectadas con virus de alto riesgo avanzan a cáncer, lo cual indica la participación de factores adicionales de riesgo como ha sido propuesto para las mutaciones intratipo de VPH. (Knebel Doeberitz, 2002). Reforzando esta propuesta, diversos trabajos han mostrado diferencias funcionales de diversos genes de variantes de VPH (REFs). La replicación viral puede ser un elemento determinante en la carga viral, la cual ha sido asociada con el pronóstico de lesiones de cérvix asociadas a VPH. De esta manera, resulta muy importante determinar si las variaciones intratipo de VPH18 en genes implicados en la replicación viral influyen en este mecanismo viral.

Conocer la tasa replicativa de las variantes de VPH18 nos dará información valiosa para entender su papel dentro de la historia natural de infección.

3.- HIPÓTESIS:

Dado que E2, E1 y LCR son cruciales para que se lleve a cabo la aplicación viral, entonces la variación en secuencia de nucleótidos de VPH-18 puede traer consigo efectos importantes y diferenciales sobre la replicación viral y tener un significado biológico.

4. - OBJETIVO GENERAL:

- Determinar el efecto de las variaciones en la región larga de control (LCR) y de los genes E1 y E2 de las variantes VPH18 (Af, AsAi y E) sobre la replicación viral.

4.1. – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Clonación y secuenciación del gen E1 de variantes de VPH-18, en el vector de expresión pXJ40FT.
- Determinación de la eficiencia de expresión de los genes E2 y E1.
- Mediante co-transfecciones transitorias, analizar el efecto en la replicación de las variaciones en las "LCRs" y los genes E1 y E2 de VPH18.

5. - MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmidos (Vector Recombinante)

- Las LCRs de VPH 18 están clonadas en el vector reportero pGL2 – Basic (López-Saavedra, en prensa) (Promega Corp., Madison, WI), que contiene al gen de la luciferasa de la luciérnaga americana *Photinus pyralis* (Figura 17.). Los oligonucleótidos usados se diseñaron con sitios de restricción adjuntos hacia el 5' correspondientes a las enzimas de restricción *Sma I* y *Hind III*.

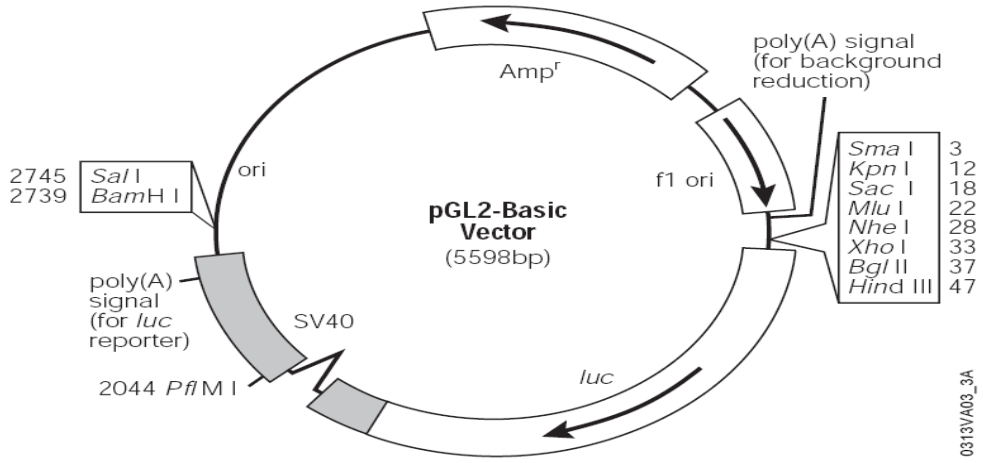


Fig. 17: vector pGL2; En este vector se ligó la "LCR" de cada variante viral hacia el 5' del gen reportero. Las flechas indican la dirección en las que se transcribe cada marco de lectura y el recuadro indican las enzimas de digestión con las cuales se puede abrir el vector y clonar el promotor que se quiera evaluar.

- El vector pXJ40FT (Xiao, J.H., and col 1991) se usó para clonar el gen E1 referencia. Este vector está bajo la acción del promotor de citomegalovirus. Los oligonucleótidos

usados para clonar el gen E1 en este plásmido, fueron diseñados con la enzima de restricción *Bam HI* hacia el 5´ y con al enzima *Hind III* hacia el 3´. (figura 18.).

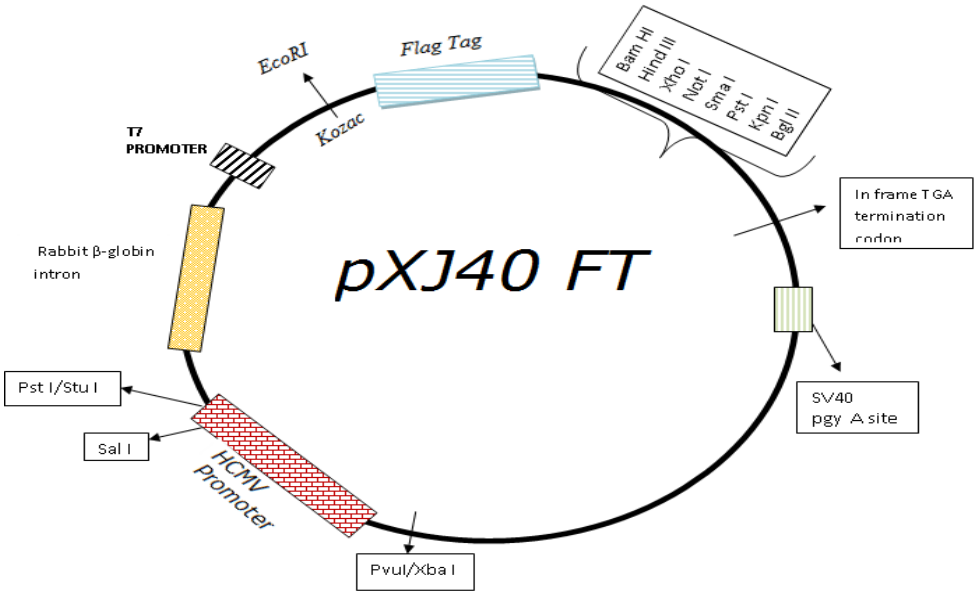
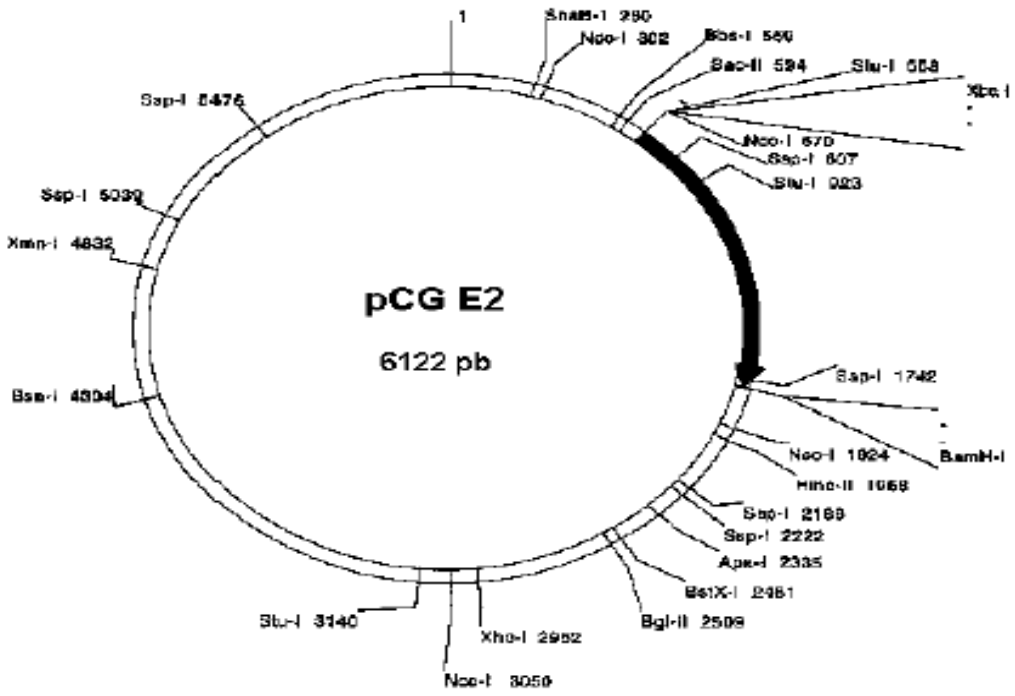


Fig.18. Vector de expresión pXJ40FT

- La construcción de estos vectores de expresión ha sido ya previamente descrita (Lee D, et al, 2000.). Un fragmento de ADN viral que contenía todo el gen de E2 de VPH 18, nucleótidos 2817 a 3971, fue clonado en el vector pCG hacia el 3' del promotor de citomegalovirus, CMV (Figura 19.). Posteriormente este inserto fue reemplazado por aquel de las variantes virales de VPH 18, europea y africana. Estos vectores fueron donados por el Dr. García Carrancá.



- Fig. 19. Vector de expresión pCG"E2"

Líneas celulares

La actividad replicativa de las variantes de VPH 18, se realizó en células epiteliales de riñón humano, que no contienen secuencias integradas de VPH. Esta línea celular, llamada HEK-293 fue transfectada con los vectores recombinantes por medio de lipofección.

CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN E1 DE VPH-18.

Secuenciación de las tres variantes del gen E1 de VPH-18

Con la finalidad de secuenciar el gen E1 de las tres variantes de VPH-18, se precedió a diseñar oligonucleótidos internos para amplificar el gen E1 en varias partes, puesto que E1 es muy grande (aproximadamente 2 Kb) y el secuenciador automático con el que se cuenta no secuencia fragmentos más allá de las 900 pb. Por tal motivo se diseñaron 6 juegos de oligonucleótidos que a continuación se presentan, donde se señala su posición en la secuencia de E1:

5´ "914": AAAAAGCTTATGGCTGATCCAGAAGG

5´ "1446": GCAGTGTAGACGGTACAAGTG

5´ "2081": GCAGACAGCAACAGCAATGC

3´ "2795": AAAGGATCCCTAATCTGGACCATGTCC

3´ "2180": GGGCTCGCCTATAATGTTTGCAC

3´ “1650”: GCTGTAACCCAATCTGTACAC

Una vez teniendo estos oligonucleótidos, se procedió a amplificar el gen E1 por fragmentos de biopsias de cérvix positivas a VPH-18. Se eligieron 4 muestras positivas a VPH-18 variante Europea, 3 muestras positivas a VPH-18 variante Africana y 2 muestras positivas a VPH-18 variante Asiático-Americana ó referencia.

Los productos de PCR obtenidos fueron los siguientes:

Un producto con un tamaño de 736 pb; amplificado por 5´ “914”-3´ “1650”

Un producto con un tamaño de 734 pb; amplificado por 5´ “1446”-3´ “2180”

Un producto con un tamaño de 894 pb; amplificado por 5´ “2081”-3´ “2795”

Un producto con un tamaño de 204 pb; amplificado por 5´ “1446”-3´ “1650”

Un producto con un tamaño de 99 pb; amplificado por 5´ “2081”-3´ “2180”

Estos producto de PCR para los tres aislados virales fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Posteriormente se purificaron estos productos mediante el kit de Roche “high pure PCR product”.

Para conocer la identidad de dichos productos, los fragmentos de cada gen E1 fueron secuenciados mediante el secuenciador automático ABI PRISM 3100 (PE Biosystem). Se usó el kit para secuenciar “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

Clonación del gen E1.

Para la clonación del gen E1 se amplificó el gen referencia ó variante Asiático-Americana a partir de un plásmido que contiene todo el genoma del VPH-18 referencia, el cual esta clonado en el vector pBR322. Esta amplificación se llevó a cabo mediante los oligonucleótidos diseñados que a continuación se presentan:

Hacia el 5´: GGGGGATCCATGGCTGATCCAG

Hacia el 3´: GGGAAGCTTCTAATCTGGACCA

Estos oligonucleótidos tienen hacia el 5´ una secuencia reconocida por la enzima *BamHI* y hacia el 3´ una secuencia reconocida por la enzima *HindIII.*

Una vez amplificado el gen, se comprobó que su amplificación fuera del tamaño esperado y esto se comprobó mediante el corrimiento electroforético de un gel de agarosa al 1%.

Teniendo identificado el gen se prosiguió a hacer digestiones tanto del gen E1 como del vector pXJ40 con las enzimas de digestión *BamHI* y *HindIII*. A continuación se muestran las reacciones de digestión tanto para el gen E1 como para el vector.

Digestión con *HindIII*, tanto del vector como del gen E1. **(8 Hrs/ 37°C)**

46.5 µL	Agua Esteril
3.5 µL	HindIII 10U/ µL
8 µL	Buffer 10X
22 µL	E1 132 ng/µL
80 µL	TOTAL

60 µL	Agua Esteril
6 µL	HindIII 10U/ µL
8 µL	Buffer 10X
6 µL	pXJ40 846 ng/µL
80 µL	TOTAL

Digestión con *BamHI*, tanto del vector como del gen E1. **(8 Hrs/ 37°C)**

52.5 µL	Agua Esteril
3.5 µL	BamHI 10U/ µL
14 µL	Buffer 10X
70 µL	E1 digerido c/HindIII
140 µL	TOTAL

50 µL	Agua Esteril
6 µL	BamHI 10U/ µL
14 µL	Buffer 10X
70 µL	pXJ40 digerido c/HindIII
140 µL	TOTAL

Una vez teniendo digerido perfectamente tanto gen como el vector, se procedió a identificar si efectivamente estaba digerido el vector, mediante el corrimiento electroforético de un gel de agarosa al 1% e identificando que el vector estuviera totalmente linearizado. Una vez comprobando lo anterior, se procedió a hacer la reacción de ligación.

Para clonar el gen E1 que es de un tamaño de 1.8 Kb y que el vector pXJ40 es de un tamaño aproximadamente de 5.1 Kb, entonces el gen E1 cabria 2.83 veces en el vector. Para hacer un reacción de ligación con una relación 1:5, seria 110 ng de pXJ40: 194.35 ng del gen E1, de acuerdo con el razonamiento anterior. Ya que la cantidad de ADN del vector se divide entre el número de veces que cabría el inserto en el vector, por lo tanto 5 veces más del gen E1 sería 194.35 ng. (Maniatis, and col. 1989)

Con esta relación se procedió a hacer la reacción de ligación mediante: “Rapid DNA Ligation Kit” de Fermentas.

pXJ40	6.6 µL (110 ng)
Gen E1	2.9 µL (194.35)
Buffer 5X	4 µL
T4 Ligasa (5U/µL)	1 µL
Agua Esteril	5.44 µL
TOTAL	20 µl

(22 °C/ 10 min)

Una vez ligado el gen al vector pXJ40, se procedió a amplificar dichos productos de ligación en bacterias químicamente competentes con cloruro de calcio, como se muestra a continuación.

Transformación de células competentes con los vectores

Bacterias

La cepa bacteriana utilizada para clonar los vectores recombinantes fue la DH5α Rec A-. La cepa fue transformada con estas construcciones por medio del método de $CaCl_2$.

La cepa DH5α se incubaron en 50 mL de medio LB a 37° C, 250 rpm, hasta que las bacterias alcanzaran una absorbancia en OD_{600} de 0.4 (aproximadamente 2.45 h.). Luego se incubaron las bacterias en hielo y posteriormente se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos a 4° C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla de bacterias se resuspendió en una solución fría de $CaCl_2$ 100 mM/ Tris 10 mM, pH 7.5 (50 mL por cada 100 mL de cultivo) y se incubaron en hielo. Posteriormente se centrifugaron a 2500 xg/ 4° C. se descartó el sobrenadante y nuevamente se resuspendió la pastilla en solución $CaCl_2$100mM/Tris10mM. Por este método las bacterias quedarán competentes para transformarse.

Transformación de bacterias competentes.

Se agregaron 100 ng del vector recombinante a una alícuota de 200 µl de las bacterias competentes DH5α. Se incubó la mezcla en hielo por 30 minutos y luego se sometió a un choque térmico de 42° C durante 2 minutos. Enseguida se incubaron las bacterias en hielo por 5 minutos, para luego agregar 800 µl de medio LB. Se incubaron las bacterias transformantes a 37° C, 300 rpm por una hora. A continuación se centrifugaron y la pastilla se resuspendió con parte del sobrenadante. Se tomó la alícuota para luego sembrarla en cajas de Petri con medio LB – agar suplementado con 80 µg / ml de ampicilina. Las cajas se incubaron a 37° C por toda la noche.

De las cajas de Petri se seleccionaron y cosecharon 10 colonias al azar, para cada aislado viral y se inocularon en 2 mL de medio LB suplementado con ampicilina (80 µg / ml). Las bacterias se incubaron a 37° C por toda la noche en agitación constante. Las bacterias fueron luego colectadas por centrifugación y se purificó el plásmido a partir de ellas por una minipreparación rápida, utilizando el *QIAprep Spin Miniprep ki*t (QIAGEN), el plásmido se

eluyó de las columnas con 100 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8.5. Se verificó la presencia del inserto mediante digestión con las enzimas SmaI y HindIII, además de PCR.

Una vez que se comprobó la identidad de los plásmidos se procedió a purificarlos en mayor escala mediante una maxi preparación de plásmido, usando el *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN), con 500 mL de inóculo para las bacterias transformantes positivas a cada una de las variantes virales.

A continuación se muestra un diagrama de los pasos empleados para la clonación del gen E1.

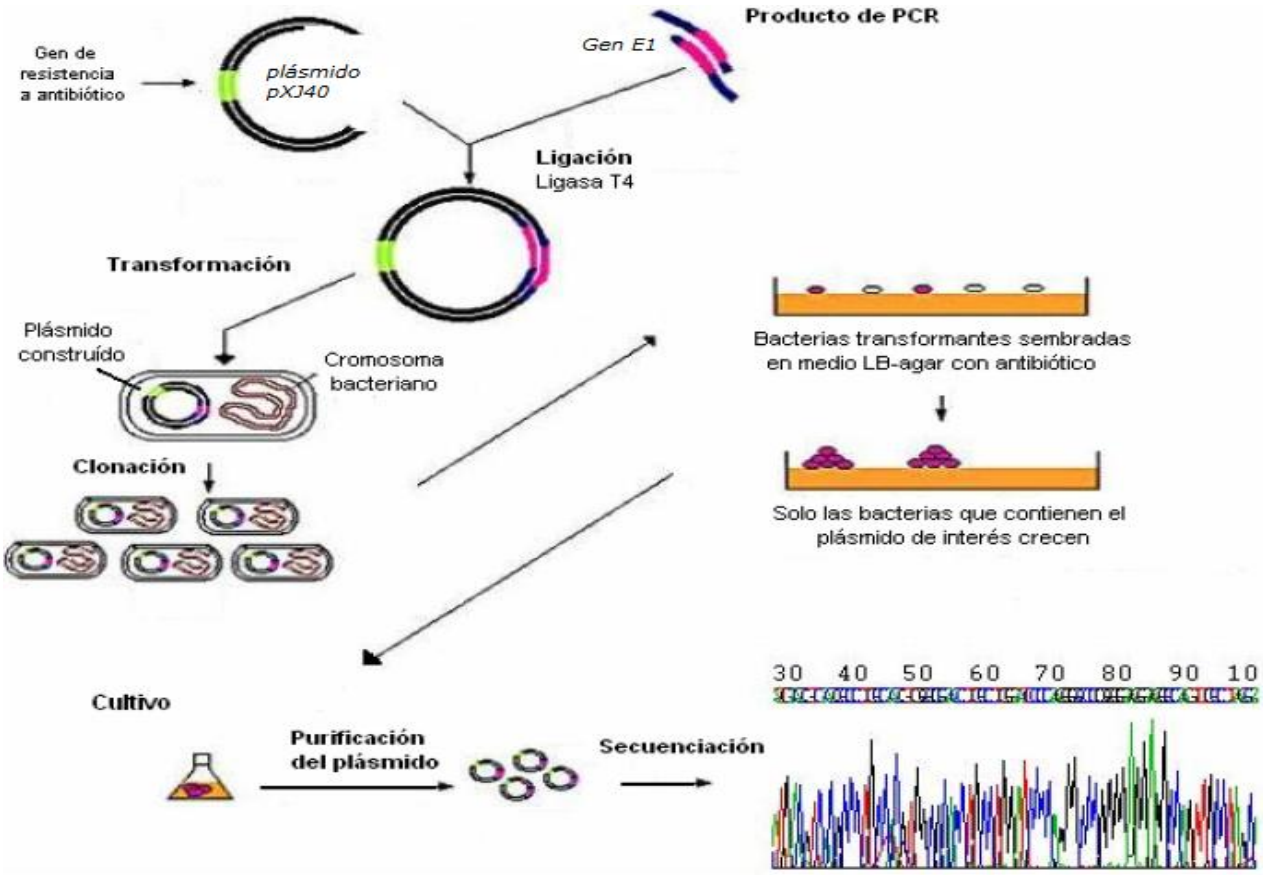


Fig. 20. Procedimiento de Clonación, amplificación y secuenciación del gen E1.

El siguiente paso fue la introducción de cada una de las construcciones antes mencionadas en líneas celulares por medio de transfección, con el fin de evaluar el efecto de las mutaciones intratipo en la replicación.

PCR de los vectores pCG con el gen E2 y pGL2-Basic con la Región Larga de Control "LCR"

Para la realización de este trabajo, previamente ya se contaba con las clonaciones hechas, tanto de las tres variantes de E2, como de las tres variantes de “LCR” también de VPH-18, por lo tanto antes de realizar cualquier trabajo con estas construcciones se necesitaba comprobar su identidad, por lo que se prosiguió a hacer digestiones para liberar el inserto.
Para E2 se hizo digestión con las enzimas *XbaI* y *BamHI* para comprobar que tenían el gen E2, de tamaño cercano a 1112 pb. La primera reacción con XbaI, incubándose a 37º C por 1 hora. Se purificó el producto de esta digestión mediante el *High Pure PCR Product kit*, se eluyó con 50 µl de agua bi destilada y se sometió el producto a la segunda digestión con *BamHI* (New England Biolabs) a 37° C por 1 hora.

Posteriormente se comprobó por PCR y por secuenciación que el fragmento amplificado correspondiera en tamaño y en secuencia a cada una de las variantes de E2.
También se comprobó de la misma manera que las distintas “LCR” estuvieran correctamente clonadas en el vector pGL2, por lo que se digirió este vector con las enzimas SmaI y HindIII. La primera digestión se hizo con *HindIII* (New England Biolabs) a 37° C por 1 hora. Se purificó el producto de digestión mediante el *High Pure PCR Product kit*, se eluyó con 50 µl de agua bi destilada y se sometió el producto a la segunda digestión con *SmaI* (New England Biolabs) a 30° C por 1 hora.

Posteriormente también se comprobó por PCR y por secuenciación que el fragmento amplificado correspondiera en tamaño y en secuencia a cada una de las variantes de la Región Larga de Control “LCR”.

Transfección

Dentro de los métodos bioquímicos, la transfección por liposomas, o lipofección se basa en que la mezcla de un lípido policatiónico y uno con carga neutra que producen la formación de una vesícula membranosa unilaminar o liposoma, que tienen una carga positiva neta debida a los grupos aminos altamente positivos del grupo hidrofílico de la molécula. La lipofección se basa en el acomplejamiento entre estos liposomas y el ADN. El complejo catiónico resultante se adhiere y fusiona con la membrana celular, permitiendo la entrada del ADN en el citosol. Existen muchos lípidos usados en lipofección. El lípido con carga neutra más usado es el dioleil-fosfatidil-etanolamina, DOPE. La lipofección es el método

más elegido en las transfecciones de rutina, dado que es un método fácil, reproducible y muy eficiente.

La técnica de transfección usada en este proyecto fue la lipofección, usando el sistema lipofectAMINE-PLUS reagent (Invitrogen). En la **figura 21** se ilustra de manera general el procedimiento:

Un día previo a la transfección se sembraron 2 x 10^5 células en cajas de cultivo de 6 pozos, en 2 ml de medio DMEM (GIBCO, USA) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (HyClone). Se incubaron por 18 horas a 37 ° C y 5 % de CO_2.

Lo mas recomendable para hacer la transfección en este tipo de pozos de aproximadamente 30 mm^2 es de ≥2 µg de una mezcla de ADN plasmídico en 200 µL de DMEM sin suero, al que previamente se agregaron 4 µL de reactivo PLUS (Invitrogen) y 4 µL de LipofectAMINE (Invitrogen).

Se combinaron la solución de ADN con la lipofectamina diluida. Se mezclaron suavemente y se dejó incubar a temperatura ambiente por no más de 30 minutos.

Los complejos liposomicos se incubaron en la línea celular HEK-293 a 37° C y 5 % de CO_2 por 5 horas. El ensayo de luciferasa se realizó a las 48 horas post-transfección

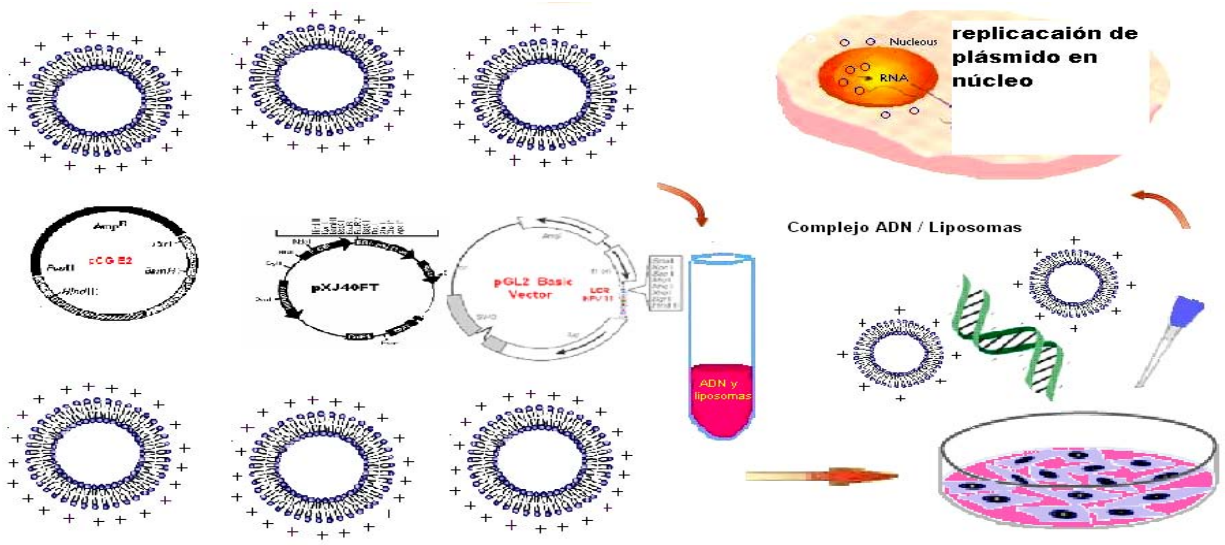


Fig. 21: Esquema del ensayo de transfección. En esta figura se esquematiza de manera breve, el procedimiento de transfección, desde la mezcla de los plásmidos con los liposomas y la incorporación de esta mezcla a células HEK-293.

Análisis de la expresión de los genes E1 y E2 por RT-PCR.

Para analizar la correcta expresión tanto de los genes E1 y E2 de las tres variantes de VPH-18, se introdujeron estos genes por transfección por separado.

Se despegaron las células mediante el uso de tripsina y se procedió a extraer el ARN de estas células mediante el uso de “RNeasy Mini Kit Qiagen”, después de lo cual se realizó la retro transcripción de ARN a ADN complementario mediante el “RNA PCR kit GeneAmp de Applied Biosystems”. El producto fue analizado en un gel de agarosa para observar de manera semicuantitativa los niveles de expresión de estos genes en sus respectivos vectores. Simultáneo al análisis de esta expresión se analiza la expresión del gen constitutivo β-actina, como control de carga y para normalizar la expresión entre los distintos genes variantes.

Para el análisis de la replicación de cada una de las variantes de VPH-18, se realizaron distintas transfecciones con el objetivo de evaluar cual importante son las mutaciones intratipo de VPH-18 en la “LCR” y el gen E2 en la replicación viral. Estas transfecciones se realizaron de la siguiente manera:

Para evaluar que tan importante son las mutaciones en la “LCR”, se co-transfectan E2 y E1 de variante Asiático-Americana que serán constantes en cada una de las tres co-transfecciones, y las variables a analizar serán cada una de las tres variantes de VPH-18 de la “LCR" como se muestra en la figura 22.

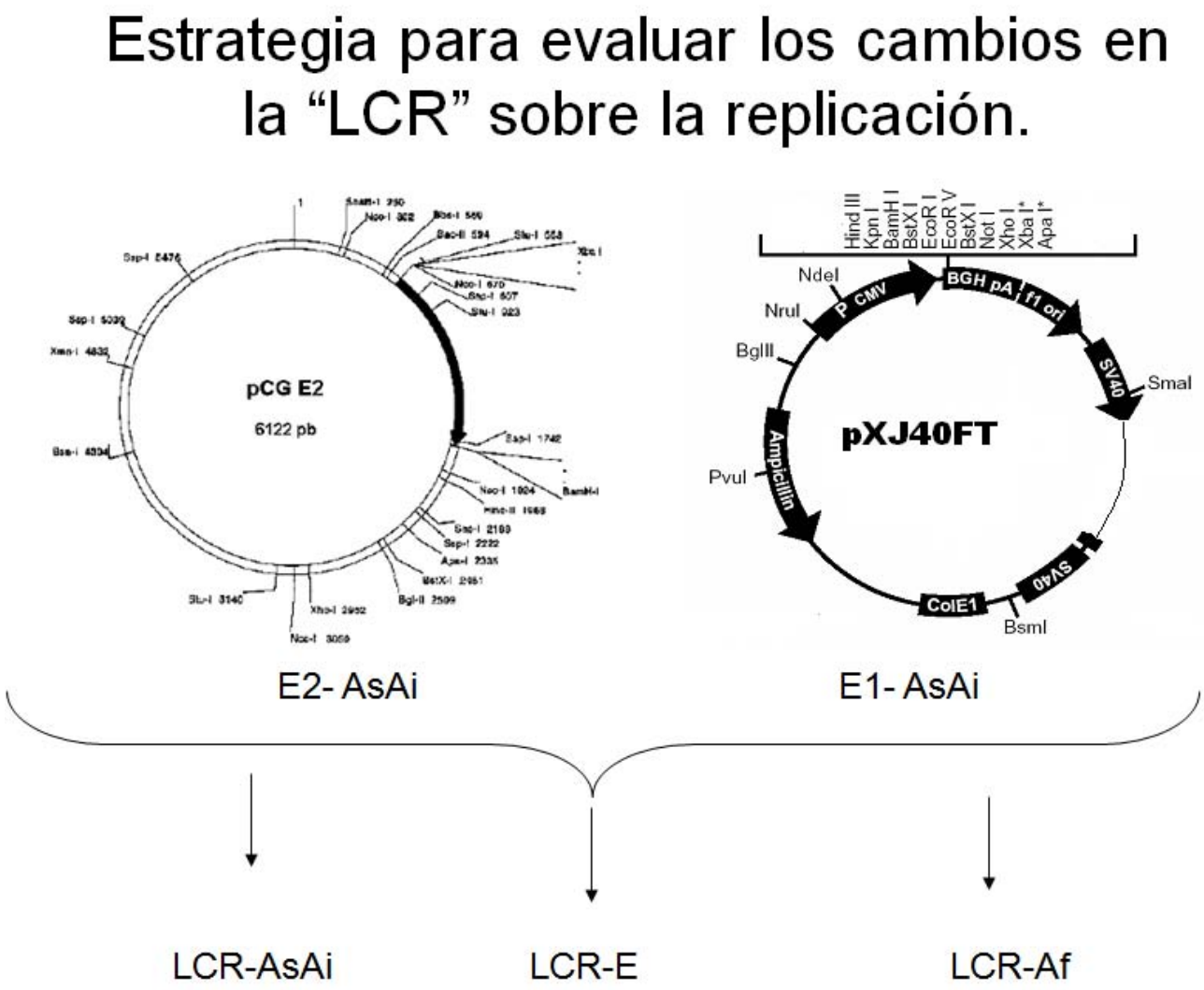


Fig. 22. Co-transfecciones realizadas para evaluar el efecto de las mutaciones en “LCR”

Para evaluar que tan importante son las mutaciones en el gen E2, se co-transfectan “LCR” y E1 de variante Asiático-Americana que serán constantes en cada una de las tres co-transfecciones, y las variables serán los genes E2 de las tres variantes de VPH-18, como se muestra en la figura 23.

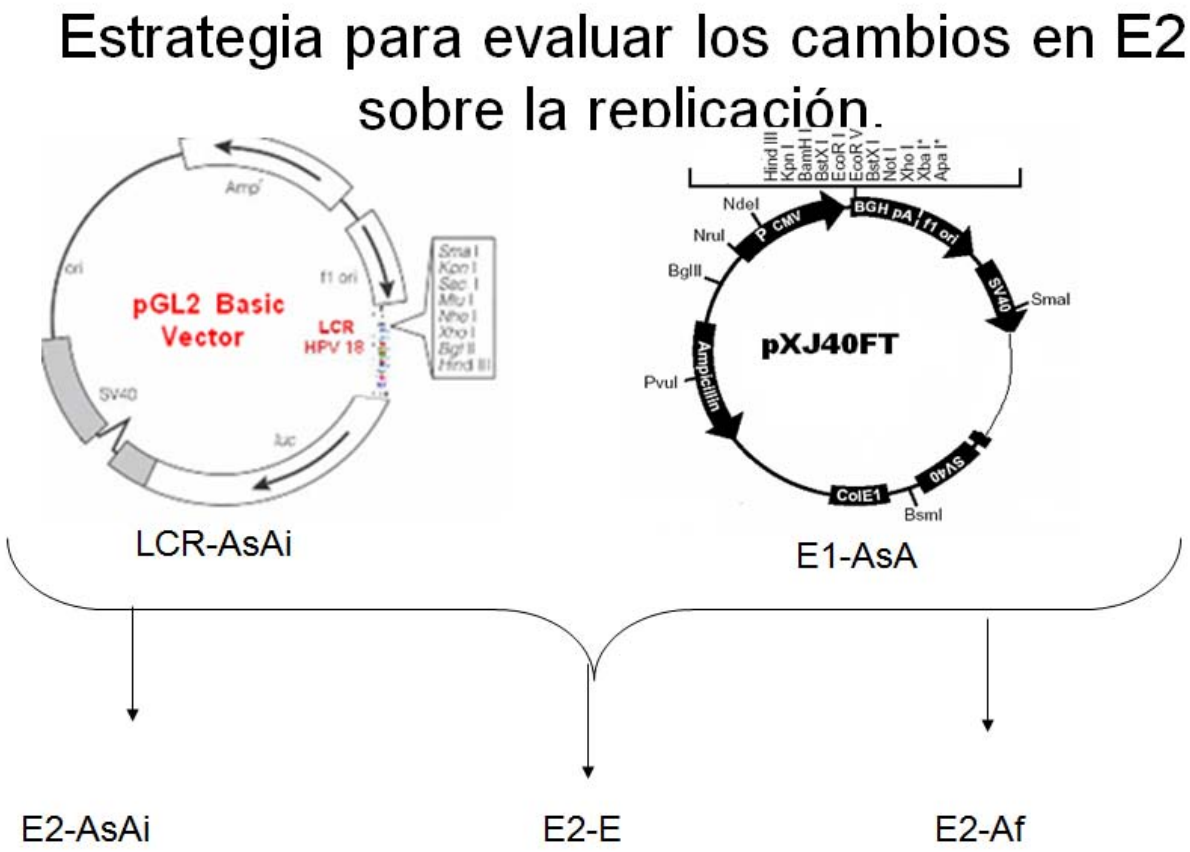


Fig. 23. Co-transfecciones realizadas para evaluar el efecto de las mutaciones en el gen “E2”

Extracción de ADN de bajo peso molecular.

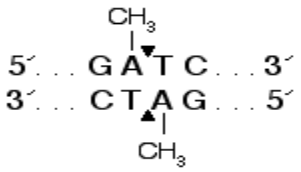
Para realizar los ensayos de PCR en tiempo real, es necesario extraer el plásmido que se replicó de *novo* en las células después de 72 horas post-transfección. Esta extracción de ADN se realizó mediante el protocolo de “extracción de HIRT”. (Morgan IM, Taylor ER, 2003)

En este procedimiento, las células después de 72 hrs post-transfección, se les retira el medio de cultivo y son lavadas dos veces con PBS al 1X para posteriormente ser lisadas por la adición de 400 µL de la solución “Hirt”, la cual consiste en: (10mM EDTA pH 7.5 y 0.6% de SDS). La solución “Hirt” se deja incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Usando un gendarme se raspan las células con la solución “Hirt” y se transfiere a un tubo estéril de 1.5 mL y se agrega 100 µL de NaCl al 5M y se deja incubando el extracto celular por 12 h a 4°C. Después de haber sido incubado el extracto celular, se centrifuga a 20,000g/4°C/30min. Se elimina el botón y se transfiere el sobrenadante a un tubo estéril de 1.5 mL y se adiciona un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24: 24: 1 v/v/v), se mezcla la fase orgánica y la fase acuosa y se separan mediante centrifugación a 20,000g/25°C/5 min. Cuidadosamente se remueve la fase superior acuosa, teniendo

cuidado de no acarrear la interfase y esto es transferido a un tubo estéril de 1.5 mL El ADN del plásmido es precipitado a -70°C por al menos 2 horas adicionando un volumen de 1/10 acetato de sodio 3M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol absoluto. Después de la precipitación se centrifuga a 20,000g/4°C/25 min y el botón de ADN obtenido es lavado con 250 µL de etanol al 70% y se centrifuga a 20,000g/4°C/5 min y se seca mediante una centrifuga “speed vac” y finalmente es suspendido en 80 µL de agua estéril.

Digestión enzimática del ADN extraído.

Una vez extraído el ADN, se realiza una digestión enzimática con la finalidad de comprobar que el ADN introducido a las células mediante transfección fue en la misma proporción en cada una de las diferentes transfecciones realizadas y de esta manera cuantificar lo que se está replicando de *novo* en las células. Estas digestiones se realizan con las enzimas de restricción *DpnI* y *MboI*. *DpnI* se caracteriza por ser una enzima *Dam*+, lo cual significa que reconoce una secuencia especifica y solo la puede digerir siempre y cuando este metilada en una adenina. Este tipo de metilación solo se realiza en bacterias y no en células eucariotas, por lo cual solo estará presente en el plásmido que se amplifique a partir de bacterias, de este modo se detectara únicamente el plásmido replicado de *novo*. Sin embargo para comprobar que lo que se está replicando en la célula no se debe a que las cantidades que se transfectaron de plásmido fueron diferentes se utilizó otra enzima llamada *MboI* que reconoce la misma secuencia que reconoce la enzima *DpnI*, solo que con la pequeña sutileza de que solo va a digerir a dicha secuencia, solo si esta no está metilada en una adenina, ya que si esto sucede no ocurrirá la digestión porque es una enzima sensible a metilaciones *Dam.* Por este motivo el ADN detectado de las digestiones con MboI será aquel que realmente fue introducido a las células mediante transfección, ya que va a digerir a todo lo que se haya replicado de *novo*. (Morgan IM, Taylor ER, 2003)



Sitio de reconocimiento de la enzima DpnI

Sitio de reconocimiento para la enzima MboI

A continuación se muestra las reacciones de digestión con las enzimas DpnI y MboI.

ADN extraído	25 µL
DpnI 5u/µL	2 µL
Buffer 10 X	5 µL
Agua Esteril	18 µL
TOTAL	50 µl

(12 Hrs/ 37°C)

ADN extraído	25 µL
MboI 5u/µL	2 µL
Buffer 10 X	5 µL
Agua Esteril	18 µL
TOTAL	50 µl

(12 Hrs/ 37°C)

En el diagrama que se representa a continuación muestra la estrategia empleada con las enzimas de restricción, en donde se ejemplifica el tipo de ADN que digiere cada una de las enzimas, con la finalidad de determinar la cantidad de plásmido que entra a las células una vez que se realizaron las transfecciones transitorias.

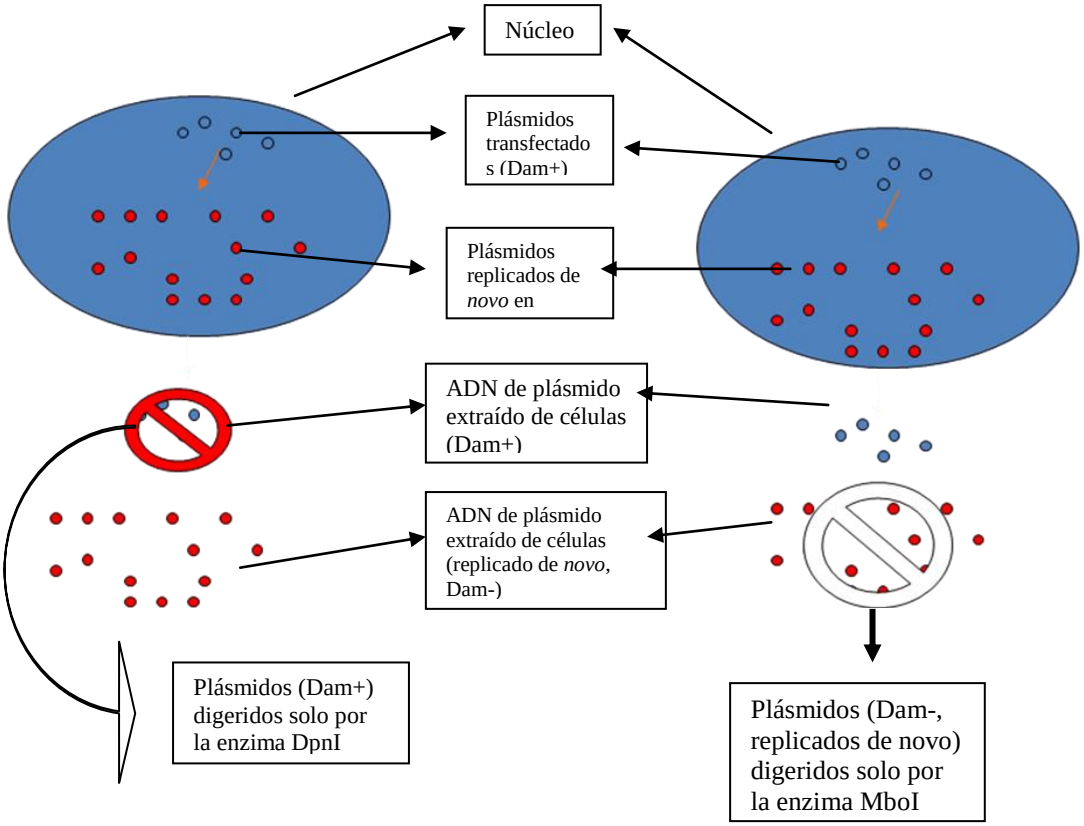


Fig. 24. Blancos de las enzimas de restricción *DpnI* y *MboI*.

Una vez digerido el ADN extraído de las células, se realiza una PCR en tiempo real. Previamente se requiere de un tratamiento con *ExonucleasaIII* para eliminar residuos de nucleótidos que pudieran intervenir en la reacción. A continuación se presenta la reacción utilizada para esta enzima.

ADN c/Digestión *DpnI* ó MboI	40 µL
ExonucleasaIII 100u/µL	1 µL
Buffer 10 X	5 µL
Agua Esteril	4 µL
TOTAL	50 µl

(30 min/ 37°C)

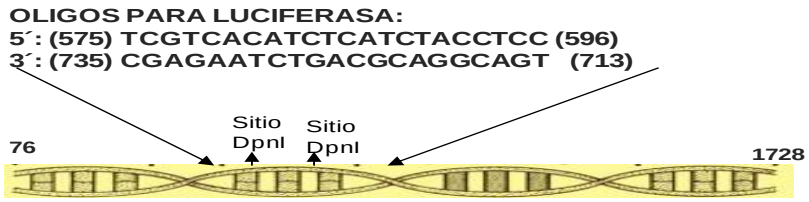
Análisis de la replicación de VPH-18 mediante PCR en Tiempo Real.

Con los plásmidos extraídos de las transfecciones realizadas, se procedió a realizar el PCR en tiempo real para analizar el número de copias replicadas en cada transfección realizada, mediante "SYBR GREEN".

Para este trabajo los oligonucleótidos se diseñaron para amplificar un fragmento de 130 pb en el gen de luciferasa del plásmido pGL2, en donde fue clonada la "LCR" la cual contiene el origen de replicación. Este fragmento cuenta con dos sitios de reconocimiento para la enzima *DpnI.* El hecho de amplificar un fragmento que contenga estos sitios de restricción es de vital importancia para la metodología, puesto que gracias a esto se puede determinar si la cantidad de plásmido introducido a las células en cada una de las transfecciones es equitativo entre las transfecciones, y de esta manera poder normalizar los valores.

El amplificar un fragmento del gen de luciferasa y no de cualquier parte de la "LCR", no afectará los resultados obtenidos del número de copias, ya que por cada copia que se genere del plásmido de luciferasa, se generará una copia del origen de replicación, de esta manera el número de copias será directamente proporcional entre el fragmento de luciferasa y el origen de replicación.

A continuación se muestra la secuencia de lo oligonucleótidos diseñados para amplificar el fragmento de luciferasa por PCR en tiempo real.



GEN DE LUCIFERASA

Primeramente para realizar el PCR en tiempo real se debe tener en cuenta, que los oligonucleótidos utilizados tanto el sentido como el antisentido sean de al menos 18 bases de longitud para que aseguren una buena hibridación y minimizan la posibilidad de generar

un sitio de hibridación secundaria en el blanco de DNA. Mantener el contenido de G-C entre 30 - 80%. Óptimo de 50% y que tengan una Temperatura de alineamiento (Tm) de entre 58 y 62 °C, siempre y cuando entre ellos no haya una diferencia mayor a dos grados de temperatura. Si es posible, se recomienda que los oligonucleótidos acaben en G o C, y también se recomienda una longitud mínima de 18 pb, ya que ≥18 pb aseguran una buena hibridación y minimizan la posibilidad de generar un sitio de hibridación secundaria en el blanco de ADN. Los últimos cinco nucleótidos del extremo 3´ no deben tener más de 2 Guaninas ó Citocinas. Se debe de evitar las corridas de nucleótidos idénticos (la misma base), especialmente 4 o más Guaninas deben evitarse. El fragmento para amplificar se recomienda ser entre 50 y 150 pb, para este caso el amplicón tendrá un tamaño de 130 pb.

Una vez teniendo perfectamente diseñados los oligonucleótidos, debe considerarse las concentraciones optimas de estos para usar en las muestras problemas, por lo que se realiza una serie de concentraciones variables para determinar cual es la concentración optima tanto del oligonucleótido sentido como del antisentido. En la siguiente tabla se muestra las concentraciones que se usaron para determinar las concentraciones óptimas de los oligonucleótidos.

Tabla.2. Concentraciones de los primer´s “Forward” y “Reverse” para su estandarización por PCR en tiempo real

	Primer Forward (nM)		
Reverse Primer (nM)	**50**	**300**	**900**
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900

(Power SYBR Green PCR Master Mix protocol; Applied Biosystems)

Por último el aparato de PCR en tiempo real (7300 Real Time PCR System, Appplied Biosystems), detecta la cantidad de luz emitida de cada muestra problema y se obtienen curvas de amplificación que sirven para cuantificar la cantidad inicial de moléculas de templado.

Las condiciones que se utilizaron para hacer la reacción de PCR en tiempo real fueron las siguientes.

Tabla. 3. Condiciones para la reacción de PCR en tiempo real

STEP	AmpliTaq Gold Polymerase Activation	PCR	
		Cycle	(40 Cycles)
		Denature	Anneal/Extend
	HOLD	CYCLE	
Temperature/ Time	95°C 10 min	95 °C 30 Seg	60°C 1 min
Volume	20 µL		

Para saber con precisión el número de copias replicado en cada una de las transfecciones, es necesario hacer una curva tipo con concentraciones conocidas del templado. El número de copias del templado es calculado gracias a un programa de la universidad de "Rhode Island" que determina con exactitud el número de copias de un templado de ADN siempre y cuando se pueda conocer su concertación y el peso en pares de bases que tenga el templado. Para obtener el valor del número de copias de un templado, también puede ser calculado manualmente. En el "link" mostrado a continuación, puede calcularse el número de copias de un templado ya sea mediante el uso del programa o manualmente: www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html.

Una vez conociendo el número de copias del templado para realizar la curva tipo se hacen diluciones seriales desde el $1X10^{09}$ hasta $1X10^{3}$ copias. Los datos obtenidos de esta curva se grafican para obtener una pendiente la cual proporcionará los datos necesarios para obtener la eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real. La eficiencia de PCR en tiempo real nos indicara la calidad del experimento, ya que si hubo fallas técnicas al momento de realizar el experimento como lo son un mal uso de los volúmenes en las micropipetas o usar micropipetas descalibradas, entre otros, esto se verá reflejado en la eficiencia de PCR. Una eficiencia de PCR ≥90% se considera buena para que los datos obtenidos realmente sean fidedignos, sobre todo si hay comparaciones entre los mismos datos.

Por lo tanto para calcular la eficiencia de PCR en tiempo real, se utilizará el valor de la pendiente obtenida con la curva tipo, esta puede calcularse mediante la ecuación de la recta. Una vez conociendo el valor de la pendiente se aplicara la siguiente fórmula para conocer la eficiencia de la PCR en porcentaje: $10^{(1/\text{-valor de la pendiente})-1} \times 100$

6.- RESULTADOS.

6.1.- Secuenciación de E1 de variantes de VPH-18

La secuenciación de E1 de las variantes Europea, Africana y Asiática-Americana de VPH-18 requirió del diseño de oligonucleótidos internos para amplificar por fragmentos a todo el gen E1. En las figuras 25. y 26, se muestra la amplificación de dichos fragmentos de E1 de diferentes muestras de tumor.

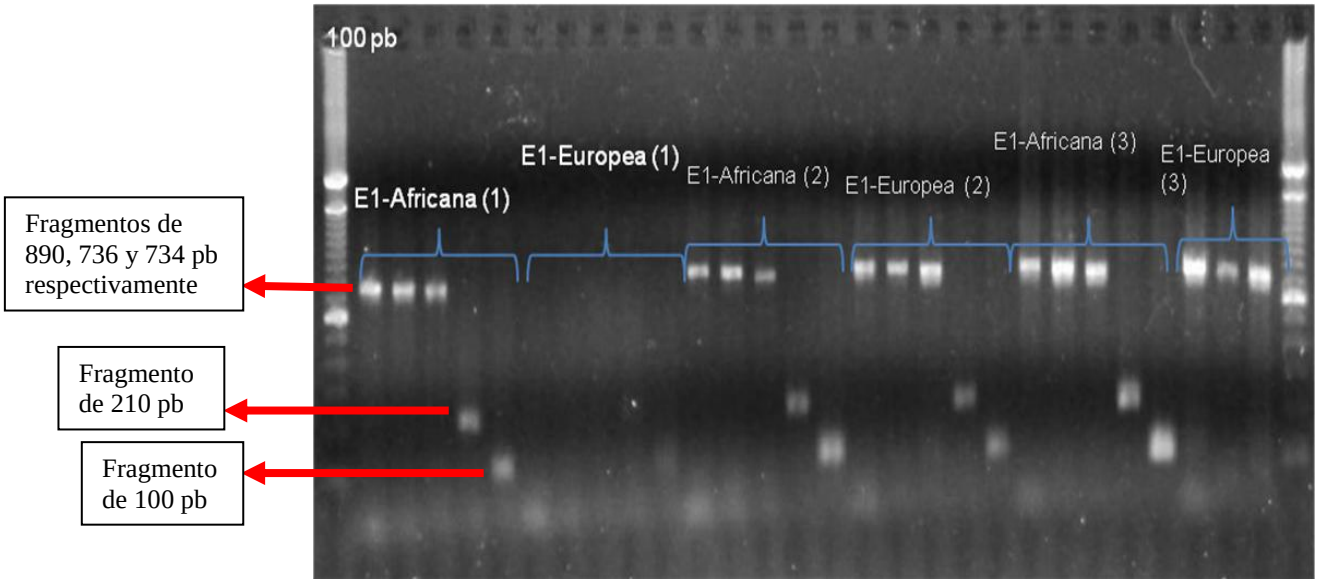


Fig. 25. Amplificación de Fragmentos de E1 para su secuenciación.

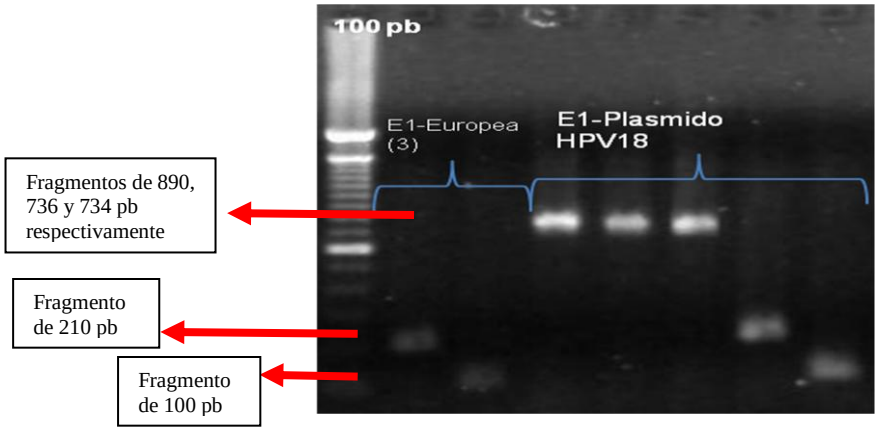


Fig. 26. Amplificación de Fragmentos de E1-AsAi de un plásmido con VPH-18 para su secuenciación.

Una vez que se han amplificado los fragmentos del gen E1, se secuenciaron y se analizaron las mutaciones que se muestran en la tabla 4.

Tabla. 4. Cambios identificados en el gen E1 por secuenciación.

		E1-AsAi		E1-AFRICANA		E1-EUROPEA	
	POSICIÓN	NUCLEOTIDO	AMINOACIDO	NUCLEOTIDO	AMINOACIDO	NUCLEOTIDO	AMINOACIDO
Sitio de Localización Nuclear (“NLS”)	1012	A	Ser 33	-	-	T	-
	1087	T	Cys 58	C	-	-	-
	1123	C	Phe 70	T	-	-	-
	1194	C	Thr 94	-	-	A	Lys
	1256	G	Glu 115	C	Gln	-	-
	1264	T	Thr 117	A	-	-	-
	1279	G	Gln 122	A	-	-	-
	1303	T	Phe 130	C	-	-	-
	1353	T	Ile 147	-	-	A	Asn
	1378	T	His 157	G	Gln	-	-
	1408	G	Thr 165	A	-	-	-
	1423	C	Asn 170	T	-	-	-
	1470	A	Asn 186	C	Thr	-	-
Sitio de unión a ADN (“DBD)	1588	A	Ser 225	-	-	C	-
	1735	A	Thr 274	T	-	-	-
	1774	T	Arg 287	G	-	-	-
	1789	G	Lys 292	A	-	-	-
	1843	T	Thr 310	-	-	G	-
	1891	A	Leu 326	G	-	-	-
Sitio de unión a E2. Helicasa/ATPasa	2101	A	Ala 396	G	-	-	-
	2270	C	Leu 453	T	-	-	-
	2335	C	Thr 474	T	-	-	-
	2401	T	Ser 496	C	-	-	-
	2440	G	Val 509	A	-	-	-
	2446	C	Ser 511	T	-	-	-
	2482	T	Thr 523	C	-	-	-
	2509	G	Thr 532	C	-	-	-
	2551	G	Ala 546	T	-	-	-
	2566	A	Pro 551	C	-	-	-
	2656	T	Asn 581	C	-	-	-
	2719	**T**	**Asp 602**	**G**	**Glu**	**-**	**-**
	2734	A	Pro 607	T	-	-	-

En esta tabla se puede observar las mutaciones que presenta cada variante, en donde la mayoría de estas son mutaciones silenciosas (con un signo de “ - “ dentro de cada recuadro se representa que no ha habido ningún cambio ya sea en la secuencia de nucleótidos y/o de aminoácidos con respecto a la referencia). También se indica en la parte izquierda de la tabla, la región de la proteína donde residen tales mutaciones.

La mayoría de las mutaciones en secuencia de aminoácidos se presentan en el sitio de localización nuclear, el cual puede ser clave para que E1 este funcional en núcleo. Solo una mutación se presenta en el sitio de unión a E2 dentro de la variante africana y remarcada en rojo, el cual es un aminoácido de interacción física con esa proteína.

6.2.- Clonación del gen E1 en el vector de expresión pXJ40.

Para realizar la clonación del gen E1 variante AsAi, se amplificó mediante PCR este gen, de un plásmido (pBR322) que contiene todo el genoma de VPH-18 Referencia.

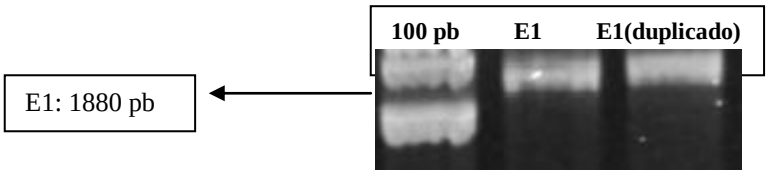


Fig. 27 Amplificación del gen E1 por PCR

El producto se digirió con enzimas de restricción al igual que el vector pXJ40 para posteriormente clonarlo como se especifico en materiales y métodos (véase pág. 31). A continuación se muestran los productos de digestión para comprobar que E1 ha sido clonado dentro del vector.

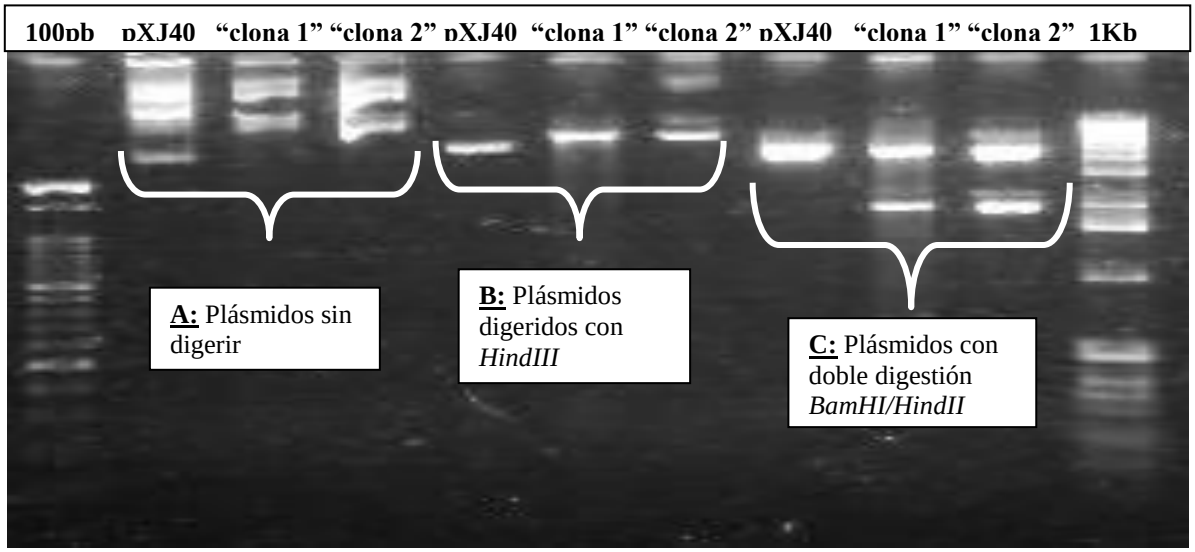
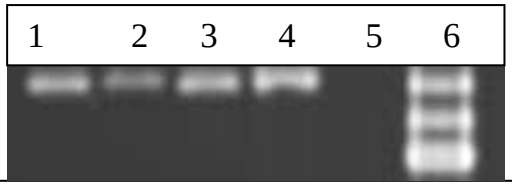


Fig. 28. Clonación de E1-AsAi en el vector de expresión pXJ40

En esta figura se puede apreciar que el vector vacio es menos pesado que las clonas obtenidas con el gen E1, tanto en el no digerido como en el digerido y linearizado (panel A y B). Así como también puede observarse la liberación del gen E1 cuando se le realiza doble digestión a comparación del vector vacio (panel C).

6.3. – Verificación del inserto "LCR" en el vector de reportero pGL2-Basic.

Se comprobó que las construcciones con los plásmidos pGL2 contuvieran las secuencias "LCR" de cada una de las variantes de VPH18 mediante una PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar la "LCR" de VPH-18 para los tres aislados virales.

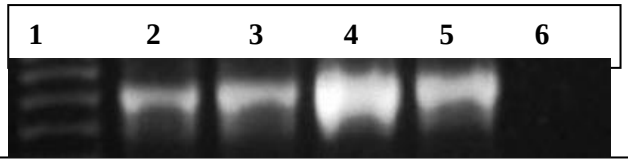


Carril 1: variante Referencia (Asiático-Americana)
Carril 2: variante Europea
Carril 3: variante Africana
Carril 4: Control positivo: LCR del plásmido "pBR322-HPV18-AsAi"
Carril 5: Control negativo.
Carril 6: Marcador molecular de 100 pb

Fig. 29. Amplificación de "LCR" a partir de construcciones de pGL2-basic

6.4 – Verificación del inserto E2 en el vector de expresión pCG

Se comprobó que las construcciones con los plásmidos pCG contuvieran las secuencias del gen E2 de cada una de las variantes de VPH18 mediante una PCR con oligonucleótidos específicos. El producto de PCR fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio. En la siguiente figura se muestra los fragmentos obtenidos, con el tamaño esperado de aproximadamente 1112 pb de la. Posteriormente estos plásmidos fueron secuenciados corroborándose la identidad de cada una de las variantes.



Carril 1: Marcador de peso molecular 100pb
Carril 2: E2 variante Asiático Americana (AsAi)
Carril 3: E2 variante Europea
Carril 4: E2 variante Africana
Carril 5: Control positivo: gen E2 "pBR322-HPV18-AsAi"
Carril 6: Control negativo: H_20

Fig. 30 Amplificación del gen E2 a partir del vector recombinante pCG-"E2"

6.5.- Análisis de la expresión de los genes E1 y E2 por RT-PCR.

Para corroborar que las construcciones hechas con los genes E1 y E2 estuvieran expresando correctamente, se realizó RT-PCR a partir del ARN obtenido de células transfectadas. Para tener un control de carga de la expresión de estos genes, se analiza simultáneamente la expresión β-actina. Fig. 31.

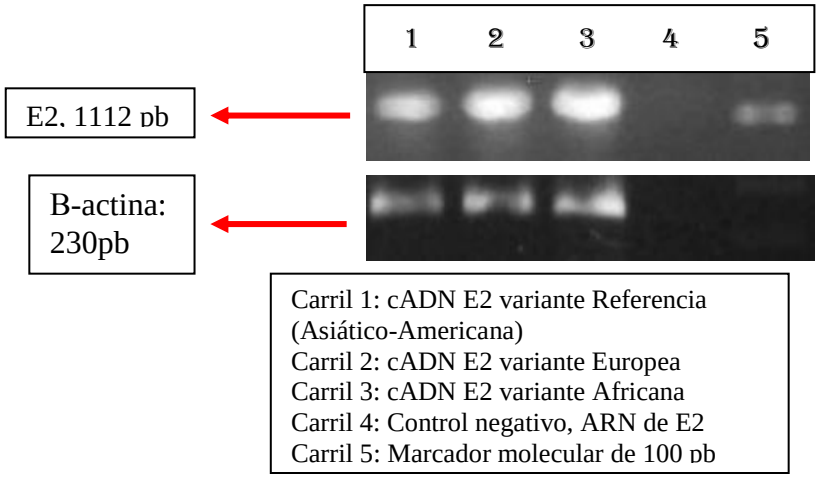


Fig. 31. Niveles de expresión de las variantes del gen E2 de VPH-18

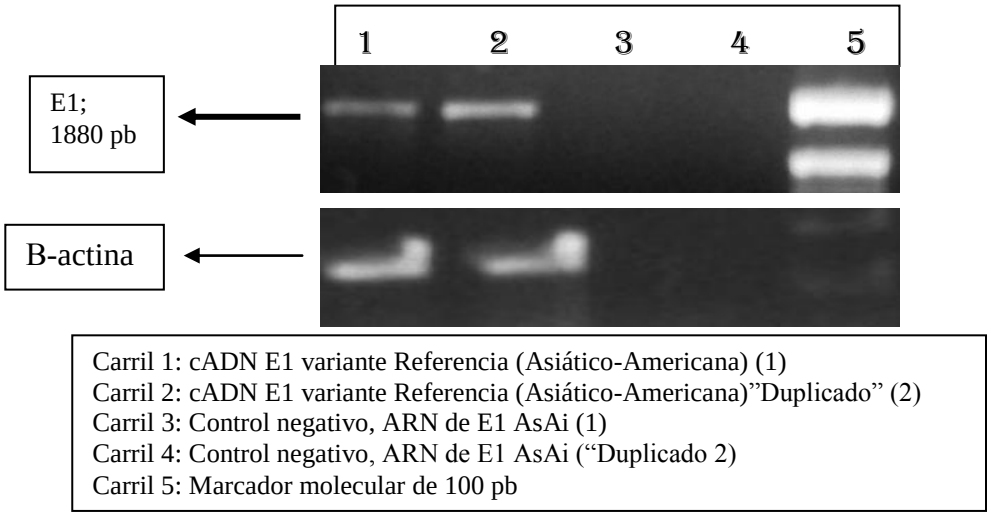
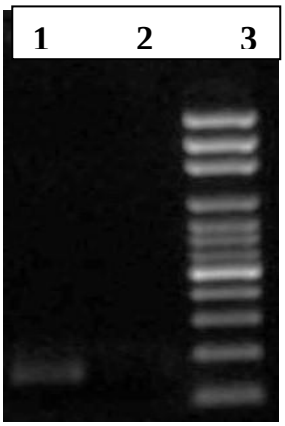


Fig. 32.- Nivel de Expresión del gen E1 AsAi, en el vector de expresión pXJ40

6.6.- Normalización de los plásmidos en las células transfectadas.

Para comprobar que las cantidades introducidas de plásmido introducidas mediante lipofección fueron equitativas en cada una de las transfecciones, se procedió a realizar reacciones de digestión con del ADN extraído con las enzimas *MboI* y *DpnI*. La enzima *MboI* nos indicará las cantidades de plásmidos introducidas a las células, ya que va a digerir el plásmido que se haya replicado de novo y solo quedara solamente el plásmido que fue introducido por lipofección, por otro lado la enzima *DpnI* va a digerir a los plásmido que hayan sido introducidos por lipofección, por lo tanto exclusivamente se podrá medir el plásmido que se haya replicado de novo.

Para tal efecto primero se evaluó la eficiencia de digestión de estas enzimas. Si el plásmido digerido eficientemente con la enzima *DpnI*, al amplificarse por PCR el fragmento del gen de luciferasa, no se debe obtener un producto, que es lo que se muestra en la figura 33, con el control sin digerir.

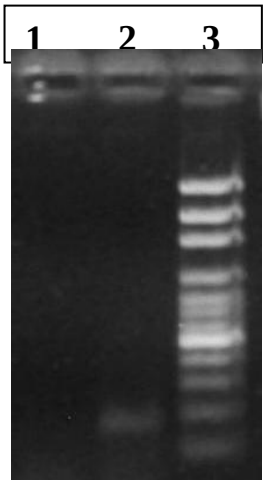


Carril 1: Plásmido pGL2-LCR sin digestión y amplificado por PCR.
Carril 2: Plásmido pGL2-LCR digerido con *DpnI* y amplificado por PCR
Carril 3: Marcador de 100pb

Fig. 33. Controles de digestión de la enzima *DpnI*

Para realizar los controles de digestión de la enzima MboI, se extrajo el ADN de células transfectadas.

Cuando el ADN plasmídico que se introduce en las células eucariotas, se encuentra metilado en adeninas. Sin embargo, al replicarse, las nuevas copias carecen de esta metilación. Al extraer el ADN de estas células transfectadas, contamos con las dos poblaciones de plásmidos, el metilado en adeninas (input) y el replicado de novo y no metilado. La eficacia de digestión de la enzima *MboI*, se asegura realizando una doble digestión (DpnI/MboI), donde solamente podrá amplificarse por PCR el fragmento de luciferasa en el caso de que *MboI* no digiera eficazmente, dejando algunas copias íntegras. La figura 34., muestra la eficacia de *MboI*.



Carril 1: Plásmidos extraídos de células con doble digestión (DpnI y MboI), amplificado por PCR.
Carril 2: Plásmidos extraídos de células, digerido con *DpnI* y amplificado por PCR.
Carril 3: Marcador de 100pb

Fig. 34. Controles de digestión de la enzima *MboI*

Una vez comprobado lo anterior, se procedió a evaluar si las cantidades de plásmidos introducidas por lipofección eran equivalentes en cada una de las transfecciones realizadas. Por tal motivo se extrajo el ADN de dichas células transfectadas y se digirió únicamente con la enzima MboI, para así conocer únicamente el plásmido que fue introducido en la técnica de lipofección. El ADN que solo fue digerido con la enzima DpnI se utilizará para evaluar la replicación de *novo* en las células y así determinar el efecto de las mutaciones sobre la replicación. A continuación se muestra el plásmido detectado mediante PCR en tiempo real a partir de ADN digerido con *MboI*.

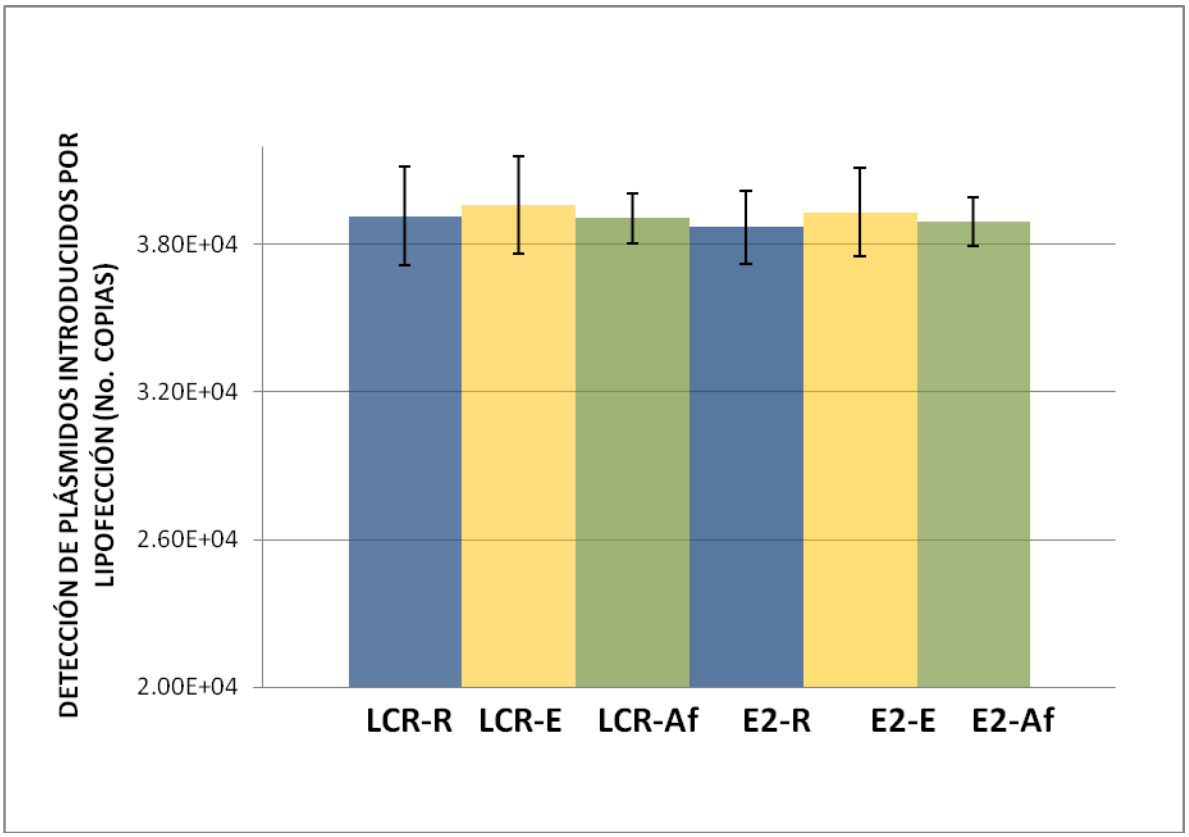


Fig. 35.- Detección de los plásmidos pGL2-LCR introducidos por lipofección. En esta gráfica se muestra la cantidad plásmidos introducidos por lipofección detectados por PCR en tiempo real, observándose que la cantidad introducida de estos en cada una de las transfecciones es equivalente.

6.7.- Análisis de la replicación de VPH-18 mediante PCR en tiempo real.

Se evaluó el efecto de las mutaciones tanto en el gen E2 como en la “LCR” sobre la replicación. Esto se hizo también por PCR en tiempo real.

Primero se evaluó el efecto de las mutaciones en la “LCR” por lo que las transfecciones realizadas tenían como constante tanto E1 y E2 AsAi, y como variable se tenía a cada una de las variantes de la “LCR” (véase Pág. 36 y 37).

A continuación se presentan los resultados obtenidos por PCR en tiempo real de los efectos de las mutaciones en “LCR” sobre la replicación.

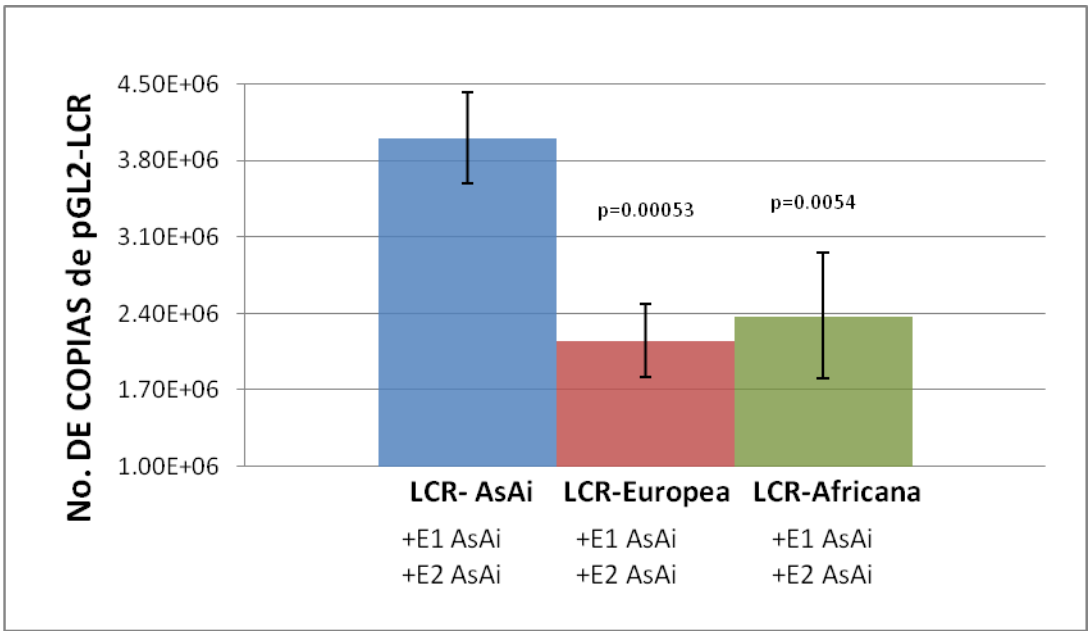


Fig. 36.- Efecto de los cambios en nucleótidos de “LCR” sobre la replicación.

Se evaluó la capacidad replicativa de cada uno de los plásmidos pGl2-LCR variantes, en presencia de p40-E1-AsAi y pCG-E2-AsAi.

En esta gráfica se puede apreciar que las mutaciones en la “LCR” tanto Europea como africana repercuten en niveles de replicación mucho más bajos que la variante Asiático-Americana.

Se observa que pLCR-AsAi presenta la mayor actividad replicativa. Las LCR de las variantes Europea y Africana presentan actividades más parecidas entre ellas, con una diferencia de alrededor de 1,600,000 copias menos que pLCR-E y pLCR Af. Las diferencias en replicación resultan estadísticamente significativas mediante una prueba “t-Student” en donde $p<0.05$.

En contraste, como se observa en la gráfica 37, cuando las constantes son LCR y E1 AsAi, las mutaciones en E2 no repercuten en diferencias en replicación de pLCR-AsAi.

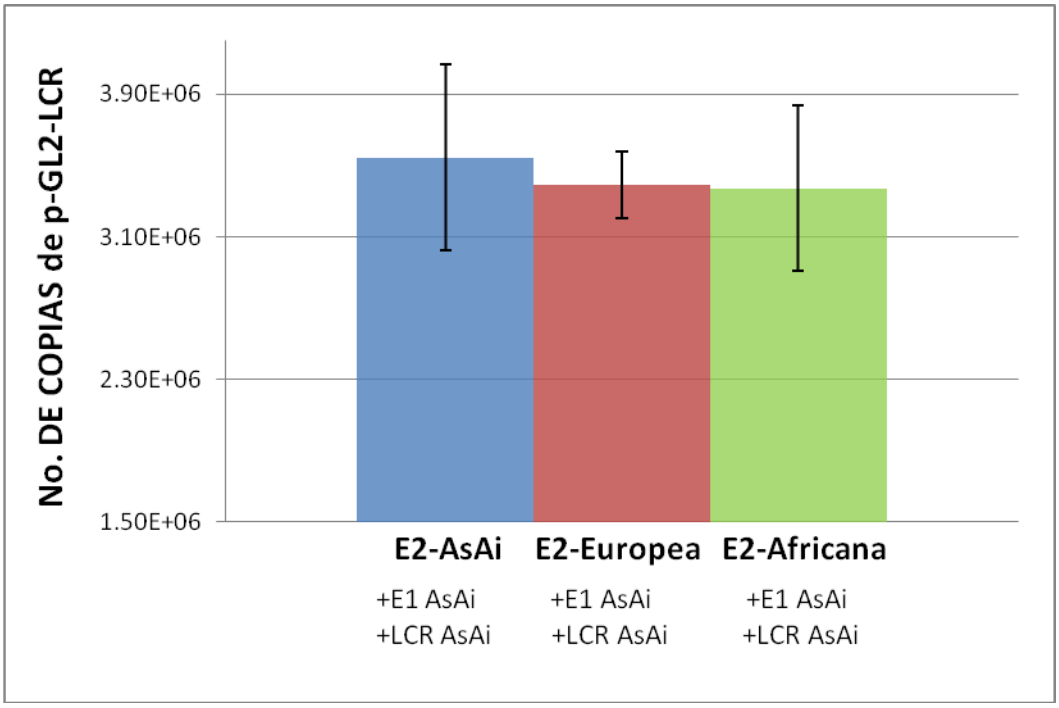


Fig. 37.- Efecto de los cambios en nucleótidos en el gen E2 sobre la replicación.

Se evaluó la capacidad replicativa de pLCR-AsAi, en presencia de p40-E1-AsAi y con los distintos pCG-E2 variantes sin observar cambios significativos entre estas variantes.

7. - DISCUSIÓN:

Para que una lesión positiva a VPH evolucione hasta un CaCU es indispensable que el paciente presente una infección persistente sin embargo esto no asegura que todas las lesiones positivas a VPH evolucionen hasta CaCU, ya que hoy en día es bien conocido la intervención de otros factores para que se desarrolle un CaCU, como por ejemplo: un estado inmunodeficiente, mala nutrición, desequilibrios hormonales, factores genéticos y epigenéticos desregulados del individuo (Knebel Doeberitz 2002), así como carga viral y mutaciones intra-tipo de VPH, las cuales intervienen como factores adicionales de riesgo que conllevan a un peor o mejor pronostico dentro del desarrollo del CaCU. Se propone que las mutaciones en nucleótidos de genes como E2, E6 y la “LCR” pueden alterar el comportamiento biológico de un mismo tipo viral. (Rose B, Thompson C, Zhang J, Stoeter M. 1997; Giannoudis A, Herrington CS. 2001,; De la Cruz-Hernández E, and col, 2005)

En este trabajo proponemos que las diferencias en capacidad de replicación entre variantes de VPH18 puede ser un factor adicional para el desarrollo de CaCU. Una replicación viral baja podría reflejarse en una progresión tumoral mucho más lenta que aquélla provocada por una replicación abundante, es decir, un menor número de partículas virales o carga viral, resultará en una menor cantidad de las proteínas oncogénicas E6 y E7. Estudios

previos han mostrado la importancia de la carga viral en el pronóstico de lesiones de cérvix causadas por VPH. (Broccolo F, Chiari S, Piana A, 2009; Flores R, et al, 2006; Xu Y, et al. 2009; Flores R, Beibei L, Nielson C, and col, 2008; Cheung JL, Cheung TH and col, 2009)

Como ya se sabe, las proteínas virales primordiales para que el genoma viral se replique son E1 y E2. E1 tiene un papel primordial en la replicación viral ya que se desempeña como Helicasa. La proteína E2 juega un papel muy importante sobre la replicación de manera indirecta, ya que sin E2, la proteína E1 no podría desarrollar su función por una ineficaz unión a su sitio de reconocimiento en el origen de replicación. (Hubert. 2005; Hiroaki Kasukawa, and col, 1998; Hubert, and col 1999; Hubert and Laimins, 2002).

Es así que cualquier cambio en secuencia de nucleótidos de alguno de los elementos involucrados en la replicación viral, “LCR”, E1 y E2, podrían alterar esta actividad.
De este modo en nuestro trabajo, evaluamos el efecto de las variaciones intratipo de los genes E1, E2 y la región LCR de VPH18 sobre la replicación. Se disectó el efecto de cada uno de estos elementos, sobre la actividad replicativa. Encontramos que los cambios en la LCR repercuten de manera significativa en el número de copias de los plásmidos probados, encontrándose la mayor actividad replicativa en pGl2-LCR AsAi que en los vectores con los componentes Europeo y Africano. Si bien probamos también el efecto de las variaciones en el gen E2, faltó por determinar el efecto de los cambios en E1, ya que por la dificultad que encontramos en amplificarlo de muestras tumorales, solo contamos con el gen E1-AsAi. A su vez, reconocemos la importancia de que representa el poder comparar la actividad replicativa evaluando cada una de las LCRs variantes con sus respectivos genes E1 y E2 correspondientes a la misma variante. Creemos que este los resultados de este análisis podrá otorgar información adicional del comportamiento de las variantes Europea, Asiática Amerindia y Africana de VPH18 en la historia natural de la infección.
E1 es el gen más conservado entre los distintos tipos de VPH (Van G. Wilson, Michael West, Kelly Woytek and Dandapani Rangasamy, 2002). Si bien la secuenciación del gen E1 de las variantes Europea, AsAi y Africana de VPH18 mostró diversos cambios a nivel de nucleótidos, en particular para la variante Africana, no fue sorpresivo que la mayoría de estos cambios resultaran en mutaciones silenciosas. Como se muestra en la tabla 6.1, el gen E1 de la variante Africana mostró solo 4 cambios en la secuencia de aproximadamente 625 aminoácidos; mientras que solo dos se encontraron en el gen E1 Europeo y estas mutaciones se presentan en el sitio de localización nuclear.

Se sabe que E1 interacciona con algunas proteínas celulares como por ejemplo Ciclina E y Cdk2, las cuales favorecen su fosforilación en ciertos aminoácidos, por lo regular residuos de serina los cuales son muy conservados entre varios tipos de Papilomavirus. Estos residuos de serina se encuentran en las posiciones; 89, 93 y 107, y su fosforilación es importante para que E1 pueda formar complejos con alguna otra proteína celular que favorezca su localización en núcleo, como por ejemplo p80. La unión entre E1 y p80 ha sido descrita como una de las más transcendentales para la localización nuclear de E1, ya que en modelos de VPH-11 se ha demostrado que la mayoría de la región amino terminal (aa 1 al 191) es necesaria para formar el complejo E1-p80 y localizar a E1 en núcleo, sin embargo en E1 de otros tipos virales como 16, 18 y 31, es más que suficiente la unión de p80 con E1 en una región que comprende del aa 1 al 170 del amino terminal. Por tal motivo aun cuando son pocas las mutaciones en la región amino terminal de E1, estas pudieran ser trascendentales para que su localización en núcleo. (Cote-Martin, and col, Feb. 2008)

De esta manera las mutaciones halladas en el gen E1 podrían ser cruciales para que la proteína pueda desarrollar su función en núcleo.

Otra mutación relevante fue la encontrada en el a.a. 602 de E1 africana (Asp/Glu) (Tabla 6.1 marcada en rojo). Esta posición es crítica en la interacción directa entre E1 y E2, como fue determinado por Eric A. Abbate y Col, (2006) y se observa en la figura 38.

Sin embargo, dado que el cambio de Asp por Glu en dicha posición conserva las características ácidas, podría no tener un significado biológico. (Abbate, and col 2006.)

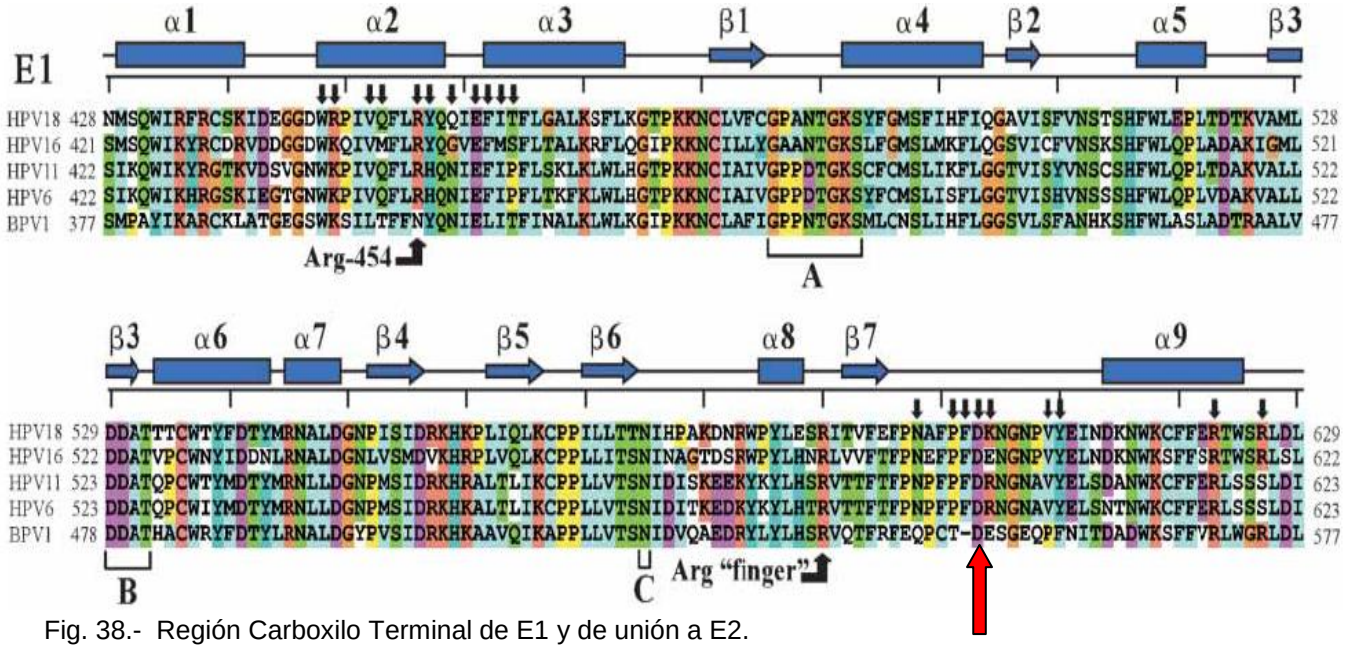


Fig. 38.- Región Carboxilo Terminal de E1 y de unión a E2.

Secuencia en aminoácidos de la proteína E1 de distintos VPH, incluido el tipo 18. En flechas negras superpuestas a la letra del aminoácido, se señalan aquellos aminoácidos que interactúan físicamente con la proteína E2. Con una flecha roja, se señala el aminoácido que ha sido mutado en la variante africana. En la parte superior de las secuencias, se muestra con un rectángulo en azul la estructura que conforman dichos aminoácidos, ya sea en α-helice o en laminas-β. (Abbate and col 2006).

Por otra parte, el gen E2 presenta mutaciones diversas en la región amino terminal, carboxilo terminal y región de bisagra. E2 variante africana es la que más cambios presenta con respecto a la variante europea, observándose inclusive una deleción de 3 aminoácidos en la región de bisagra (Tabla 5). Ninguno de los cambios en E2 observados en la variante Europea y Africana parece ocurrir en alguna de las zonas de interacción con E1 identificadas por Eric A. Abbate (2006), aun cuando ambas variantes presentan cambios en la región amino terminal, que es donde interactúa con la proteína E1

Tabla. 5.- Mutaciones identificadas por secuenciación en las variantes del gen E2 de VPH-18.

	Referencia		Europea		Africana	
Posición	Nucleótido	Aminoácido	Nucleótido	Aminoácido	Nucleótido	Aminoácido
3155	C	Cys 113	G	Trp 113		
3211	G	Cys 132			C	Ser 132
3217	C	Thr 134	A	Asn 134	A	Asn 134
3277	C	Ala 154	G	Gly 154		
3534	T	Tyr 240			C	His 240
3586	A	Lys 257			C	Thr 257
3593	T	His 259			G	Gln 259
3627	A	Thr 271			del	
3628	C				del	
3629	A				del	
3630	C	Pro 272	G	Ala 272	del	
3631	C				del	
3632	T				del	
3749	C	Asp 311			G	Glu 309
3757	G	Arg 314			A	Lys 312
3759	G	Asp 315			A	Asn 313
3792	G	Gly 326			T	Cys 324
3828	C	His 338			A	Asn 336

En esta tabla se muestran las mutaciones en E2, haciéndose hincapié en la variante africana que es la que mas mutaciones muestra y que es la única que presenta mutaciones en la región carboxilo terminal. (López Saavedra Alejandro, et al, en prensa.)

Como se puede observar en la tabla mostrada anteriormente, E2 variante africana es la que más cambios presenta con respecto a la variante europea. A pesar de que en la región amino terminal es donde interactúa con la proteína E1, las mutaciones que presentan

ambas variantes (europea y africana) no residen en sitios de interacción física entre ambas proteínas. (Abbate and col, 2006).

A continuación se presenta la región amino terminal de E2 y los aminoácidos que interactúan con la proteína E1.

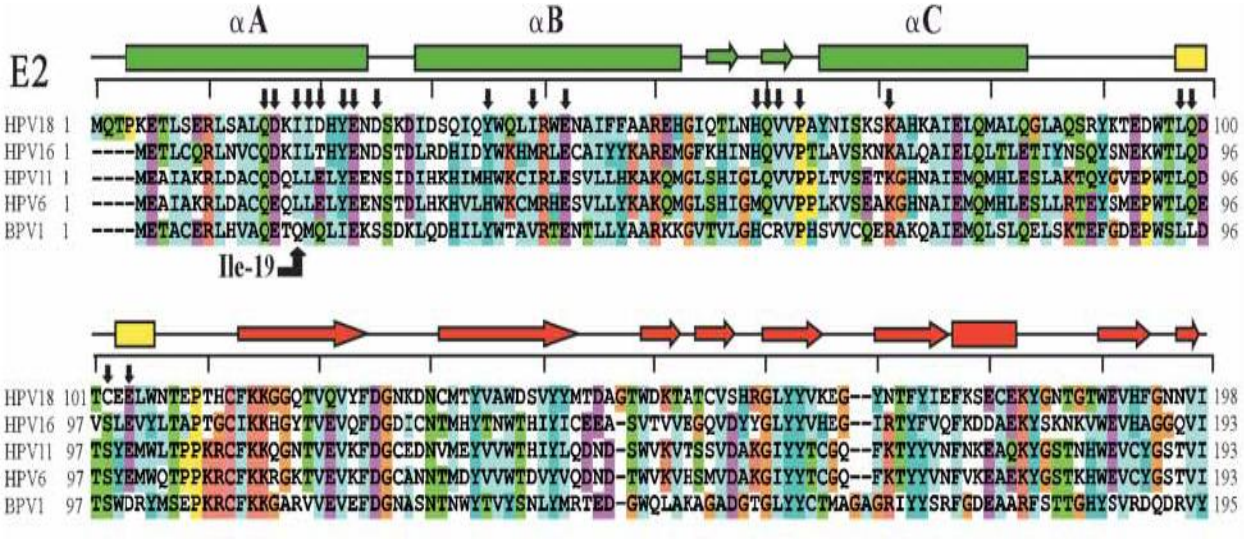


Fig. 39.- Región Amino Terminal de la proteína E2 y de unión con la proteína E1.

Secuencia en aminoácidos de la proteína E2 de distintos VPH, incluido el tipo 18. En flechas negras superpuestas a la letra del aminoácido, se señalan aquellos aminoácidos que interactúan físicamente con la proteína E1. (Eric A. Abbate, James M. Berger and Michael R. Botchan).

En tanto la región de unión a ADN de la proteína E2 de la variante africana presenta 5 mutaciones con respecto a la variante Asiático Americana, estos aminoácidos no residen en la región α-1 del carboxilo terminal, que es la región que interactúa con el ADN *(Hegde, 2002).* Nuestros resultados mostraron que las mutaciones en el gen E2 de las variantes de VPH18 no afectan significativamente la replicación. Sin embargo resulta necesario realizar la comparación entre el conjunto de cada variante con sus respectivos elementos virales (LCR, E2 y E1).

La evaluación del efecto de las mutaciones en la “LCR” arrojo datos muy significativos. Una replicación consistentemente menor se observó con las “LCR” Europea y Africana en relación con los niveles de replicación observados con la LCR de referencia (AsAi).

La región larga de control (“LCR”) se sabe que esta divida en regiones importantes, una región enhancer tejido específico que tienen numerosos sitios de unión a factores de transcripción, una región 3´ que contiene el promotor de los genes tempranos, así como el origen de replicación. Por su parte Walter G. Hubert y col, en un estudio con VPH-31

resaltan la importancia de otros sitios en la “LCR” los cuales tienen particularidades muy importantes con respecto a la transcripción y replicación viral. Ellos estudian diferentes regiones de la “LCR” y las denominan “AE” (Auxiliary enhancer) y “KE” (Keratinocyte enhancer), la zona “KE” es una zona que comprende una buena parte del enhancer y que abarca casi hasta el origen de replicación, es una zona muy importante para las funciones de replicación viral, ya que mutaciones dirigidas contra esta zona ocasionan abatimiento en los niveles de replicación en modelos con VPH-31. La zona “AE” también tiene sus particularidades, ya que es una zona necesaria para la correcta expresión de E1 y E2, por lo que está involucrada con mecanismos de transcripción viral, e indirectamente pero de manera muy sustancial estaría afectando la replicación, ya que disminuirían los niveles de proteínas importantísimas para la replicación. (Hubert, and col, 1999). (Ver tabla 6)

Al analizar estas zonas, pudimos observar que en la secuencia de la “LCR” de VPH-18 contiene mutaciones importantes en la zona “KE”. A continuación se muestran en la tabla 6, las mutaciones que presentan las “LCR” de variantes de VPH-18.

Tabla. 6.- Cambios en la región “KE” de la “LCR” de variantes de VPH-18.

NUCLEÓTIDO	Var. AsAi	Var. Europea	Var. Africana
7130	G	-	A
7152	A	-	G
7156	A	-	G
7161	C	-	T
7164	C	-	G
7185	C	-	T
7245	G	-	DEL.
7246	T	-	DEL.
7247	A	-	DEL.
7248	T	-	DEL.
7249	G	-	DEL.
7250	T	-	DEL.
7251	T	-	DEL.
7258	T	A	A
7323	A	-	G
7512	G	-	T
7529	C	A	-
7530	T	-	C
7563	G	-	A
7567	A	C	C
7592	T	C	C
7643	T	-	G
7651	T	-	C
7658	A	-	C
7670	A	T	T
7704	T	-	C
7726	C	-	T
7730	C	-	A
41	A	G	-
92	A	-	G
104	T	C	-

Zona equivalente a “KE” de VPH-31

Origen de Replicación

Se muestran las mutaciones en la “LCR” de las variantes de VPH-18, así como también se identifican cuales de ellas se encuentran dentro de la zona denominada “KE” y con una flecha en rojo se marca una mutación hallada dentro del origen de replicación.

Se puede apreciar en la tabla anterior algo realmente importante, que a pesar de que la variante africana presenta muchas más mutaciones que la variante europea, ambas variantes presentan mutaciones en la región “KE”, incluso casi la totalidad de las mutaciones de la variante europea residen en la región “KE” la cual está implicada directamente con la replicación viral. Esto es de suma importancia, ya que uno podría esperar que la “LCR” variante africana que es la que más mutaciones presenta, inclusive le falta una pequeña región de 7 bases como se puede observar en la tabla, sea la que menor replicación presente de las 3 variantes. Sin embargo entre variantes Europea y Africana no hay significancia en sus niveles de replicación. Esto podría explicarse si dicho efecto se debiera en su mayoría a los cambios en KE compartidos entre dichas variantes.

Los resultados obtenidos de modelos como el presente, deben sustentarse con datos que hoy en día nos arroja la epidemiología molecular de infecciones por VPH. Se conoce que dentro de la estadística de infecciones por VPH-18, este tipo viral ocupa el segundo lugar en frecuencia en casos de CaCU. Los casos positivos con VPH-18 en pacientes con neoplasias ó con CaCU tienen algunas variaciones en cuanto a la distribución de las variantes de VPH-18, ya que lesiones premalignas o de bajo grado, la variante que aparece en mayor proporción es la Africana. En cambió en pacientes con CaCU la variante Europea es la más frecuente; en tanto que la variante Asiático-Amerindia es la menos frecuente en todas las etapas (Lizano M, and Col, 2006).

Para entender la importancia de las variaciones intra-tipo en el comportamiento biológico de las variantes de VPH18, es necesario integrar a estos resultados los que se obtengan del análisis de replicación de cada variante con sus elementos respectivos; así como del análisis funcional de otras regiones virales implicadas en oncogenicidad.

Este trabajo aporta herramientas para entender por qué dentro de la historia natural de infecciones por el mismo tipo de VPH, algunas lesiones progresan más rápido que otras o evolucionan de distinta manera.

8. – CONCLUSIONES:

- La secuencia del gen E1 de variantes de VPH-18, muestra que son pocas las mutaciones tanto en variante Africana y Europea con respecto a la Asiático-Americana, sin embargo las mutaciones encontradas en la región de localización nuclear podrían ser importantes en la replicación.

- Las variaciones en nucleótidos en la “LCR” de variantes europeas y africana repercuten significativamente en una disminución en la actividad de replicación a comparación de la variante de referencia.

- Las mutaciones en el gen E2 de las distintas variantes de VPH-18, no traen consigo diferencias significativas en los niveles de replicación.

9. - REFERENCIAS:

- A survey of VPH variants. Database of VPH. (http://hpv-web.lanl.gov). 1996.
- Abbate E, Berger J and Botchan M. The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. Genes & Dev 2004.18:1981–1996.
- Angeline M, Merle and Moroianu J. 2003. The E7 oncoprotein of high-risk human papillomavirus type 16 enters the nucleus via nonclassical Ran-dependent pathway. Virology, 317, pp. 13-23.
- Anitra S. Auster and Tor L.J. The DNA-binding Domain of Human Papillomavirus Type 18 E1. J. Biol Chem. of January 2004, pp. 3733–3742, Vol. 279, No. 5, Issue
- BASE DE DATOS, SSA, 2006.
- Becker K, Florin L, Sapp C and Sapp M. Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization. Virol, 2003., Vol. 314, pp. 161-167.
- Broccolo F, Chiari S, Piana A, Castiglia P, Dell'Anna T, Garcia-Parra R, Maneo A, Villa A, Leone EB, Perego P, Maida A, Mangioni C, Cocuzza CE. Prevalence and viral load oncogenic human papillomavirus types associated with cervical carcinoma in a population of North Italy. J. Med. Virol. 2009 Feb; 81 (2): 278-87.
- Burd E. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. C. Microbiol. Rev, 2003. Vol. 16. pp. 1-17.
- Cartin and Alonso A.. The Human Papillomavirus VPH 2a E5 Protein Localizes to the Golgi apparatus and modulates signal transduction. Virol, 2003, 314, pp. 572-579.
- Cheung JL, Cheung TH, Ng CW, Yu MY, Wong MC, Siu SS, Yim SF, Chan PK. Analysis of human papillomavirus type 18 load and integration status from low-grade cervical lesion to invasive cervical cancer. J. Clin. Microbiol. 2009, Feb;47(2): 287-93.
- Ciaran B. J. Woodman, Stuart I. Collins and Lawrence S. Young. The natural history of cervical HPV infection: Nat Rev Can. January, 2007 Vol. 7.
- Coˆte´-Martin A, Moody C, Fradet-Turcotte A, D'Abramo C, Lehoux M, Joubert S, Poirier G, Coulombe B, Laimins L, and Archambault. J. Human Papillomavirus E1 Helicase Interacts with the WD Repeat Protein p80 To Promote Maintenance of the Viral Genome in Keratinocytes. J. Virol, Feb. 2008, p. 1271–1283. Vol.82, No. 3
- Dang C, Lewis B, Dolde C, Dang G, and Shim H. Oncogenes in Tumor Metabolism, Tumorigenesis, and Apoptosis. J. Bioenerg. and Biomem, 1997, Vol. 29, No. 4,.
- Davy C, Jackson D, Wang Q, Raj K. Identification of a G_2 Arrest domain in the E1^E4 Protein of Human Papillomavirus type 16. J. of Virol. 2002. Vol. 76, No. 19. pp. 9806-9818.
- De la Cruz-Hernández E, García-Carranca A, Mohar-Betancourt A, Dueñas-González A, Contreras-Paredes A, Pérez-Cárdenas E, Herrera-Goepfert R and Lizano-Soberón. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. J. of G. Virol (2005), 86, 2459–2468
- De la Cruz-Hernandez, Lizano M, Carrillo-García A, García Carrancá, Ponce de León-Rosales S, Dueñas-Gonzalez A, Hernandez-Hernandez 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 Aug;102(2):230-5.

- Demeret C, Goyat S, Yaniv M, and Thierry F. The Human Papillomavirus Type 18 (HPV18) Replication Protein E1 Is a Transcriptional Activator When Interacting with HPV18 E2. Virol. 1998.242, 378–386
- Demeret C, Le Moal M, Yaniv M and Thierry F. Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. Nucl. A. Res, 1995, Vol. 23, No. 23 4777-4784
- Eifel MD, Levenback MD, BC Decker American Cancer Society; Atlas of Clinical Oncology; Cancer of the female lower genital tract. Inc. 2001, Hamilton London.
- Eriksson A, Herron J, Yamada T and Wheeler C.M. Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. J. of G. virol. 1999. Vol. 80, pp. 585-590.
- Ewan R. Taylor and Iain M. Morgan. A novel technique with enhanced detection and quantitation of HPV-16 E1- and E2-mediated DNA replication. Virol. 315 (2003) 103–109.
- Flores R, Beibei L, Nielson C, Abrahamsen M, Wolf K, Lee JH, Harris RB, Giuliano AR. Correlates of human papillomavirus viral load with infection site in asymptomatic men. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2008 Dec; 17(12):3573-6.
- Flores R, Papenfuss M, Klimecki WT, Giuliano AR. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. Int. J. Cancer. 2006. Mar 1;118(5):1187-93.
- Giannoudis A, Herrington CS. (2001). Human Papillomavirus variants and spuamous neoplasia of the cervix. J. Pathol; 193 (3): 295-302, Departament of Pathology, Royal Liverpool University Hospital.
- Harro CD, Pang YY, Roden RB et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. J Natl Cancer Inst 2001;93:284—92.
- Hegde R and Androphy E, Crystal Structure of the E2 DNA-binding Domain from Human Papillomavirus Type 16: Implications for its DNA Binding-site Selection Mechanism. J. Mol. Biol. (1998) 284, 1479-1489.
- Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, and Kenneth Raj. Different Modes of Human Papillomavirus DNA Replication during Maintenance. J. of Virol, May 2006, p. 4431–4439 Vol. 80, No. 9.
- Hubert W.G, Kanaya T, and Laimins L. DNA Replication of Human Papillomavirus Type 31 Is Modulated by Elements of the Upstream Regulatory Region That Lie 5' of the Minimal Origin. J. of Virol, Mar. 1999, p. 1835–1845.
- Hubert W.G. Variant Upstream Regulatory Region Sequences Differentially Regulate Human Papillomavirus Type 16 DNA Replication throughout the Viral Life Cycle. J. of Virol, May 2005, p. 5914–5922 Vol. 79, No. 10.
- Jason H. Bielas and Lawrence A. Loeb. Mutator Phenotype in Cancer: Timing and Perspectives. Environmental and Molecular Mutagenesis 45:206-213, 2005.
- Jiménez García L F, Merchant Larios H. Biología celular y molecular. Prentice Hall, 1ª edición, 2003. Pág. 663-675.

- Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler C.M. and Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. J. of G. Virol. 2000. Vol. 81, pp. 1975-1981.
- Kasukawa H, Howley P, and Benson J. A Fifteen-Amino-Acid Peptide Inhibits Human Papillomavirus E1-E2 Interaction and Human Papillomavirus DNA Replication In Vitro. J. of Virol, Oct. 1998, p. 8166–8173.
- Kawana K, Yasugi T, Kanda T et al. Safety and immunogenicity of a peptide containing the cross neutralization epitope of HPV16 L2 administered nasally in healthy volunteers. Vaccine 2003;21:4256—60.
- Kessis T, Slebos R, Nelson W. 1993. Human Papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53 – mediated cellular response to DNA damage. Medical Sciences. Vol. 90, pp. 3988-3992.
- Krista L. Conger, Jen-Sing Liu, Shu-Ru Kuo, Louise T. Chow, and Teresa S.-F. Wang. Human Papillomavirus DNA Replication. The J. of Biol. Chem. Vol. 274, January 1999. No. 5, Issue of, pp. 2696–2705.
- Lai M, Heong The M and Tarn W. A Human Papillomavirus E2 Transcriptional Activador. J. of Biol. Chem. 1999. Vol. 274. No. 17. pp. 11832-11841.
- López Saavedra A., Lizano Soberón M, González Maya L, Ponce de León S, García Carrancá A, Mohar Betancourt A. Functional implication of sequence variation in the LCR and E2 gene among HPV-18 variants. Arch. Virol. En prensa.
- Maniatis, and col. Molecular Cloning: A laboratory manual, 2da edición, 1989.
- Mark A. Valasek and Joyce J. Repa. The power of real-time PCR. Advan Physiol Educ 2005. 29:151-159,
- Mc Murray H.R., Nguyen D, Westbrook T. F. and Mcance D. J.. 2000. Biology of human papillomavirus. Journal of experimental pathology. Vol. 82. pp. 15-33.
- McBride A and Myers G. 1996. The E2 Proteins. Laboratory of Viral Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes.
- Modis Y, Benes L. Trus and. Harrison C. Atomic model of the papilomavirus capsid. The E. J. 2002. Vol. 21 No. 18. pp. 4754-4762.
- Morgan IM, Taylor ER. Detection and quantitation of HPV DNA replication by Southern blotting and real-time PCR. Methods Mol Med. 2005;119:349-62.
- Mügner K, McLaughlin-Drubin M.E. The human papillomavirus E7 oncoprotein. Virol, 2009, Feb 20;384(2):335-44
- Mugner K, Baldwin A, Edwards K, et al. 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. Journal of virology. Vol 78. pp. 11451-11460.
- Nakahara T, Nishimura A, Tanaka M. 2002. Modulation of the Cell Division Cycle by Human Papillomavirus type 18 E4. Journal of Virology. Vol 76, No. 21. pp. 10914-10920.
- New vaccines, Inmunnisation Handbook 2006, Chapter 19. Pp. 351-358
- Ong C, Chan S, Campo S, Fujinaga K, Mavromara-nazos P, Labropoulou V, Pfister, Tay S, Meulen J, Villa L, and Ulrich Bernardi. Evolution of Human Papillomavirus Type 18: an Ancient Phylogenetic

Root in Africa and Intratype Diversity Reflect Coevolution with Human Ethnic Groups. J. Virol, Nov. 1993, p. 6424-6431. Vol. 67, No. 11.

- Parish J, Anna Kowalczyk, Hsin-Tien Chen, Geraldine E. Roeder,1 Richard Sessions, Malcolm Buckle,2 and Kevin Gaston1. 2006, E2 Proteins from High- and Low-Risk Human Papillomavirus Types Differ in Their Ability To Bind p53 and Induce Apoptotic Cell Death. J. of Virol, May 2006, p. 4580–4590.
- Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. Nat, May, 2001. Vol. 411,
- Rapp L, Chen J.J. 1998. The papillomavirus E6 proteins. Biochimica et Biophysica acta. 1378, pp. f1-f19.
- Rashmi S. Hegde, The Papillomavirus E2 Proteins: Structure, Function, and Biology. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2002. 31:343–60
- Reinstein E, Scheffner M, Oren M and Schwartz A. 2000. Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. Oncogen Vol. 19, pp. 5944-5950.
- Remm M, Remm A and Ustav M. 1999. Human Papillomavirus type 18 E1 protein is translated from polycistronic mRNA by a discontinuous scanning mechanism. Journal of Virology. Vol. 73. pp 3062-3070.
- Rose B, Thompson C, Zhang J, Stoeter M. 1997. Sequence Variation in the Upstream Regulatory Region of VPH 18 Isolates from Cervical Cancers. Gynecologic Oncology. Vol. 66, pp. 282-289.
- Sophie Bellanger, Stéphanie Blachon, Francisca Mechali, Catherine Bonne-Andrea, Françoise Thierry. High-Risk but not Low-Risk HPV E2 Proteins Bind to the APC Activators Cdh1 and Cdc20 and Cause Genomic Instability. Cell Cycle 4:11, 1608-1615, November 2005.
- Stubenrauch F and Laimins LA. 1999. Human Papillomavirus life cycle: active and latent phases. Cancer Biology. Vol. 9. pp. 379-386.
- Stubenraunch F, Zobel T and Iftner T. 2001. The E8 Domain Confers a Novel Long-Distance Transcriptional Repression Activity on the E8ˆE2C Protein of High-Risk Human Papillomavirus Type 31. Journal of Virology. Vol. 75, No 9, pp. 4139-4149.
- Tjalma WAA, Arbyn M, Paavonen J, Van Waes TR, Bogers JJ. 2004. Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer. Int J Gynecol Cancer 2004;14:751—761.
- Ulrich Bernard H. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. The J. of Clin. Virol. 2005. 32S. S1-S6.
- Van G. Wilson, Michael West, Kelly Woytek and Dandapani Rangasamy. Papillomavirus E1 proteins: Form, Function, and Features. Virus Genes 24:3, 275-290, 2002.
- Veldman T, Liu X, Yuang H and Schlegel R. 2003. Human papilomavirus E6 and Myc Proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. Biochemistry. Vol. 100, No 14, pp. 8211-8216.
- Von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. Eur J Cancer. 2002 Nov;38(17):2229-42.

- Waggoner S. 2003. The Lancet. Vol. 361: 2217-2225. Cervical Cancer. Section of Gynecologic Oncology, University Hospitals of Cleveland.
- Walter G. Hubert1 and Laimonis A. Laimins. 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. of Virol, Mar. 2002, p. 2263–2273, Vol. 76, No. 5.
- Xiao, J.H.,Davidson, I., Matthes, H., Garnier, J-M and Chambon, P. 1991 Cell 65, 551-568
- Xu Y, Dotto J, Hui Y, Lawton K, Schofield K, Hui P. High grade cervical intraepithelial neoplasia and viral load of high-risk of human papillomavirus: significant correlations in patiens of 22 years old or younger. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2009;2(2):169-75.
- Zhang B, li P, Wang Z, Brahmi Z, 2003. The E5 protein of human Papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-γ.Virology, 310, pp. 100-108.
- Zheng Z-M, Baker CC. (2006). NIH public Access. Front Biosci. ; 11: 2286-2302.
- Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application, 2002. Nat. 342-350.