



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO BIOLÓGICO DEL PRODUCTO E6*I DEL
VPH 18 EN PROLIFERACIÓN CELULAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JOSÉ FERNANDO HERNÁNDEZ VALENCIA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN**

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del Alumno

Hernández
Valencia
José Fernando
54 25 80 70
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
301140867

2. Datos del Tutor

Dra.
Marcela
Lizano
Soberón

3. Datos del Sinodal 1

Dra.
Ramos
Morales
Patricia

4. Datos del Sinodal 2

Dra.
Segura
Valdez
María de Lourdes

5. Datos del Sinodal 3

Dra.
Contreras
Paredes
Adriana

6. Datos del Sinodal 4

M. en C.
Hernández
Hernández
Enrique

7. Datos del trabajo escrito

Efecto biológico del producto E6*I del VPH 18 en proliferación celular
60 pp
2010



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

D G A C

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Efecto biológico del producto E6*1 del VPH 18 en proliferación celular

realizado por **Hernández Valencia José Fernando** con número de cuenta **3-0114086-7** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Patricia Ramos Morales

Propietario Dra. María de Lourdes Segura Valdez

Propietario Dra. Marcela Lizano Soberón

Tutora

Suplente Dra. Adriana Contreras Paredes

Suplente M. en C. Enrique Hernández Hernández

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, D. F., a 21 de mayo de 2010

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.
'nlm.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a la directora de esta tesis, Dra. Marcela Lizano Soberón, por el apoyo, paciencia y dedicación a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas, y por demostrarme que se puede ser un investigador de alto nivel sin dejar de ser una extraordinaria persona. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a este laboratorio.

- ❖ A la Dra. Adriana Contreras Paredes, por brindarme su tiempo para revisar, construir y mejorar esta tesis. Además, por su valiosa amistad y por compartirme sus amplios conocimientos científicos.

- ❖ Al Dr. Alejandro Mohar Betancourt, por su apoyo para la realización de este trabajo.

- ❖ A las Dras. Patricia Ramos Morales, María de Lourdes Segura Valdez y al Ma. en C. Enrique Hernández Hernández, por sus valiosos comentarios y aportaciones.

- ❖ Al Instituto Nacional de Cancerología y la Facultad de Ciencias, por darme las herramientas necesarias para mi formación profesional.

**Esta tesis fue realizada en el Instituto Nacional de Cancerología en la Subdirección de
Investigación Básica**

**La elaboración de este trabajo fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y
Tecnología (CONACYT), clave del proyecto 60722**

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras tantas en mis recuerdos.

A mis padres Remedios y Fernando:

∫ Gracias, por la oportunidad de existir, por su sacrificio, por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza, por su amor incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi carrera profesional.

A mis hermanos, Maribel, Elizabeth e Isaac:

∫ Con quienes compartí una infancia inmersa en un mundo de fantasía. Gracias por su cariño y ayuda en cada paso que doy. Que aunque digan que soy malo, saben que siempre estaré con ustedes en las buenas y en las malas. Los amo.

A mis hermanos postizos:

∫ Adrián y Berna, por esos momentos únicos y maravillosos que hemos pasado juntos. Gracias por brindarle tantas atenciones a mi familia, y por la especial amistad que nos une, la cual, seguramente jamás desaparecerá.

A Mariana:

∫ Porque eres de esa clase de personas que todo lo comprenden y dan lo mejor de si mismas sin esperar nada a cambio. Porque sabes escuchar y brindar ayuda cuando es necesario, y porque te has ganado el cariño, admiración y respeto del todo el que te conoce. Gracias por tu incondicional apoyo durante toda mi carrera, y por ser piedra angular de mi vida.

Adry y Carlos:

∫ Por brindarnos la oportunidad y la confianza de formar parte importante de su familia. A Jime y Valentina, que espero algún día lean esta dedicatoria, y si gustan, la tesis, aunque les parezca aburrida en principio.

❖ A todos mis amigos, sin excluir alguno, pero en especial a: Maribuchis, Clao, Jorge, Laura, Milka, Bere, Víctor, Mirna, Rafa, Charles, Dulce y Aris, mil gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos y porque han estado conmigo siempre, aunque sea solo para dar lata y molestar, jajajajaja. Los quiero mucho.

- ❖ Así mismo, agradezco a mis compañeros de laboratorio, Héctor, Fredy, Adela, Vero, Adriana, Ime, Mariana, Joaquín, Elenaé, Martha y Saida. Quienes conforman un equipo extraordinario, y cuyas enseñanzas han contribuido en gran medida a mi formación profesional y a la culminación de esta tesis.

*Esta tesis está dedicada
especialmente
a la memoria de mis abuelos,
Dolores y Lupe, y a la entrañable “tía Malú”*

*“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no
podrá comprender su tiranía.” Frankenstein. Mary Shelley*

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| ANTECEDENTES | |
| <i>1. El cáncer cervicouterino</i> | 2 |
| 1.1 Epidemiología | 3 |
| 1.2 Relación entre el VPH y el CaCu: historia | 3 |
| 1.3 Estructura del cuello uterino | 5 |
| 1.4 Clasificación de los papilomavirus | 6 |
| <i>2. Historia Natural del Cáncer Cervical</i> | 7 |
| <i>3. Biología molecular del VPH</i> | 9 |
| 3.1 Características generales | 9 |
| 3.2 Genoma viral | 9 |
| 3.2.1 Región larga de control (LCR) | 11 |
| 3.2.2 Las proteínas L1 y L2 | 12 |
| 3.2.3 Proteína E1 | 13 |
| 3.2.4 Proteína E2 | 13 |
| 3.2.5 Proteína E4 | 15 |
| 3.2.6 Proteína E5 | 15 |
| 3.2.7 Proteína E8^E2 | 16 |
| 3.2.8 Proteína E7 | 16 |
| 3.2.9 Proteína E6 | 17 |
| 3.2.9.1 Interacciones entre E6 del VPH y p53 | 19 |
| 3.2.9.2 Interacciones de E6 con otras proteínas celulares | 20 |
| <i>4. Productos E6*</i> | 21 |
| 4.1 E6*I del VPH 18 | 22 |
| <i>5. Ciclo viral</i> | 25 |
| 5.1 Infección y desensamble del virión | 26 |
| 5.2 Mantenimiento del genoma | 26 |
| 5.3 Fase proliferativa | 26 |
| 5.4 Amplificación del genoma | 26 |
| 5.5 Ensamble del virus y liberación | 26 |
| 5.6 Infección abortiva | 26 |
| JUSTIFICACIÓN | 28 |
| HIPÓTESIS | 29 |
| OBJETIVOS | 29 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | |
| 1 Líneas celulares y cultivo celular | 30 |

| | |
|---|----|
| 2 Purificación del fragmento E6*I y clonación en un vector de expresión | 30 |
| 3 Competencia bacteriana | 32 |
| 4 Transformación de células competentes con los productos de ligación | 32 |
| 5 Selección, amplificación y purificación del ADN de plásmido | 32 |
| 6 Transfecciones | 33 |
| 7 Análisis de la expresión del gen E6*I en las células MCF-7 | 34 |
| 8 Evaluación de viabilidad celular por cristal violeta | 34 |
| 9 Evaluación de proliferación celular por citometría de flujo | 35 |
| 10 Ensayo de TUNEL para células apoptóticas | 37 |
| 11 Análisis estadístico | 39 |
| RESULTADOS | |
| 1 Clonación del gen E6*I en el vector de expresión pcDNA 3.1 | 40 |
| 2 Análisis de la expresión del producto E6*I de las líneas celulares | 40 |
| 3 E6*I del VPH 18 disminuye significativamente la densidad celular sin la participación de la proteína E6 | 41 |
| 4 E6*I induce un aumento en la subfase G ₀ en células MCF7 | 43 |
| 5 E6*I del VPH 18 induce apoptosis en células MCF7 y HaCaT | 45 |
| DISCUSIÓN | 49 |
| CONCLUSIONES | 54 |
| REFERENCIAS | 55 |

FIGURAS

Figura 1. Mortalidad en mujeres por cáncer en México para el año 2002

Figura 2. Fotomicrografía de la unión escamo-columnar

Figura 3. Historia natural del CaCu

Figura 4. Diagrama esquemático de la cápside del papiloma

Figura 5. Organización del genoma del Virus del Papiloma Humano

Figura 6. Esquema de la región larga de control

Figura 7. Reconstrucción en 3D de la cápside viral conformada por L1 y L2

Figura 8. Estructura de E2

Figura 9. Estructura de la proteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16)

Figura 10. Diagrama esquemático que muestra la estructura de los dedos de zinc de las proteínas E6 del VPH-18.

Figura 11. Proteínas celulares con las que interactúa la oncoproteínas E6 de los papilomavirus de alto riesgo

Figura 12. Procesamiento alternativo que conlleva la generación de los transcritos E7, E6 y E6*

Figura 13. Esquema de la proteína E6*I del VPH 18

Figura 14. Ciclo del VPH en el epitelio estratificado

Figura 15. Vectores de expresión plasmídicos

Figura 16. Principio general de la citometría de flujo

Figura 17. Marcaje mediante el ensayo de TUNEL de la cromatina degradada

Figura 18. Digestión del plásmido pcDNA 3.1 con el gen E6*I clonado

Figura 19. Análisis de la expresión del mRNA de E6*I (313 pb) en células MCF7

Figura 20. Viabilidad celular de la línea MCF7 transfectada establemente con el vector pcDNA 3.1 vacío y con pcDNA 3.1/E6*I a las 24, 48 y 72 horas

Figura 21. Viabilidad de las células HaCaT transfectadas transitoriamente con el vector pXJ 40 FT (p40) y con pXJ 40 FT-E6*I

Figura 22. La expresión de E6*I promueve un incremento en la subfase G₀ que indica un proceso de muerte celular

Figura 23. Ensayo de apoptosis en células MCF7

Figura 24. Porcentaje de células MCF7 apoptóticas evaluadas por la técnica de TUNEL

Figura 25. Ensayo de TUNEL en células HaCaT-pXJ 40 FT

Figura 26. Porcentaje de células HaCaT en estado apoptótico evaluadas por la técnica de TUNEL

CUADROS

Cuadro 1. Tipos de VPHs y su asociación a un potencial oncogénico

Cuadro 2. Principales funciones de las proteínas tempranas y tardías del VPH

Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de E6*I de VPH 18

Cuadro 4. Porcentajes de células MCF7 transfectadas establemente (con E6*I, E6 variante Europea y pcDNA) en cada fase del ciclo celular

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| CaCu | Cáncer cervicouterino |
| VPH | Virus del papiloma humano |
| VPB | Virus del papiloma bovino |
| UEC | Unión escamo-columnar |
| VPH-AR | Virus del papiloma humano de alto riesgo |
| VPH-BR | Virus del papiloma humano de bajo riesgo |
| E | Europea |
| A | Asiática |
| AA | Asiática-Americana |
| Af-1 | Africana-1 |
| Af-2 | Africana-2 |
| AsAi | Asiática-Amerindia |
| ICTV | Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus |
| LCR | Región larga de control |
| E2TAD | Dominio de transactivación |
| PKC | Proteína cinasa C |
| PKA | Proteína cinasa A |
| E6 AP | Proteína Celular Asociada a E6 AP |
| CMV | Citomegalovirus |
| TUNEL | Marcación de Cortes Terminales con dUTP-biotinilada (desoxiuridina trifosfato) mediada por la polimerasa desoxittransferasa terminal (TdT) |

RESUMEN

La infección persistente con el Virus del papiloma Humano (**VPH**), actualmente se considera como una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de cáncer cervicouterino. Los VPH de alto riesgo deben su carácter oncogénico principalmente a la capacidad transformante de las proteínas **E6** y **E7**. Estas oncoproteínas, pueden establecer interacciones directas con las proteínas celulares **p53** y **pRb** respectivamente. Uno de los blancos celulares más estudiados de la oncoproteína E6 es la proteína supresora de tumores p53. Esta interacción da como resultado, la degradación de p53 a través de la vía proteolítica de la ubiquitina y pérdida de un punto de control del ciclo celular en la fase G1, así como la inhibición de apoptosis. El gen E6, presenta un procesamiento alternativo o splicing que da lugar a transcritos de una longitud menor. Entre los polipéptidos que potencialmente se generan se encuentran cuatro proteínas truncadas del gen E6, llamadas **E6* I-IV**. Se ha demostrado que la expresión ectópica de la proteína E6*I del VPH 18 ejerce un efecto antiproliferativo en células de tumores de cérvix positivas a VPH, atribuido a la capacidad de E6*I de inhibir la degradación que la proteína E6 de longitud completa ejerce sobre p53.

A la fecha, no se conoce claramente el efecto biológico de E6*I de VPH 18. Por lo tanto, resulta importante determinar las funciones que esta proteína tiene sobre distintos procesos celulares, con el fin de entender el proceso carcinogénico inducido por el VPH.

A través de ensayos de viabilidad celular por cristal violeta, se determinó que la expresión de E6*I de VPH 18, disminuye la viabilidad celular significativamente, en ausencia de la oncoproteína E6 completa. Además, E6*I indujo un aumento en el número de células en la fase subG₀ del ciclo celular, indicando la existencia de muerte celular. Finalmente los ensayos de TUNEL, mostraron la presencia de un mayor porcentaje de células apoptóticas en las líneas MCF7 y HaCaT transfectadas con E6*I, en ausencia de E6 completo.

En el presente trabajo, se demostró el papel pro-apoptótico de E6*I en líneas celulares carentes del genoma del VPH, MCF7 y HaCaT.

ANTECEDENTES

Cáncer

En el lenguaje médico habitual, las neoplasias suelen denominarse tumores y del estudio de los tumores se encarga la oncología. En oncología es importante dividir las neoplasias en benignas y malignas, una división que se basa en un juicio sobre el comportamiento clínico potencial de cada tumor. Se dice que un tumor es benigno cuando éste es localizado, carente de una capacidad de propagación e invasión de otras regiones del organismo, y que en general, puede curarse mediante una extirpación quirúrgica local. A los tumores malignos se les denomina cáncer, palabra que deriva del vocablo latino *cangrejo*, ya que se adhieren de forma obstinada a lo que agarran, de manera parecida a un cangrejo (1).

El cáncer es un conjunto de enfermedades, caracterizadas por la proliferación rápida de células que crecen más allá de sus límites normales, y que son capaces de invadir zonas adyacentes del organismo o diseminarse a otros órganos por medio de un proceso denominado metástasis (2).

El cáncer representa un problema de salud pública, siendo la primera causa de mortalidad a nivel mundial; se le atribuyen 7.9 millones de defunciones (cerca del 13% del total de las defunciones) ocurridas en 2007. Aproximadamente el 72% de las defunciones ocurridas en ese año se registraron en países en vías de desarrollo, donde las fuentes disponibles para la prevención, diagnóstico y tratamiento para el cáncer son limitadas o inexistentes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 12 millones en 2030 (3).

Sin embargo, aun más angustiosos que la tasa de mortalidad, lo son el sufrimiento físico y emocional ocasionado por las neoplasias, tanto a quienes las padecen, como a familiares y amigos del paciente.

1. El cáncer cervicouterino

1.1 Epidemiología

A nivel mundial, el cáncer cervicouterino (**CaCu**), es el segundo cáncer más frecuente en la mujer. La mayoría de los casos ocurren en países subdesarrollados, donde se suscitan el 80% de los mismos. Cada año se diagnostican cerca de 500 000 nuevos casos, de los cuales, 288 000 son defunciones, lo que ubica a esta enfermedad como la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en el mundo (4).

En México, desafortunadamente, el CaCu sigue representando un problema de salud pública. En el año 2002, se presentaron 12 512 nuevos casos, de los que 5 777, el 46%, fueron decesos. En la figura 1 se muestra el número de muertes debidas a CaCu y a otros tipos de cánceres (4).

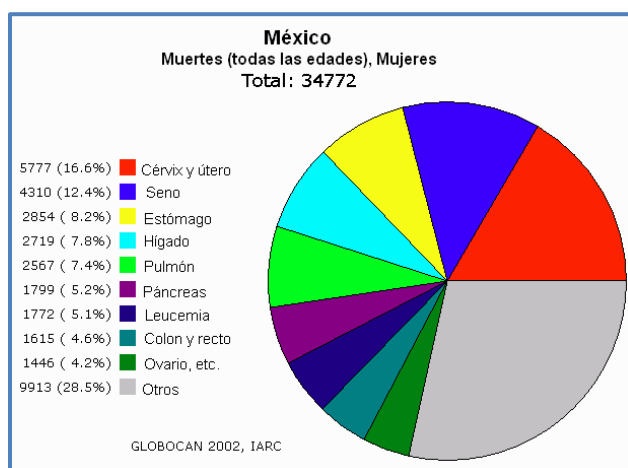


Figura 1. Mortalidad en mujeres por cáncer en México para el año 2002. El 16.6 % de los decesos por cáncer corresponden a cáncer cervicouterino. Fuente: GLOBOCAN 2002 (5).

Cifras emitidas por la Secretaría de Salud Pública (SSP), indican que en el 2007, se presentaron 4 046 muertes de mujeres por cáncer cervicouterino, lo que mantiene a esta neoplasia maligna como la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en México, puesto que el primer lugar fue ocupado por el cáncer de mama, con 4 609 defunciones (6).

1.2 Relación entre el VPH y el CaCu: historia

Uno de los descubrimientos más importantes en la investigación etiológica del cáncer, ha sido la demostración de que la mayoría de los casos de cáncer cervicouterino (99,8%) se deben a

una infección persistente por el virus del **papiloma humano (VPH) (7)**. Cuya infección, también se relaciona con el desarrollo de otros carcinomas ano genitales, incluyendo: de pene, vagina, vulva y ano. Así mismo, pueden ocasionar lesiones en la cavidad oral, orofaringe, laringe y esófago **(8)**.

Pero, ¿cómo es que se logró demostrar lo antes mencionado? Para aclararlo, hay que retroceder un poco más de un siglo en el tiempo, e ir leyendo la forma en la que se fue desarrollando no solo el campo de la investigación relacionada a los papilomavirus, sino también el de la Biología Molecular y Celular.

En 1845, surge uno de los primeros reportes de transmisión de verrugas en humanos, gracias a un accidente ocurrido a un fabricante de velas de cera, que mientras estaba removiendo un condiloma acicular, sufrió una lesión debajo de la uña. Tiempo después en el lugar de la lesión, apareció una verruga, que luego de destruirla repetidamente reaparecía, y desapareció sólo hasta que la uña fue finalmente removida. En otro experimento, Ullmann inoculó extractos de papilomas laríngeos en heridas hechas por él mismo en su brazo, 9 meses después una verruga brotó en el sitio de inoculación. A partir de entonces, la investigación de los papilomavirus ha pasado por diferentes etapas **(9)**.

En el año de 1935, Rous y Beard mostraron que extractos de papilomas cutáneos originados en conejos de cola de algodón, podían inducir lesiones con potencial maligno en otros conejos de su misma especie y en conejos domésticos. Aunque las investigaciones de los 30s y 40s se limitaron a estudios *in vivo*, muchos de los principios de la biología de los papillomavirus fueron establecidos durante este periodo. **(10)**.

El estudio de los papilomavirus, irrumpió de nuevo en 1959, cuando se observó que el virus de papiloma bovino **(VPB)** inducía tumores malignos en animales, y por supuesto, con el advenimiento de la clonación molecular en la década de 1970, pues gracias a esta revolución técnica y tecnológica, se produjo una disposición ilimitada de los genomas virales silvestres y mutantes, haciendo posible estudiar la función de los genes virales y sus productos, así como usar secuencias virales como pruebas moleculares para detectar ADN

de papilomavirus en los tejidos, y para identificar y clonar molecularmente nuevos genotipos virales.

Basándose en estas observaciones y en la evidencia emergente de la íntima relación entre la infección por VPH y la formación de verrugas genitales, **Harald zur Hausen**, en el año de 1972, fue el primero en proponer que el VPH era el agente etiológico para el cáncer cervical. En 1984, zur Hausen sustentó esta hipótesis al demostrar la presencia de nuevos tipos de ADN del VPH en cánceres cervicales (11).

1.3 Estructura del cuello uterino

El cuello uterino está dividido en dos zonas: el **exocervix**, que está tapizado por **epitelio escamoso** no queratinizado y el **endocervix**, que está recubierto por uno de tipo cilíndrico mucosecretor. Ejemplificado en la figura 2, el sitio de unión de estos dos epitelios, se llama unión escamo-columnar (**UEC**), o “**Zona de transformación**”, y es un área dinámica, sujeta a fenómenos proliferativos y de remodelación que transforman el epitelio cilíndrico mucosecretor en epitelio pavimentoso, a este cambio se denomina metaplasia. Debido a las características antes mencionadas, esta región es ideal para el desarrollo de lesiones malignas, tales como displasias y CaCu (12).



Figura 2. Fotomicrografía de la unión escamo-columnar. Fuente: Eifel P. J. 2001 (13).

❖ *Epitelio escamoso*

Este epitelio recubre el exocervix y la mucosa vaginal. Está constituido primordialmente por tres zonas: *estrato profundo o basal*, *estrato espinoso* y *estrato superficial*, en los que hay igual número de tipos celulares con características comunes a cada área.

❖ *Epitelio endocervical*

El epitelio del canal endocervical es cilíndrico mucosecretor y reviste tanto la superficie como las hendiduras y criptas subyacentes a la mucosa superficial (12).

1.4 Clasificación de los papilomavirus

Los papilomavirus humanos son descritos como “tipos” con base en el análisis de su secuencia genómica. El marco de lectura abierto del gen **L1**, es el más conservado dentro del genoma viral y ha sido usado para la identificación de nuevos tipos. Un nuevo tipo viral, es aquel que difiere en la secuencia de ADN de L1 en más de un **10%**, con respecto al tipo conocido. Una diferencia menor al **2%** define una **variante**, de tal forma que dentro de un mismo tipo viral, encontramos diversas variantes, lo que ha resultado sumamente relevante en la historia natural del cáncer cervicouterino (14). Los papilomavirus humanos se clasifican también dentro de cinco grupos evolutivos. Los VPHs que infectan el cérvix conforman el grupo **Alfa**, con aproximadamente 60 tipos. Los grupos Beta, Gama, Mu y Nu, en general, producen infecciones cutáneas (15, 16, 17).

A la fecha, más de 100 tipos de papilomavirus humanos han sido identificados gracias al análisis de secuencia de ADN. Con base en su asociación con cáncer cervical y lesiones precursoras, los VPHs han sido agrupados como virus de alto riesgo (VPH-AR) y de bajo riesgo (VPH-BR). Los VPH que tienen más probabilidad de llevar a la formación de cáncer se conocen como virus de alto riesgo, mientras que los de bajo riesgo se relacionan con la formación de lesiones benignas (15). En el cuadro 1 se resumen algunos de los tipos virales ya clasificados como de bajo y alto riesgo.

| | |
|-------------------------------|--|
| Virus de bajo riesgo (VPH-BR) | 6, 11, 10, 3, 7, 28, 29, 32, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 83, 84, 78 |
| Virus de alto riesgo (VPH-AR) | 16, 18, 31, 33, 35, 26, 34, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 |

Cuadro 1. Tipos de VPHs y su asociación a un potencial oncogénico (17).

Los tipos virales más frecuentes en casos de carcinoma invasivo son los VPHs 16, 18, 45 y 31, la prevalencia acumulada de estos tipos virales explican el 80% de los casos **(18, 19)**.

2. Historia Natural del Cáncer Cervical

La infección cervical por el VPH, es una enfermedad de transmisión sexual y es tan común, que más de la mitad de todos los adultos (hombres y mujeres) que son sexualmente activos, cursarán por una infección relacionada con este virus. Esta infección es frecuentemente detectada en mujeres jóvenes (18-30 años) sexualmente activas, sin embargo, en la mayoría (90%) de ellas se resuelve espontáneamente; la infección persiste en sólo una pequeña fracción de mujeres (menos del 5%), quienes desafortunadamente, poseen una mayor probabilidad de desarrollar cáncer **(8)**. Entonces, ¿de qué depende esto?

Primero hay que mencionar que los tipos de VPHs de alto riesgo u oncogénicos, se han asociado estrechamente con el cáncer cervicouterino, pero diversos estudios epidemiológicos y de laboratorio, convergen en el hecho de que estos papilomavirus son necesarios pero no suficientes para ocasionar cáncer cervical, ya que se necesita la presencia de otros determinantes, que combinados con el tipo viral, promueven un fenotipo carcinogénico **(20)**.

Entre estos determinantes de progresión, se encuentran la persistencia de la infección, probablemente la carga viral y la **integración** del ADN viral en el genoma celular. Estudios epidemiológicos han mostrado que probablemente la predisposición genética, es uno de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor. No se sabe con exactitud qué factores genéticos son los que intervienen, pero se han reportado asociaciones entre los alelos HLA y la susceptibilidad a la infección por VPH **(8, 9)**.

Otro factor emergente en el desarrollo de neoplasia cervical, es el papel de las variantes de los VPHs, puesto que se ha observado que estas poseen diferentes propiedades biológicas, químicas y de patogenicidad **(15)**. Debido a la prevalencia del VPH tipo 16 en lesiones pre-invasivas y carcinomas cervicales, su variación intratípica ha sido la más estudiada. Se ha demostrado que las variantes del VPH 16 forman cinco ramas filogenéticas: Europea (E),

Asiática (A), Asiática-Americana (AA), Africana-1 (Af-1) y Africana-2 (Af-2). Para el caso del VPH 18, se han detectado 3 ramas filogenéticas Europea, Asiática-Amerindia (AsAi) y Africana, (21). La figura 3 muestra de forma resumida la historia natural del CaCu.

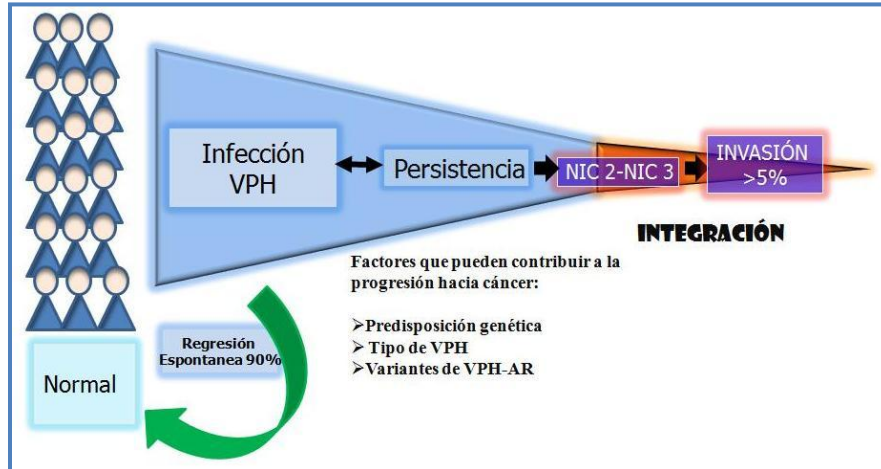


Figura 3. Historia natural del CaCu. La gran mayoría de las mujeres infectadas por VPH (90%) presentan una regresión espontánea, y la progresión a cáncer cervical se da sólo en una pequeña fracción.

Diversas publicaciones han determinado diferencias funcionales en regiones genómicas específicas y se ha especulado que éstas podrían repercutir en el potencial oncogénico de las variantes virales. Por ejemplo, se ha mencionado que variantes de la proteína E6 poseen una menor capacidad para degradar a la proteína supresora de tumores p53, así mismo, se han encontrado diferencias en los mecanismos de procesamiento alternativo entre las variantes del VPH 18. La variante Africana presenta mayor proporción del transcrito de E6 que corresponde a un producto de menor tamaño denominado **E6*I**, mientras que el transcrito de E6 de tamaño completo se halló en mayor proporción para la variante AsAi. Esto indica que las variantes Af y AsAi podrían diferir en su potencial oncogénico al poseer proteínas E6 con propiedades biológicas diferentes (21). En cuanto a otros factores relacionados, tenemos el uso prolongado de anticonceptivos orales, paridad elevada y el tabaco, dietas pobres en frutas y verduras, y la coinfección con otros agentes transmitidos sexualmente como *Chlamydia ssp* y el Virus *Herpes simple* (8, 22).

Hablando en términos moleculares, me permito el atrevimiento para afirmar que los virus son máquinas maravillosas, que aunque estructuralmente parecieran ser sencillos, su

funcionalidad es capaz de quitar el aliento de quienes los estudiamos. Ahora que adquirimos cierta familiaridad con la manera en la que se desarrolla el CaCu, es momento de conocer al protagonista de esta historia, y con ello nos referimos al VPH.

3. Biología molecular del VPH

3.1 Características generales

El virus del papiloma (VP), pertenece a la familia *Papillomaviridae*, una familia reconocida como distinta de los polyomavirus por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus, (ICTV) (15). La distribución de estos virus en la naturaleza es amplia, e infectan específicamente el epitelio escamoso de diferentes especies de mamíferos, aves y reptiles (23). La vía de transmisión es por contacto directo con las lesiones localizadas en cavidad oral, genitales y superficie de la piel de los individuos infectados.

3.2 Genoma Viral

El genoma del VP consiste en una molécula de ADN circular, de doble cadena asociada con histonas; con una longitud aproximada de 8000 pares de bases (pb). Son virus no envueltos, su tamaño oscila entre los 52 y 55 nm de diámetro, y tienen un peso molecular aproximado de 5.3×10 daltons (14, 24). Poseen una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros (mostrada en la figura 4). Cada capsómero es un pentámero formado por la proteína principal de la cápside L1, a su vez, cada cápside vírica contiene varias copias de la proteína menor de la cápside L2. Las secuencias de los **ORFs** (Open Reading Frames) o marcos de lectura abierta, que codifican para proteínas, están restringidas a una cadena, (10, 24).

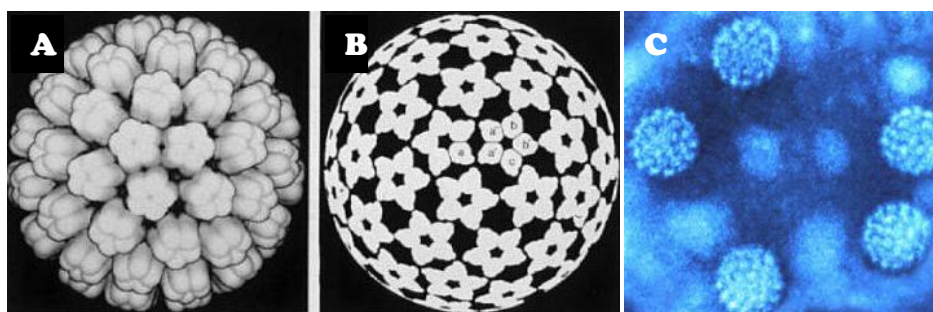


Figura 4. (A y B). Diagrama esquemático de la cápside del papiloma. (C). Estructura de los viriones del VPH. En la fotografía se pueden observar los capsómeros que conforman la cápside. Fuente: Garcea L.

R. Dimaio D. 2007, (10) y http://www.medizin.unituebingen.de/med_virologie/exp_viro/Exp_Viro_de/Forschung/Projekte/target.html (25).

Funcionalmente, el genoma viral se divide en tres regiones (Fig. 5):

- La primera, es una región reguladora, con una longitud que va de los 800 a 1000 pb, denominada **LCR (Long Control Region)**. Esta región contiene secuencias promotoras, amplificadoras y silenciadoras que regulan la replicación del ADN viral a través del control de la transcripción de los ORFs.
- La segunda, es la **región temprana (Early)**, que consiste en los ORFs de E1, E2, E4, E5, E6, E7 y E8. Sus productos génicos participan en el control de la replicación viral y la oncogénesis. Esta región ocupa un poco más del 50% del genoma viral.
- La tercera, es la **región tardía (Late)**, que codifica para las proteínas estructurales L1 y L2 que forman la cápside viral (14).

En el genoma de todos los VP, encontramos dos sitios de poliadenilación (pA): sitio pA temprano y sitio pA tardío, que separan la región tardía de la LCR y la región temprana.

(24).

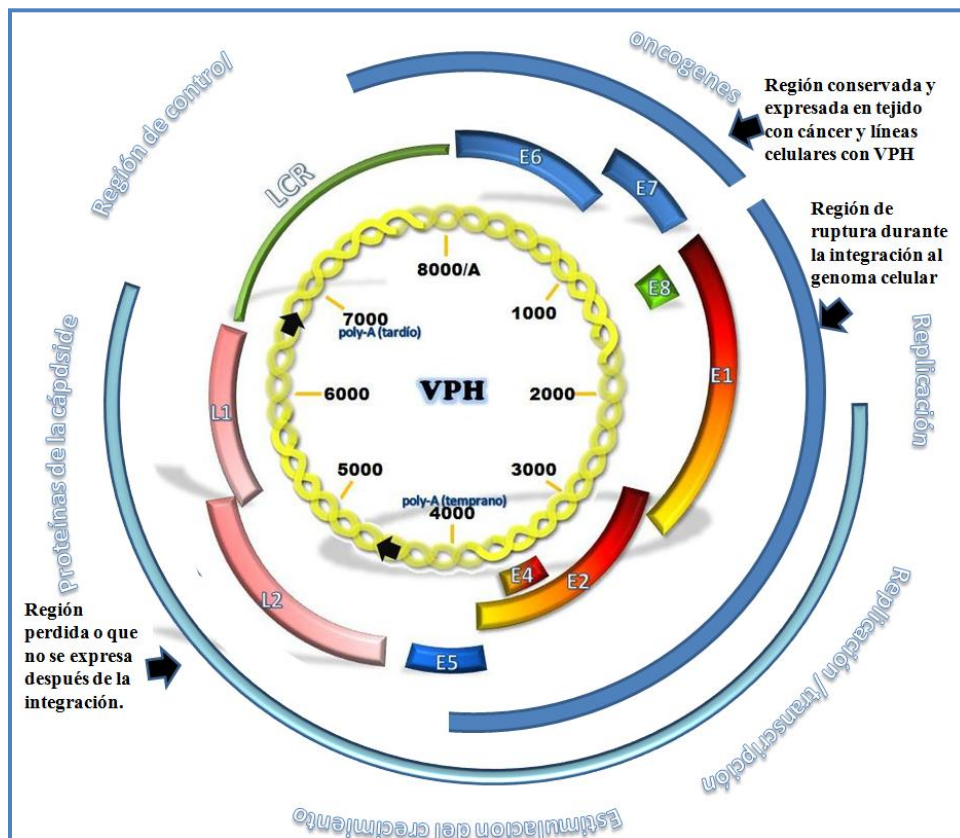


Figura 5. Organización del genoma del Virus del Papiloma Humano. Fuente: Prendiville, 2004, (23) y telemedicine.org/warts/cutmanhvpv.htm, (26), modificado.

A continuación, en el cuadro 2 se resume la función de cada una de las proteínas del VPH.

| Región | Producto | Función |
|--------|----------------|--|
| L1 | Proteína L1 | Constituyente principal de la cápside |
| L2 | Proteína L2 | Constituyente menor de la cápside; ensamblaje de viriones |
| E1 | Proteína E1 | Inicio de la replicación viral; helicasa y ATPasa |
| E2 | Proteína E2 | Regula la transcripción; auxiliar en la replicación del genoma viral. Represor transcripcional de E6 y E7 |
| E4 | Proteína E4 | Proteína tardía; rompe estructuras de citoqueratina |
| E5 | Proteína E5 | Proteína transformante asociada a membrana; interactúa con receptores a factores de crecimiento |
| E6 | Proteína E6 | Proteína transformante e inmortalizante; promueve la degradación de p53 |
| E7 | Proteína E7 | Proteína inmortalizante; bloquea la regulación de la división celular por medio de la degradación de pRb |
| E2^E8 | Proteína E2^E8 | Regula la transcripción y duplicación del ADN viral |
| LCR | | Región reguladora de la transcripción temprana; hay elementos de respuesta cis a diversos factores de transcripción celular. |

Cuadro 2. Principales funciones de las proteínas tempranas y tardías del VPH (23).

3.2.1 Región larga de control (LCR)

La región larga de control (LCR), es un segmento genómico cuya longitud oscila entre 800 y 1000 pb dependiendo del tipo viral. Es una secuencia no codificante, ya que carece de marco de lectura alguno, pero como se muestra en la figura 6, contiene una amplia variedad de elementos de respuesta *cis*, encargados de regular la expresión génica y replicación viral (27, 28).

Funcionalmente, la LCR se divide en dos dominios: el RE2, regulado por la proteína E2 y donde se localiza tanto el origen de replicación viral como el promotor temprano (p97 y p105 en los VPH 16 y 18 respectivamente); y el dominio CE (celular enhancer), un potenciador de la transcripción cuya activación depende de factores transcripcionales celulares (28, 29).

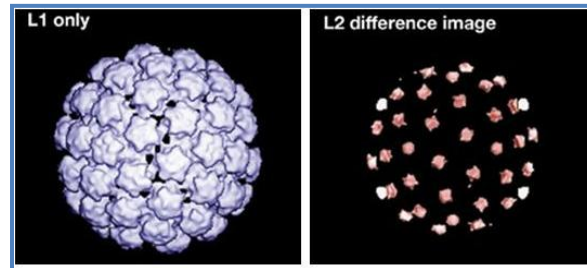


Figura 7. Reconstrucción en 3D de la cápside viral conformada por L1 y L2. Se muestra la proporción en la cual L1 y L2 contribuyen en la estructuración de la cápside viral. Fuente: Trus L. B. 2005, (32).

3.2.3 Proteína E1

El ORF de E1, es el de mayor longitud y el más conservado entre los distintos tipos de papilomavirus, reflejando así el papel crítico y central de este producto génico en la replicación viral. La longitud de las proteínas E1, se sitúa en el rango de los 593 (VPH48) a los 681 (VPH10) aminoácidos, con un peso molecular entre 67.5 (VPH47) y 76.2 kDa (VPH10). La predicción de dominios funcionales basada en similitud de secuencia, así como la comparación con motivos de proteínas conocidas, sugieren una organización tripartita de las proteínas E1: un dominio N-terminal, que se sospecha regula las actividades de E1 residentes en el C-terminal, pues es blanco de una serie de fosforilaciones que influyen en su función; una región espaciadora de longitud variable y una región C-terminal larga, con actividad helicasa y ATPasa. Esta última característica, las hace las únicas proteínas de los papilomavirus con actividad enzimática (33).

Diversos estudios con E1 del VPB, mostraron que esta proteína se une al origen de replicación, en una secuencia palindrómica de 18 pb rica en A y T, que se localiza en la LCR, por lo que a E1 se le considera una proteína iniciadora viral. Por si misma, E1 se une ligeramente a las secuencias de origen, pero esta unión es facilitada por la formación de un complejo con la proteína E2. Los sitios de unión de E2, son adyacentes a secuencias de reconocimiento de E1. Estos complejos de E1 desenrollan eficientemente el ADN superhelicoidal con la ayuda de proteínas chaperonas (34).

3.2.4 Proteína E2

El producto del gen E2, es una proteína nuclear de aproximadamente 52 kDa, la cual, es requerida para la replicación y regulación de la transcripción viral. El N-terminal de E2, contiene un dominio de transactivación (E2TAD) de aproximadamente 200 aminoácidos y está formado por una α -hélice rica en glutamina. Esta sección promueve la oligomerización e interacción entre moléculas de E2 unidas al ADN en sitios distantes, provocando una curvatura en la molécula de ADN y otros cambios conformacionales (35). Esta región a su vez, se conecta con un dominio de dimerización y unión a ADN C-terminal de casi 100 aminoácidos, a través de una región flexible rica en prolinas, de longitud y secuencia variables entre los papilomavirus, esta sección se conoce con el nombre de región en bisagra, dicha estructura puede observarse en la figura 8. Los dímeros de E2 se unen a secuencias palindrómicas consenso (ACCN6GGT) denominadas sitios de unión de E2 (E2BSs). Hay cuatro E2BSs presentes en la RLC de los VPs-AR, que se localizan hacia la región 5¹ del promotor viral, que regula la expresión de los genes tempranos.

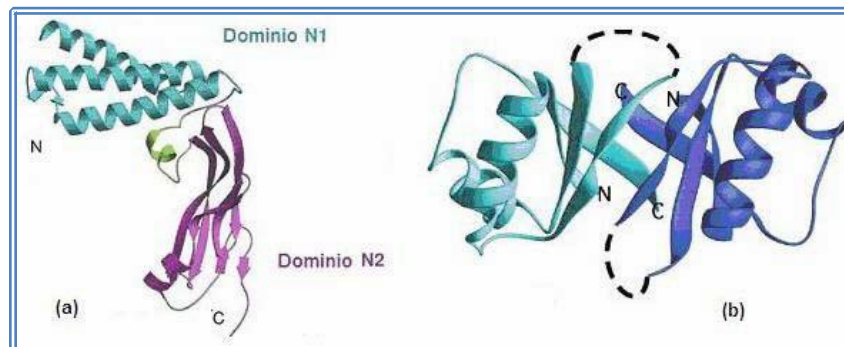


Figura 8. Estructura de E2. Estructuras del dominio amino terminal (a) o dominio de activación. El dominio carboxilo terminal (b) es de dimerización y de unión al ADN. Ambos dominios están separados por una región de secuencia y longitud variables (dominio de visagra). Fuente: Rashmi S. Hegde. 2002, (36).

La unión de E2 al ADN, provoca la represión o activación de dicho promotor y la replicación del ADN viral, estas funciones dependen de la concentración intracelular de E2. A bajas concentraciones, E2 activa la expresión de genes tempranos, mientras que a concentraciones elevadas la reprime. Esta regulación de la expresión viral, contribuye al control del número de copias en células indiferenciadas. Durante la diferenciación celular, hay un switch en el promotor tardío, el cual, no es reprimido por E2, lo que resulta en un

aumento en la expresión de E1 y E2 dando como resultado la amplificación del ADN viral (37).

3.2.5 Proteína E4

E4, es codificada por una secuencia de aproximadamente 260 pb. Aunque el marco de lectura de E4, está localizado dentro de la región temprana, se expresa como un gen tardío, debido a que se encuentra bajo el dominio de un promotor específico de la diferenciación (38).

La primera actividad descrita para E4, fue su capacidad de asociación con filamentos intermedios de queratina. Dicha asociación, afecta y colapsa la estabilidad mecánica de la red de citoqueratina, lo cual, promueve la liberación de las partículas virales. Otra característica importante de E4 (para el VPH 16), es que puede unirse a las mitocondrias mediante una región rica en leucinas localizada en su dominio N-terminal. Esta interacción, promueve el desprendimiento de mitocondrias de los microtúbulos, ocasionando una severa reducción en el potencial de membrana mitocondrial y una inducción de apoptosis (39).

E4 puede expresarse junto con E1 y E2 durante la infección. El solapamiento de ambos marcos de lectura y el hecho de que ambas proteínas, E1 y E2, pueden inhibir el ciclo celular, sugiere que cooperan durante el ciclo viral (40).

3.2.6 Proteína E5

El gen E5, de aproximadamente 230 a 250 pb, codifica para una proteína hidrofóbica pequeña de 84 aminoácidos con un peso molecular de 14 kDa (41).

Se ha reportado que E5 del VPH 16, interfiere con el citoesqueleto de actina y bloquea la actividad endocítica; modula la señalización del receptor de crecimiento epidérmico; induce la expresión de c-jun vía ras y Proteína cinasa C (PKC); e impide la localización de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I en la superficie celular, con lo cual, E5 contribuiría a la evasión del sistema inmune en la infección por el VPH (42).

Con respecto a su papel en la tumorigénesis, E5 coopera con E6 y E7 en la inmortalización de queratinocitos. Esto probablemente se debe a la capacidad de E5 para inhibir la expresión de la proteína supresora de tumor p21. Por otro lado, también se ha demostrado, que E5 impide la comunicación intercelular que se da a través de las uniones comunicantes (42, 43).

3.2.7 Proteína E8^{E2}

Esta proteína se genera a partir de la fusión del producto del ORF E8 y de una parte de la proteína E2. Dicha proteína de fusión de 20 kDa, es capaz de reprimir la replicación y transcripción viral, y se piensa que puede jugar un papel en el mantenimiento de latencia viral observada en las células basales del epitelio infectado (23). Las isoformas de la proteína E2 ejercen sus efectos transcripcionales y de replicación al interactuar con sitios cis definidos. E8^{E2} interfiere con la activación transcripcional dependiente de E2, a través de una competición por los sitios de unión a E2 (44).

3.2.8 Proteína E7

La proteína E7 es codificada por un gen de 300 a 320 pb y se compone de aproximadamente 100 aminoácidos. Su peso molecular es de 10 kDa y posee la mayor capacidad transformante mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB, que controlan la replicación celular.

Como se muestra en la figura 9, E7 posee un dominio de unión a zinc en la región C-terminal, que se utiliza para su dimerización o multimerización, y un sitio de fosforilación en su región N-terminal, donde es fosforilada por la cinasa caseína II. Así mismo, en esta región, E7 contiene dos secuencias conservadas denominadas CR1 y CR2 que contribuyen a la actividad transformante de las oncoproteínas E7 de los papilomavirus de alto riesgo (45). Un motivo Leu-X-Cys-X-Glu (LXCXE) ubicado en CR2 es necesario y suficiente para la asociación de E7 con la proteína supresora de tumores del retinoblastoma pRB, así como a las proteínas *pocket*, p107 y p130, pertenecientes a la familia RB. Con base en estas características, se puede determinar que el papel de la proteína E7 es el de alterar el control del ciclo celular. Pero entonces, llegamos a la cuestión: ¿cómo lo hace?

Las proteínas E7 de los papilomavirus de alto riesgo se asocian preferencialmente a la proteína pRB unida a E2F, marcándola para su degradación por medio de la vía proteosomal. Esta desestabilización de pRB/E2F, promueve un descontrol celular en el mecanismo de salida de G1 y del ingreso a la fase S (46).

E7 de alto riesgo, también puede interactuar con p21^{CIP1} y con p27^{KIP1}, que son inhibidores de los complejos ciclina-cinasa, lo que resulta en la elevación de los niveles de las ciclinas E y A. La interacción de E7 con estas proteínas, así como con las desacetilasas de histonas y AP1, inducen múltiples respuestas celulares, incluyendo la estabilización de P53, quien contrarrestaría esta replicación celular anormalmente estimulada mediante el incremento de la apoptosis. Sin embargo, la proteína E6 degrada a P53 y por tanto bloquea esta respuesta celular (47).

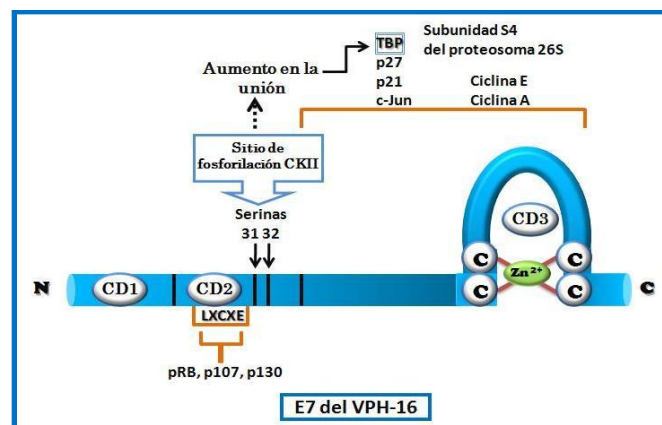


Figura 9. Estructura de la proteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16). Se pueden observar sus tres dominios conservados (CD1-3), junto con algunos de sus blancos celulares más conocidos y sus sitios de interacción. Fuente: De la Cruz Hernández, 2004, modificado (45).

3.2.9 Proteína E6

El gen E6, de aproximadamente 450 a 500 pb, codifica para una proteína de cerca de 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa. La proteína E6 posee cuatro motivos CX₂C-X₂₉-CX₂C que permiten la formación de dos dedos de zinc, los cuales, están conectados por un interdominio de 36 aminoácidos y flanqueados por un dominio hidrofílico amino terminal, y por un dominio carboxilo terminal corto, que en el caso de los

papilomavirus humanos de alto riesgo, contiene un motivo de unión PDZ [nombre derivado de las tres primeras proteínas identificadas con este dominio: Post synaptic density protein (PSD95), *Drosophila* disc large tumor suppressor (DlgA), y Zonula occludens-1 protein (zo-1)] que se sobrelapa con un sitio proteína cinasa A (PKA), figura 10. Los dominios dedos de zinc se contraponen entre sí de manera simétrica, formando una estructura pseudodimérica, que junto con el interdominio, crean una hélice que los hace rígidos. Cada dominio consiste de tres hojas beta plegadas (S1, S2, S3) y de dos hélices cortas (H1, H2), (48).

E6, es una proteína que se expresa tempranamente durante una infección por VPH. Esto le confiere varias funciones que alteran el ambiente celular y que posteriormente promueven el proceso carcinogénico (48).

Numerosos estudios han mostrado que la presencia de las proteínas E6 y E7 de los papilomavirus de alto riesgo, es suficiente para inducir la inmortalización de queratinocitos humanos primarios, mientras que las proteínas de los VPHs de bajo riesgo no inducen inmortalización. Investigaciones realizadas en ratones transgénicos con los genes E6 y E7, mostraron que E7 se relacionaba con la promoción tumoral, mientras que la proteína E6 contribuía ligeramente en etapas tempranas, y que su mayor pico de acción se daba en la progresión tumoral, acelerando la conversión maligna de tumores benignos. Este hallazgo, fue particularmente importante, debido a que sugería que E6 podría ser la proteína responsable para la progresión maligna de los tumores inducidos por el VPH (49).

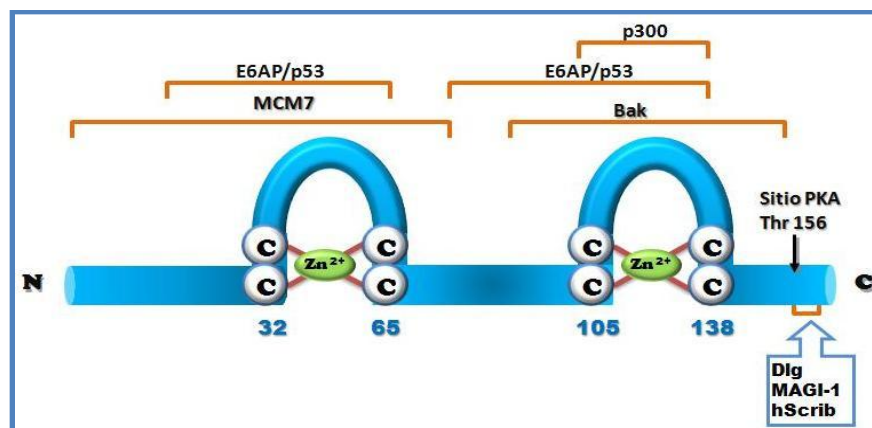


Figura 10. Diagrama esquemático que muestra la estructura de los dedos de zinc de las proteínas E6 del VPH-18 junto con algunos de sus blancos celulares más conocidos y sus sitios de interacción. Fuente: De la Cruz Hernández, 2004, modificado (45).

3.2.9.1 Interacciones entre E6 del VPH y p53.

El análisis de los blancos celulares de las proteínas E6 de los VPHs de alto riesgo, ha proveído una amplia fuente de información en relación a la manera en la cual E6 contribuye a la transformación maligna (48, 49).

El primer blanco de E6 en ser identificado, y probablemente hasta ahora el más importante, es p53. El supresor de tumores p53 es un factor de transcripción que coordina vías de señalización claves en la célula que le permiten enfrentar y reparar daños inducidos por estrés genotóxico o citotóxico (48, 49).

Normalmente, p53 está presente en bajos niveles y es transcripcionalmente inactivo, el daño celular dispara un incremento en los niveles de la proteína p53 y su activación vía modificaciones post-traduccionales. Una vez activada, p53 promueve el encendido de vías de señalamiento relacionadas con la reparación del ADN, arresto del ciclo celular y/o apoptosis. Además del daño genotóxico y citotóxico, p53 también puede ser activado por la estimulación imprevista de la síntesis de DNA, como la inducida por el VPH. Los papilomavirus humanos de alto riesgo han evolucionado de tal forma, que generaron mecanismos que les permiten bloquear las funciones de p53 en células infectadas (48, 49).

El principal mecanismo por el cual los papilomavirus de alto riesgo inactivan a p53, es por la inducción de su degradación a través de la vía de la ubiquitina. Normalmente los niveles de la proteína p53 son regulados por la ligasa de ubiquitina E3 Mdm2. Sin embargo, la degradación de p53 mediada por Mdm2 es inhibida durante la infección viral y otras condiciones de estrés (48). Las proteínas E6 de los VPHs de AR inducen la degradación de p53 por medio de la formación de un complejo con otra ligasa de ubiquitina E3, denominada *Proteína Celular Asociada a E6 AP (E6 AP)*, también conocida como UBE3A. E6AP pertenece a la familia con el dominio HECT de ligasas de ubiquitina, cuyos dominios N-terminal divergentes son los que median el reconocimiento a sustratos. E6AP *per se*, es incapaz de unirse a p53 e inducir su degradación, puesto que es necesario que E6 se una en primera instancia al dominio de reconocimiento a sustrato N-terminal de E6AP, antes de que p53 sea unido y ubiquitinado. Interesantemente, las proteínas E6 de los VPHs

de AR y BR pueden interactuar con p53, sin embargo, difieren con respecto a los dominios que interactúan con este factor de transcripción. Mientras que E6 de los VPHs de AR y BR consiguen unirse al C-terminal de p53, solamente las proteínas E6 de los tipos de AR son capaces de unirse a la región central o core de p53. Es a través de esta última unión, que E6 de AR es capaz de degradar a p53 (50).

3.2.9.2 Interacciones de E6 con otras proteínas celulares.

Las proteínas de los papilomavirus poseen efectos pleiotrópicos, y para el caso de E6, se conocen una amplia gama de funciones, que en conjunto, promueven la desregulación de mecanismos de control celular. En la figura 11 se resumen las diversas proteínas con las que E6 de los VPHs-AR puede interactuar y modificar su función normal (51).

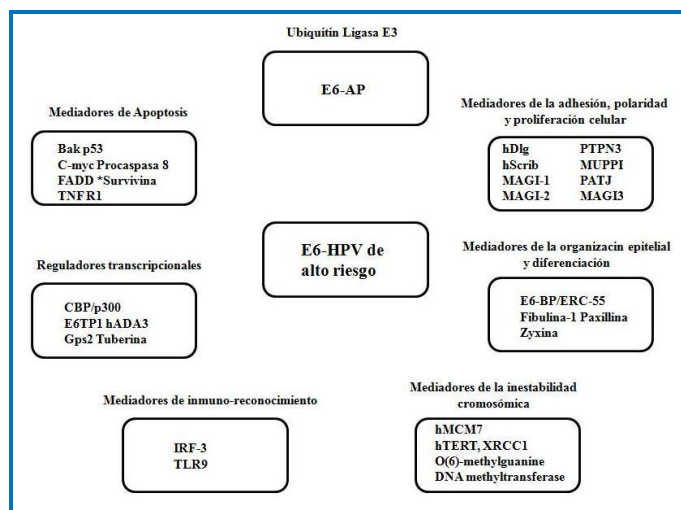


Figura 11. Proteínas celulares con las que interactúa la oncoproteína E6 de los papilomavirus de alto riesgo. Fuente: Tungteakkhum, 2008, modificado (51).

La oncoproteína E6 puede interactuar con diversas proteínas celulares de la familia PDZ. El dominio PDZ se encuentra en proteínas localizadas en sitios de unión célula-célula, y dan la polaridad al tejido. Estas proteínas pueden actuar como andamios en la transducción de señales. Miembros de esta familia de proteínas, como lo son MUPP, hDLG, y hSCRIB son marcadas para su degradación por la proteína E6. Las proteínas E6 de los VPHs-AR, pueden promover la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa, hTERT. Estudios recientes han mostrado que E6 puede unirse tanto a Myc y a su cofactor Max, conduciendo a la activación transcripcional del promotor de hTERT. Así mismo, E6 de alto riesgo,

también puede interactuar con paxilina, p300/CBP, E6-BP, con el factor regulador de interferon 3, etcétera, **(51)**.

En estudios más recientes, se mostró que variantes de E6, específicamente del VPH 18, afectan diferencialmente las vías de señalización Akt/PKB y MAPKs, que están directamente involucradas en la proliferación y sobrevivencia celular y cuya alteración de las mismas, promueve procesos carcinogénicos. Así, las variantes de E6 fueron capaces de promover una disminución diferencial en las proteínas hDLG, y por ende, en la actividad de la proteína PTEN y un aumento en la actividad de la proteína PKB. Además, se mostró que las variantes de E6 del VPH18, pueden promover diferencialmente, una mayor actividad de la proteína PI3K, lo que se relaciona con la activación de las MAPKs y por lo tanto, con la promoción en la proliferación celular **(52)**.

4. Productos E6*

Los patrones transcripcionales de los genes tempranos de los VPH de alto riesgo comparten ciertas similitudes; sin embargo, aun no se conoce el proceso transcripcional completo durante la historia natural de una infección por VPH. Cabe destacar, que los patrones transcripcionales de los papilomavirus de alto y bajo riesgo son distintos. Mientras que los ARNs mensajeros que codifican las proteínas E6 y E7 de los VPH no oncogénicos son monocistrónicos **(53, 54)**, los transcritos E6 y E7 de los VPHs de alto riesgo se producen a partir de un ARN mensajero bicistrónico.

Para el caso del gen E6, este presenta un procesamiento alternativo o *splicing* en el que se generan transcritos pequeños y consecuentemente gran parte de la proteína E6 completa puede dejar de producirse **(55)**. Entre los polipéptidos que potencialmente se generan a consecuencia del *splicing* alternativo se encuentran cuatro productos del gen E6, llamados E6* I-IV. Para el VPH tipo 16 se han descrito cuatro isoformas, mientras que para el VPH 18 solo se ha detectado una **(49, 50)**, en la figura 12 se muestra parte de este procesamiento. Una característica importante de los productos potenciales E6*, es que estos pierden la secuencia carboxilo terminal X-T/S-X-V/L, la cual, es utilizada por la proteína E6 completa para su interacción con proteínas que contienen dominios PDZ **(56)**.

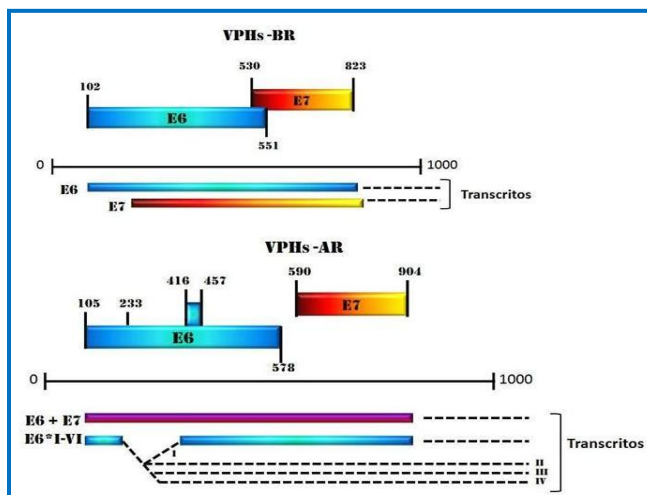


Figura 12. Procesamiento alternativo que conlleva la generación de los transcritos E7, E6 y E6*. El esquema muestra las diferencias de los patrones transcripcionales para los genes E6-E7 entre los papilomavirus de alto y bajo riesgo. Fuente: Thomas et. al. 1999, modificado (50)

En los inicios del estudio sobre los patrones transcripcionales de estos oncogenes, los productos E6*I frecuentemente eran detectados en tumores asociados a virus de alto riesgo, razón por la cual, las investigaciones iban encaminadas a la demostración de que tales proteínas poseían actividad transformante. Sin embargo, los hallazgos mostraron un efecto contrario, pues se demostró que la coexpresión de E6*I con E6 y E7 en queratinocitos humanos produce menos inmortalización de colonias celulares que las obtenidas en ausencia de E6*I (57). Posteriormente, se observó que el producto E6*IV generado a partir del VPH 16, era capaz de inhibir la degradación de p53 mediada por E6 *in vitro* e *in vivo* (58). Se ha observado también que la proteína E6*I traducida *in vitro* es inestable, por lo que en las células sólo se detectan bajos niveles debido a su rápida degradación (54), sin embargo, utilizando sistemas basados en la generación de proteínas de fusión, se ha dilucidado que el peso molecular de estas proteínas es de aproximadamente 7 kDa.

4.1 E6*I del VPH 18

Hasta la fecha, sólo se ha descrito la presencia de un producto E6* para el papilomavirus tipo 18, y también se han encaminado esfuerzos para esclarecer el posible papel de este producto en la historia natural del CaCu. En la figura 13 se muestra la estructura probable para la proteína E6*I del VPH 18.

Pim y Banks (1999) demostraron que la expresión ectópica de la proteína E6*I de VPH18 ejercía un efecto antiproliferativo en células de tumores de cérvix positivas a VPH. Este efecto lo atribuyeron a la capacidad de E6*I de inhibir la degradación que la proteína E6 completa ejerce sobre p53, así como al incremento de transactivación transcripcional por p53. Observaron que este fenómeno se debía primordialmente a la capacidad de E6*I de unirse a E6 de longitud completa, así como a la ubiquitin ligasa E6-AP, ocasionando una menor degradación de la proteína p53 (59).

Se ha demostrado también que la sobreexpresión de la proteína E2 es capaz de revertir las principales alteraciones en la maquinaria del ciclo celular que acompaña a la carcinogénesis cervical dado que E2 normalmente regula los niveles de expresión de E6 y E7 (60). Ahora se considera que los VPH de alto riesgo tienen una forma de control adicional que involucra a los productos E6*. E6*I parece modular a la proteína E6 completa mediante la inhibición de algunas de sus funciones. En la historia natural de una infección por VPH esto haría que el virus estuviera bajo un control más estrecho, al menos en las primeras etapas de la infección, cuando en las células basales epiteliales los genomas de VPH se mantienen como elementos de replicación autónoma y ocurre una muy baja expresión de proteínas de VPH (59).

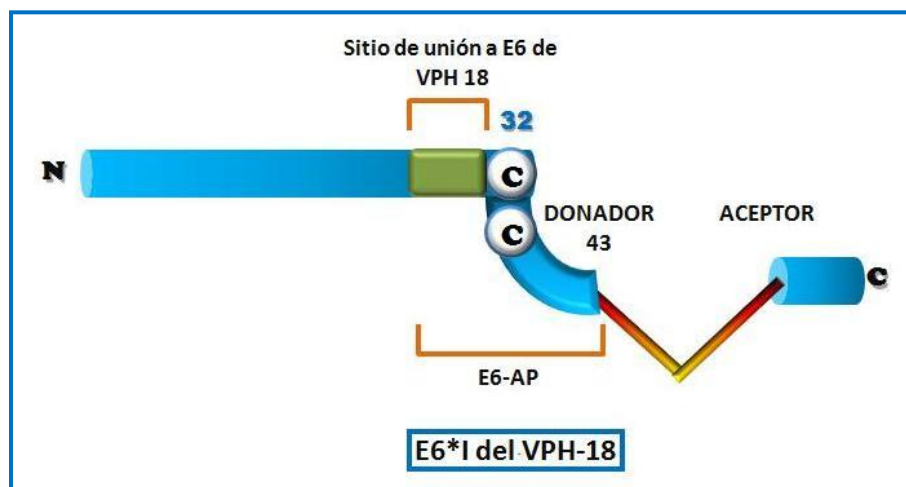


Figura 13. Esquema de la proteína E6*I del VPH 18. Se indica la región que está involucrada en la unión a la proteína E6 de longitud completa. Fuente: Thomas et. al. 1999, modificado (50)

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se encontraron niveles incrementados del transcrito codificador del fragmento E6*I en variantes de E6 de VPH18 asociadas a tumores con un comportamiento menos agresivo **(21)**. Sugiriendo que ciertos cambios en la secuencia genómica de E6 podrían favorecer el procesamiento alternativo hacia una mayor expresión de E6*I. Estas evidencias sugieren un posible efecto protector del gen E6*I en cuanto a la progresión hacia la malignidad de aquellas células infectadas con VPH.

A la fecha, las investigaciones dirigidas a dilucidar un papel intrínseco de E6*I del VPH 18 son pocas, y solo un par de ellas han dirigido su atención al estudio de la actividad de E6* en sistemas que no involucran productos génicos del VPH.

En uno de ellos, se observó que mientras la proteína E6 de longitud completa de VPH16 se une y acelera la degradación de procaspasa 8, la unión de la forma E6*a esta procaspasa, resulta en su estabilización. Por lo cual, se argumenta que el balance entre la estabilización y desestabilización de procaspasa 8, mediada por E6 y las isoformas E6*, respectivamente, contribuye a la alteración de la respuesta celular a los miembros de la superfamilia TNF. Así, la relación entre los niveles de expresión de E6 y E6*, podría ser un factor en la modificación de vías apoptóticas extrínsecas del hospedero **(61)**. Aunque estos experimentos se basaron en el uso de las isoformas cortas de E6 originadas del VPH 16, pudiera ser que un fenómeno parecido se suscitara con E6*I de VPH 18.

Uno de los últimos estudios relacionados a la actividad de E6*I de VPH 18, se enfocó en el impacto que esta proteína ejercía en la estabilidad de Akt, Dlg, MAGI-1, MAGI-2 y Scribble. Esta investigación arrojó a la luz que la expresión de E6*I promueve una disminución en la expresión de Akt, Dlg, y Scribble en ausencia de la proteína E6 de longitud completa. Para el caso de Dlg, su disminución dada por E6* es independiente de la transcripción, y no se requiere de la interacción directa entre estas dos proteínas. A partir de estos hallazgos, se concluyó que las oncoproteínas E6 de los papilomavirus de alto riesgo, pueden marcar ciertos sustratos ya sea directa o indirectamente a través de proteínas E6*, cooperando en su degradación **(62)**.

5. Ciclo viral.

5.1 Infección y desensamble del virión

Durante la infección por los papilomavirus, se requiere de la presencia de un acceso hacia la capa basal epitelial para que los virus contacten y penetren a las células basales. Actualmente existe controversia sobre la naturaleza precisa del receptor para el ingreso del virus, pero se han propuesto diversos candidatos para realizar dicha función. Se ha visto que el proteoglicano de heparán sulfato, juega un papel relevante en el anclaje inicial y la subsecuente entrada de la partícula viral a través de un desmosoma. Como otros virus, el VPH parece requerir de la presencia de un receptor secundario para una infección eficiente, y se ha sugerido que este papel puede ser realizado por la integrina α -6, β -4. Las partículas del VPH, ingresan lentamente a la célula, este proceso puede involucrar una endocitosis mediada por clatrina o caveolina. Así, las partículas virales son desensambladas dentro de endosomas y/o lisosomas tardíos, con la posterior transferencia del ADN viral al núcleo, evento facilitado por la proteína L2 (63, 64, 65).

5.2 Mantenimiento del genoma

El genoma vírico permanece como un elemento extracromosomal en forma de episoma. El virus replica su ADN para mantener un número de 50-100 copias de su genoma dentro de las células basales y parabasales. El patrón de expresión en estas células no está bien definido, pero generalmente, las proteínas E1 y E2 son expresadas para mantener el ADN viral como episoma y facilitar la correcta segregación de los genomas durante la división celular. Al dividirse la célula infectada, una de las células hijas permanece en la parte basal del epitelio mientras que la otra célula inicia el proceso de diferenciación en la parte superior del epitelio (65, 66, 67).

5.3 Fase proliferativa

En esta etapa, se da una marcada expresión de las proteínas E6 y E7, las cuales se unen a numerosos blancos celulares que controlan la progresión del ciclo celular. Así mismo, estas proteínas evitan la diferenciación celular (65, 66, 67).

5.4 Amplificación del genoma

En esta fase se da un aumento en el número de copias del genoma viral, dicha amplificación, inicia en un subgrupo de células de las capas superiores del epitelio. En esta fase, la activación del promotor dependiente de la diferenciación (el cual está contenido dentro del ORF de E7) es un evento crítico, al ser necesario para incrementar el nivel de proteínas virales necesarias para la replicación (E1, E2, E4 y E5) (65, 66, 67).

5.5 Ensamble del virus y liberación

Las proteínas de la cápside (L1 y L2), se acumulan una vez que se ha amplificado el genoma viral para encapsularlo. Los papilomavirus son no líticos y se liberan hasta que las células infectadas llegan a la superficie epitelial. La liberación de las partículas virales, se da mediante la actividad de E4, la cual, contribuye a la desestabilización de las redes de citoqueratina. En la figura 14, se muestra que el sitio de expresión de E4 es en las células suprabasales, lo que correlaciona con su función antes mencionada (65, 66, 67).

5.6 Infección abortiva

En la ausencia de regresión, las lesiones pueden persistir y en algunos casos, progresar a cáncer. Una característica común de los virus oncogénicos tumorales, es su capacidad para originar tumores en sitios donde su ciclo viral productivo no puede ser completado (65, 66, 67). Se sabe que la zona de transformación es un sitio particularmente susceptible al desarrollo de cáncer. Parece que los tipos de alto riesgo no pueden completar su ciclo en esta área, lo que ocasionalmente, conduce a una infección abortiva; cabe señalar que actualmente, aun no se tiene una explicación del por qué de este evento. La progresión de lesiones hacia cáncer microinvasor o invasor, se asocia con la integración del genoma del VPH al genoma del hospedero. En dicho proceso se pierde la integridad de E2, con la subsecuente expresión de los oncogenes E6 y E7 (65, 66, 67). El ciclo viral del virus del papiloma, se ha esquematizado en la figura 4.

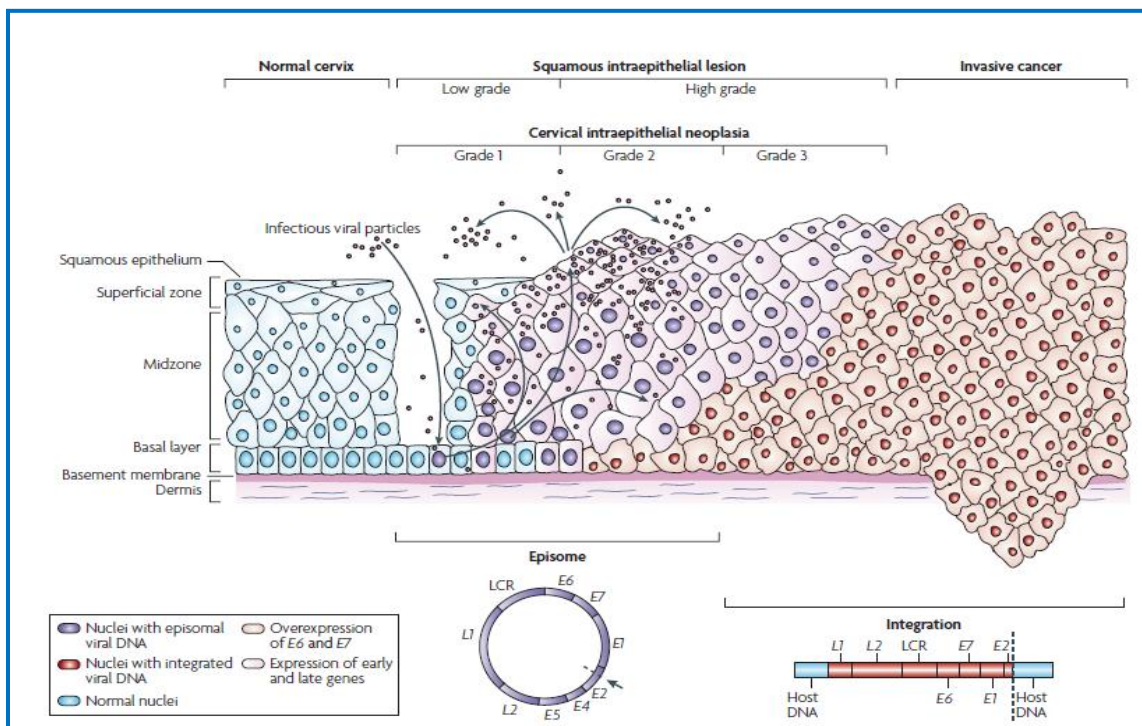


Figura 14. Ciclo del VPH en el epitelio estratificado. Los papilomavirus humanos ingresan a las células basales a través de microabrasiones en el epitelio cervical. Posterior a la infección, los genes tempranos E1-E7, son expresados, y se da la replicación del genoma viral. En las capas superiores del epitelio (zona media y superficial), el genoma viral eleva su tasa de replicación, y los genes tardíos L1, L2 así como E4, son expresados. L1 y L2 encapsulan el ADN viral, con lo cual, los viriones pueden iniciar una nueva infección. Las lesiones intraepiteliales de bajo soportan la replicación viral productiva. Un número no conocido de infecciones por VPH-AR progresan a una neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (HGCIN). La progresión de lesiones no tratadas a cáncer invasivo está asociada con la integración del genoma viral en los cromosomas del hospedero (núcleos rojos) (20).

JUSTIFICACIÓN

Lamentablemente el CaCu sigue representando un problema de salud pública en México. A pesar de que en la actualidad las vacunas profilácticas contra VPH, se han hecho accesibles a la población, los resultados no se verán sino hasta dentro de aproximadamente dos a tres décadas, cuando las niñas que actualmente se han vacunado, entren al grupo de riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino. Por otro lado, las vacunas existentes solo son profilácticas y brindan una protección limitada a ciertos tipos de papilomavirus, lo que deja abierta la posibilidad de que otros tipos virales aumenten su frecuencia de infección. De tal forma, no se puede dejar de lado el estudio de los eventos moleculares que se suscitan durante una infección por VPH, pues la comprensión de los mismos, nos brindará la probabilidad de lograr a largo plazo un tratamiento más eficiente.

A la fecha, no se conoce claramente el efecto biológico de E6*I de VPH 18. Por lo tanto, resulta importante determinar las funciones que esta proteína tiene sobre distintos procesos celulares, con el fin de entender el proceso carcinogénico inducido por el VPH.

Nuestro interés en este trabajo es el poder determinar cuál es la participación de E6*I del VPH 18 en la carcinogénesis del cérvix.

HIPOTESIS

- La expresión de gen E6*I de VPH18 en células transformadas, induce arresto en el ciclo celular de manera independiente a la presencia de VPH.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto de E6*I de VPH18, en la proliferación celular de manera independiente del VPH.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Clonar al gen E6*I en un vector de expresión a partir de muestras de cáncer cervicouterino positivas para VPH18.
- ❖ Realizar transfecciones estables y transitorias con el vector de expresión que contiene el gen E6*I, en líneas celulares negativas a VPH.
- ❖ Determinar el efecto de la expresión de E6*I sobre proliferación celular en distintas estirpes celulares.

MATERIALES Y METODOS

1. Líneas celulares y cultivo celular

El efecto de E6*I fue analizado en células negativas a VPH:

- ❖ **MCF7**: línea celular derivada de adenocarcinoma de mama, con p53 normal.
- ❖ **HaCaT**: queratinocitos inmortalizados, negativos a VPH y p53 mutado.
- ❖ **HeLa**: células de cáncer cervical con secuencias del VPH 18 integradas en su genoma.

Las diferentes líneas celulares y las clonas transfectadas derivadas de ellas, se crecieron en medio de cultivo DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, GIBCO) suplementado al 10% de suero bovino fetal (Fetal Bovine Serum, GIBCO). Estos cultivos se mantuvieron en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂ y a una temperatura de 37 °C.

2. Purificación del fragmento E6*I y clonación en un vector de expresión

El RNA total, fue obtenido a partir de biopsias de tumores de cérvix congeladas (positivas a VPH-18), mediante el método de Trizol (Invitrogen Life Technologies). Brevemente, el Trizol, es una solución monofásica constituida por isotiocinato de guanidina y fenol, componentes que promueven la lisis celular, pero mantienen la integridad del ARN. Después de la obtención del RNA total, este se trató con 1 U de DNasa I (Gibco-BRL). La cantidad y calidad del RNA, se determinó por espectrofotometría y análisis en geles al 2% de agarosa.

Posteriormente, para la obtención del cDNA, 2 µg totales de RNA, se sometieron a transcripción reversa con “Random” hexámeros y el sistema de síntesis de la primera cadena SuperScript para RT-PCR (Invitrogen Life Technologies). Enseguida, el cDNA obtenido se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos específicos de E6 de VPH 18

(cuadro 3) con sitios de restricción *Eco* RI y *Bam* HI para dirigir su clonación en el vector de expresión pcDNA 3.1 (Invotrogene). Previamente, se contaba con la construcción **pXJ 40 FT-E6*I**, teniendo como base el vector pXJ 40 FT (68). La figura 15 muestra la estructura de los vectores de expresión.

Cuadro 3. Para la amplificación de E6*I de VPH 18 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos.

| | | |
|--------------------------------|---------------|--|
| VPH-18 E6 5¹ | <i>Bam</i> HI | 5 ¹ -GGG GGA TCC ATG GCG CGC TTT GAA GAT CCA ACA - 3 ¹ |
| VPH-18 E6 3¹ | <i>Eco</i> RI | 5 ¹ -GGG GAA TTC TTA TAC TTG TGT TTC TCT GCG TCG - 3 ¹ |

Estos oligonucleótidos, permiten la amplificación de la secuencia completa de E6*I, que es de aproximadamente 313 pb. La reacción se sometió a 40 ciclos de amplificación.

Posteriormente, el producto de PCR, se sometió a electroforesis en geles de agarosa, de donde fueron aisladas exclusivamente las bandas correspondientes al gen E6*I y purificadas mediante el uso de columnas Qiagen (Qiagen, sample and assay technologies), un sistema basado en la solubilización y adsorción selectiva de ácidos nucleicos, por partículas constituidas por gel de sílice. La identidad de este material fue corroborada por secuenciación directa.

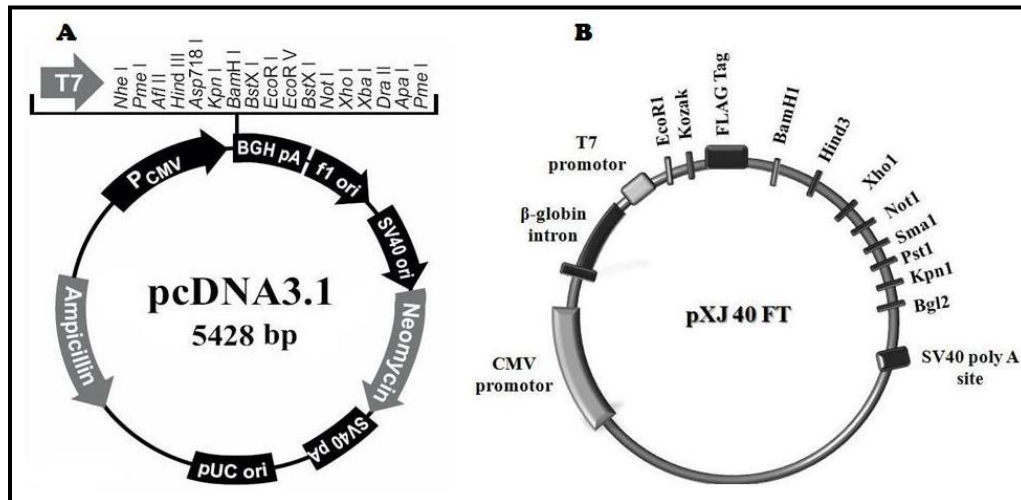


Figura 15. Vectores de expresión plasmídicos. A) Vector pcDNA3.1, posee un promotor de Citomegalovirus (CMV) y genes de resistencia a neomicina y ampicilina. B) Vector pXJ40 FT,

posee un promotor de Citomegalovirus y carece de genes de resistencia, ya que es utilizado para transfecciones transitorias.

Tanto el fragmento E6*I, como el vector de expresión, fueron digeridos con *Eco* RI y *Bam* HI y ligados con 1U de la enzima ligasa T4 (GIBCO) incubando a una temperatura de 16 °C por 12 horas. La construcción resultante se denominó **pcDNA3.1-E6*I**.

3. Competencia bacteriana

Para transformar las células bacterianas con los vectores anteriores, primero fue necesario hacer competentes a las bacterias. Para lo cual, se utilizó el método de cloruro de calcio, el cual a continuación se describe brevemente:

A partir de la cepa DH5 α , se tomó una pequeña muestra y se incubó en 5 ml de medio líquido LB (Luria – Bertani) a 37° C a 300 rpm durante una noche. Al día siguiente, se tomaron 500 μ l de este cultivo y se diluyó 1:10. Se dejó incubar a 37° C, 300 rpm durante aproximadamente 3 horas. Enseguida, se colocó el cultivo en hielo por 15 minutos y se obtuvieron las bacterias por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos a 4° C. Posteriormente, las células se resuspendieron en 25 ml de una solución fría de CaCl₂ 100 mM/ Tris 10 mM, pH 7.5. De esta forma las bacterias se tornaron competentes.

4. Transformación de células competentes con los productos de ligación

Se agregaron 100 ng de la construcción pcDNA3.1-E6*I en 200 μ l de las bacterias competentes DH5 α , se incubaron en hielo, por 30 min y luego se sometió a choque térmico de 42° C por 2 minutos. Se incubaron las células en hielo por 5 minutos, para luego agregar 800 μ l del medio LB. Se tomó una alícuota para luego sembrarla en cajas de Petri con medio LB – agar suplementado con 50 μ g / ml de ampicilina. Las cajas se incubaron a 37° C, por toda la noche.

5. Selección, amplificación y purificación del ADN de plásmido

Se seleccionaron clonas con el vector, se colocaron en 2 ml de medio LB suplementado con ampicilina (50 µg / ml) y se incubaron a 37° C, por toda la noche en agitación constante. Posteriormente, se purificó el plásmido con el uso de *QIAprep Spin Miniprep kit* (Qiagen, sample and assay technologies). Una vez efectuado lo anterior, se procedió a verificar la presencia del inserto mediante la digestión con las enzimas *Eco RI* y *Bam HI*, además de PCR.

Finalmente, para corroborar que el inserto colocado en el vector de expresión fuera el deseado, se realizó una secuenciación automatizada mediante ABI PRISM 3100 (PE Biosystems).

6. Transfecciones

Las líneas celulares MCF-7 y HaCaT, se transfectaron con los vectores de expresión pcDNA3.1-E6*I y pXJ 40 FT-E6*I respectivamente. Las transfecciones, se realizaron con el uso de liposomas catiónicos mediante el sistema Lipofectamine-plus reagent (Invitrogen). Fueron transfectados 2 µg de pcDNA3.1-E6*I y 3 µg de pXJ 40 FT-E6*I.

Para el caso de las células transfectadas con el vector pcDNA3.1-E6*I, estas fueron seleccionadas tratadas con G418 (Geneticina) durante 3 semanas con el fin de obtener clonas estables. La línea celular HaCaT, fue transfectada de manera transitoria y se utilizó para evaluar el probable efecto agudo de la expresión de E6*I.

Una vez obtenidas las clonas estables y transitorias, el paso siguiente fue el confirmar la integración o presencia de los genes transfectados en las células. Esto se efectuó aislando el ADN de las células MCF-7 y HaCaT haciendo uso de buffer de lisis Proteinasa K. La purificación del ADN se realizó mediante fenol-cloroformo, precipitándolo con etanol absoluto y acetato de amonio 7.4 M frío.

El ADN aislado se cuantificó por espectrofotometría y se amplificó mediante PCR para E6*I de VPH 18. El control positivo para esta reacción fue ADN de la línea celular HeLa.

7. Análisis de la expresión del gen E6*I de la líneas celulares

Para verificar la expresión del ARNm de E6*I en los sistemas celulares, se efectuó la extracción del ARN celular total por medio de Trizol (Invitrogen Life Technologies). En primer lugar, se le agregó 1ml de Trizol a un frasco de cultivo de 25 cm². El lisado celular, se coló en tubos de 1.5 ml, a los que se les agregó 200 µl de cloroformo, posteriormente se sometió a centrifugación. El sobrenadante fue colocado en tubos nuevos y se les agregó 500 µl de isopropanol. El material fue lavado con etanol al 75% diluido en dietilpirocarbonato. Finalmente, el RNA se diluyó en agua libre de RNasa y fue tratado con DNasa para evitar la presencia de ADN que pudiera interferir con los resultados.

2 µg de RNA, se sometió a un ensayo de RT-PCR, con “Random” hexámeros y el sistema de síntesis de la primera cadena SuperScript para RT-PCR (Invitrogen Life Technologies). Enseguida, el cDNA obtenido, se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos específicos de E6 de VPH 18 y el producto obtenido, se corrió en un gel al 2% de agarosa.

8. Evaluación de viabilidad celular por cristal violeta

Para el primer ensayo, que correspondió a la evaluación del efecto de E6*I en células MCF-7, se utilizaron como controles células MCF7 que contenían al vector pcDNA3.1 sin inserto; y células MCF-7 con pcDNA3.1-E6 de la variante Europea (VPH18). Para este caso, se realizaron 3 ensayos por triplicado, en los que se evaluó la densidad celular a lo largo de 24, 48 y 72 horas.

Se sembraron 2×10^5 células/pozo con DMEM –F12 con 10% SBF. Durante 12 horas, se permitió que las células se adhirieran, posteriormente se sustituyó el medio por DMEM/F12 sin suero. Las células permanecieron durante 24 horas en medio sin suero con el fin de sincronizarlas en fase G0. Pasadas las 24 horas, se sustituyó ahora el medio sin

suero por DMEM/F12 al 10% de SBF. Después, se retiró el medio de cultivo y los pozos se lavaron dos veces con 2 ml de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline). Posteriormente, las células se fijaron con una solución de formaldehído al 10% en agitación durante un lapso de 15 minutos. Enseguida, el formol fue retirado y los pozos se lavaron nuevamente con PBS en dos ocasiones; la caja se almacenó a 4 °C. Este procedimiento se efectuó con las cajas de 48 y 72 horas.

A las células fijadas, se les retiró el PBS y a cada pozo se le colocaron 500 µl de cristal violeta al 0.1% en PBS, las cajas se colocaron en agitación durante 15 minutos. El cristal violeta, es un colorante cargado positivamente, que posee la capacidad de combinarse con los constituyentes celulares cargados negativamente, tales como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos. Esta característica permite utilizarlo para teñir células fijas (69).

Posteriormente, las células fueron lavadas con agua destilada para eliminar el exceso de tinción. Se les añadió ácido acético al 10% para eluir el colorante incorporado por las células. De cada pozo se tomaron 100 µl, que fueron leídos en un espectrofotómetro (Labsystems Multiskan MS MCC/340) a una absorbancia a 570 nm.

Todo el procedimiento anterior se realizó de igual forma con las células HaCaT. Sin embargo, en la evaluación del efecto de E6*I en células HaCaT, se utilizaron como control células HaCaT con el vector pXJ 40 FT sin inserto, y la densidad celular sólo fue evaluada a 24 y 48 horas, además de que el lapso de sincronización celular solo fue de 4 horas.

9. Evaluación de proliferación celular por citometría de flujo

La citometría de flujo, es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido, que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Una de las características más importantes de los citómetros de flujo, es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad celular. Así, como cualquier componente o función que pueda ser marcada con un fluorocromo.

La citometría de flujo, es capaz de proporcionar una información cuantitativa sobre cada célula en particular y permite identificar en una muestra, subpoblaciones de células diferentes, incluso cuando están escasamente representadas.

La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de la luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula, al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas, se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y convierten en señales digitales, que son procesadas por una computadora, figura 16 (73). Este principio se resume en la figura 19.

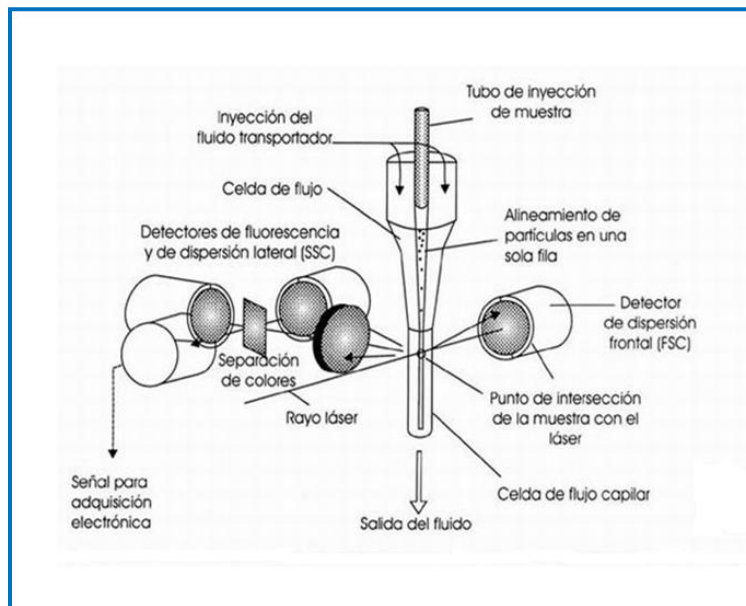


Figura 16. Principio general de la citometría de flujo.

Para poder analizar el ciclo celular se empleó la técnica basada en detergente y enzima proteolítica, la cual, consiste en aislar y teñir núcleos (ADN) con el colorante yoduro de propidio, (71).

Para esta técnica, se sembraron 6×10^5 células MCF7-7 transfectadas con el vector pcDNA3.1-E6*I y vector vacío, así como las que expresan al gen E6 completo, ambas, se sincronizaron mediante la restricción de SBF. Después de 24 horas de restricción, se añadió medio suplementado con SBF y las células se dejaron crecer durante 48 horas, a

continuación fueron fijadas con etanol al 70% a una temperatura de -20°C . Posteriormente se realizó el siguiente procedimiento:

- La células fueron lavadas con PBS 1x en dos ocasiones, enseguida se agregaron 500 μl de la solución A (promueve la ruptura de membranas celulares, citrato de sodio 3.4 mM, 500 μl , Nonidet P-40, tetracloruro de espermina 1.5 mM y tris 0.5 mM, a 100 ml de esta solución concentrada se agregaron 30 mg de tripsina y se ajustó a $\text{pH}=7.6$) y se incubaron 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 500 μl de la solución B (detiene la actividad de la solución A, a 100 ml de la solución concentrada agregar 50 mg de inhibidor de tripsina, 10 mg de Ribonucleasa y ajustar a $\text{pH}=7.6$) incubándolas por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 500 μl de la solución C (tiñe el ADN, a 100 ml de la solución concentrada agregar 41.6 mg de yoduro de propidio), y se incubaron por 15 min en hielo.
- La medición por citometría de flujo, se realizó utilizando el equipo FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado con un laser de excitación para PI y filtros ópticos para su emisión de fluorescencia. Se analizaron 20,000 eventos sobre una escala lineal para cada muestra. Se examinó la distribución de frecuencia del contenido de ADN, mediante el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular para el caso de proliferación celular.

Cada experimento se realizó por duplicado, teniendo como control las células MCF-7 transfectadas con el vector pcDNA3.1

10. Ensayo de TUNEL para células apoptóticas

La degradación controlada de ADN nuclear en unidades nucleosómicas es un marcador de apoptosis, sin embargo, no todas las células que ingresan en este evento exhiben dicha actividad. La degradación ADN genómico ocurre en dos pasos. Primero, los cromosomas son cortados en fragmentos que van de los 50-300 kb. Así, la degradación del ADN inicia. Las endonucleasas dependientes de Ca^{+2} y Mg^{+2} endógenos, cortan la cromatina en los sitios internucleosomales, lo que produce fragmentos de ADN de aproximadamente 180 a

200 pb. El ADN degradado en unidades nucleosomales se asemeja a un marcador de peso molecular, que posee incrementos de 180 pb cuando es visualizado por medio de electroforesis en geles de agarosa.

Mediante el ensayo de detección de apoptosis *in situ* conocido como TUNEL [Marcación de Cortes Terminales con dUTP-biotinilada (desoxiuridina trifosfato) mediada por la polimerasa desoxittransferasa terminal (TdT)], es posible identificar células individuales que están cursando por un evento apoptótico. Esto se hace marcando con TdT, los sitios terminales de ADN degradado. La TdT, cataliza la adición de dNTPs (deoxinucleótidos trifosfato) al extremo 3^l-OH del ADN. Cuando los nucleótidos marcados (ya sea con biotina, fluoresceína, etcétera) son incorporados por la TdT, los núcleos con ADN degradado pueden ser identificados por técnicas inmunohistoquímicas o inmunofluorescentes. Este principio es ejemplificado mediante la figura 17 (72).

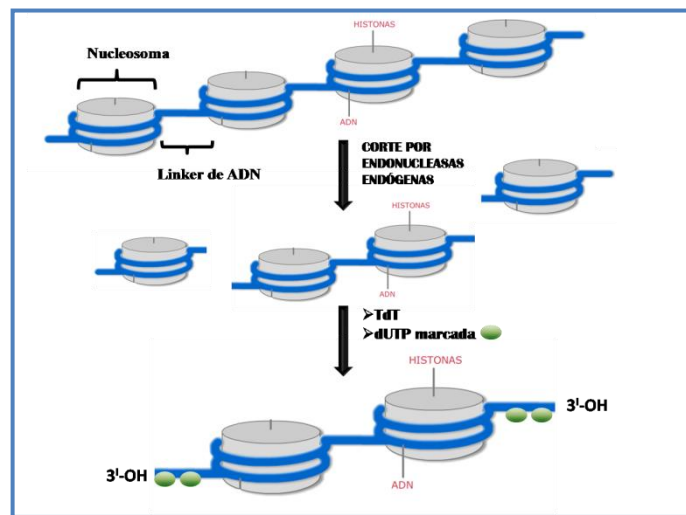


Figura 17. Marcaje mediante el ensayo de TUNEL de la cromatina degradada. Durante la apoptosis, las endonucleasas cortan el ADN en las regiones “linker” entre los nucleosomas. Los multímeros nucleosómicos resultantes son marcados por TdT y dUTP. Fuente: <http://www.medmol.es/glosario/23/>, modificado (73).

Para esto, 1×10^5 células MCF-7 y HaCaT, fueron sembradas sobre cubreobjetos previamente colocados en cajas de 6 pozos. Como controles, se utilizaron células con los vectores vacíos respectivos (pcDNA3.1 y pXJ 40). Para el caso de las células MCF-7,

también se utilizó el control del plásmido con la variante Europea. Como controles del experimento, se usaron células MCF-7 y HaCaT sin transfectar, un control fue permeabilizado y otro fue tratado con DNasa. Las células se sincronizaron mediante la restricción de SBF. Después de 24 horas de restricción se añadió medio suplementado con 10 % SBF y las células se dejaron crecer durante 48 horas. Posteriormente fueron lavadas dos veces con PBS durante cinco minutos. Enseguida, las células se fijaron en formaldehído al 4% (en PBS pH=7.4) durante 20 minutos, lavándolas después dos veces con PBS durante 5 minutos. Las células se permeabilizaron con Tritón-X al 0.2% durante 5 minutos a 4 °C. Nuevamente las células se lavaron con PBS, y se procedió a tratarlas con la mezcla de TUNEL, solución que contiene a la enzima desoxittransferasa terminal y desoxinucleótidos marcados con fluoresceína.

11. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los promedios, se empleó la prueba paramétrica de t de “Student” y un ANOVA de una sola vía, (para los ensayos de cristal violeta), tomando un $\alpha < 0.05$.

RESULTADOS

1. Clonación del gen E6*I en el vector de expresión pcDNA 3.1

Para comprobar que la construcción pcDNA 3.1/E6*I contenía el gen de interés, se realizaron digestiones. La figura 18, muestra el resultado de la digestión del plásmido recombinante obtenido mediante la clonación del gen E6*I en pcDNA 3.1. Con ayuda del marcador de peso molecular, se identificó que el fragmento clonado correspondía al gen de interés, el cual, posee una longitud de 313 pb.

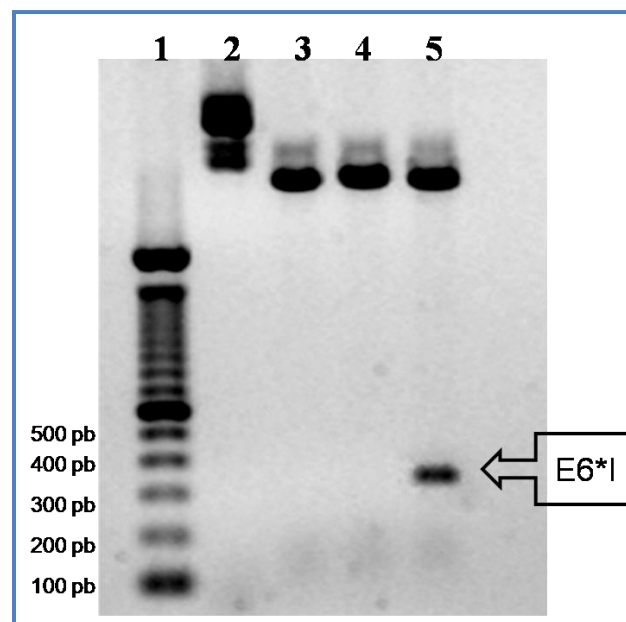


Figura 18. Digestión del plásmido pcDNA 3.1 con el gen E6*I clonado (313 pb). Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2: plásmido sin digerir. Carril 3: digestión parcial con *Eco* RI. Carril 4: digestión parcial con *Bam* HI. Carril 5: doble digestión con *Eco* RI y *Bam* HI. Mediante la doble digestión se observa la liberación del inserto E6*I.

2. Análisis de la expresión del producto E6*I en la línea celular MCF7

Con el fin de determinar si E6*I se expresaba en las células transfectadas establemente con el vector pcDNA 3.1/E6*I, se realizaron ensayos de RT-PCR. Como se muestra en la figura 19, se logró amplificar un fragmento de 313 de bases compatible con E6*I.

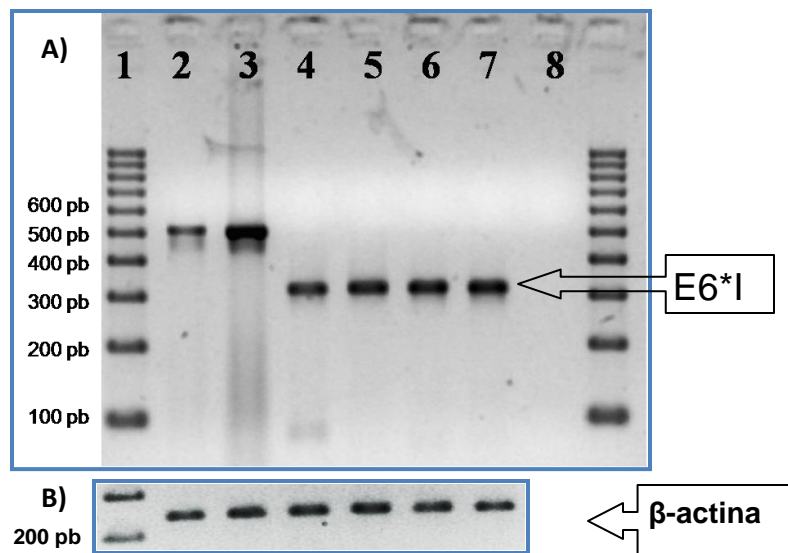


Figura 19. Análisis de la expresión del mRNA de E6*I (313 pb) en células MCF7 transfectadas establemente con el vector pcDNA 3.1/E6*I, por medio de RT-PCR con oligonucleótidos específicos para E6. A) Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb). Carril 1 y 2: control positivo, DNA de HeLa. Carriles 4-7: cDNA de E6*I. Carril 8: control negativo. B) β-actina.

3. E6*I del VPH 18 disminuye significativamente la densidad celular sin la participación de la proteína E6

En la literatura, se ha descrito que E6*I del VPH 18 promueve un efecto antiproliferativo en células positivas a VPH. Este fenómeno, se debe primordialmente a la capacidad de E6*I de unirse a E6 de longitud completa, así como a la ligasa de ubiquitina E6-AP, inhibiendo la degradación de la proteína p53 (59).

Para investigar si E6* puede inducir este efecto antiproliferativo independientemente de la presencia de E6 completo, se realizaron ensayos de proliferación celular, mediante el método de cristal violeta, en células MCF7 transfectadas con E6*I, a las 24, 48 y 72 horas. En cada caso, se utilizaron como controles, células transfectadas con el vector pcDNA 3.1 vacío.

Los resultados indican que las células MCF7 transfectadas con el vector pcDNA 3.1/E6*I, mantuvieron una densidad celular significativamente menor ($p < 0.05$), con respecto a las células control, que se muestra en las gráficas que conforman la figura 20. La disminución

en viabilidad en las células que expresan E6*I se observa desde las 24 horas posteriores a la sincronización celular. En relación a las células transfectadas con el vector vacío, el porcentaje de disminución en viabilidad celular fue similar: a las 24 horas se observó una disminución del 45%; a las 48 horas, la disminución fue del 40%; y a las 72 horas, del 42%, esto en comparación con su control respectivo.

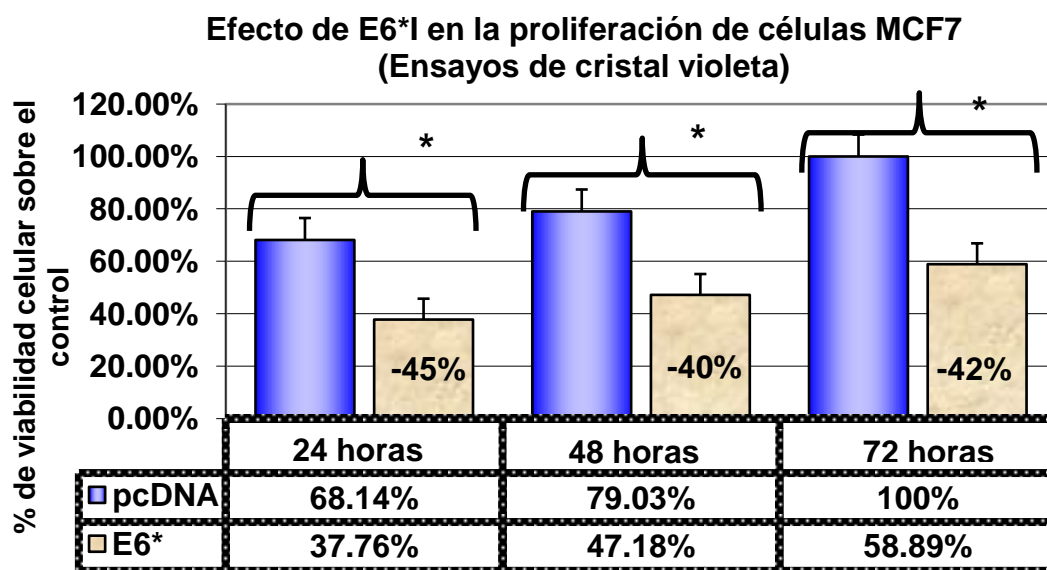


Figura 20. Viabilidad celular de la línea MCF7 transfectada establemente con el vector pcDNA 3.1 vacío y con pcDNA 3.1/E6*I a las 24, 48 y 72 horas. Las barras azules muestran la viabilidad sobre el control de las células transfectadas con el vector vacío, mientras que las barras de color café indican la viabilidad de las células transfectadas con el vector que expresa E6*I. La viabilidad sobre el control, de las células que expresan a E6*I, fue menor que la de las células transfectadas con el vector pcDNA 3.1 vacío ($p < 0.05$ con la prueba t-Student y un ANOVA de una sola vía, $p < 0.05$).

La densidad celular, también fue evaluada en la línea celular HaCaT transfectada transitoriamente y la evaluación fue a las 24 y 48 horas, esto nos permitió visualizar el efecto agudo de E6*I.

El patrón observado en esta línea celular, fue similar al presentado por las células MCF7. Sin embargo, el efecto antiproliferativo promovido por E6*I, no fue tan marcado como en las células MCF-7. A pesar de esto, hay un efecto estadísticamente significativo a partir de las 24 horas posteriores a la transfección. La densidad para las células HaCaT transfectadas con E6*I, fue menor ($p < 0.05$) a la que presentaron por las células HaCaT transfectadas

con el vector p40 vacío. Estas diferencias pueden observarse en la figura 21. En relación a las células transfectadas con el vector vacío, el porcentaje de disminución en viabilidad celular fue de 18.7% a las 24 horas post-transfección, mientras que a las 48 horas la disminución fue del 31%. Esta diferencia podría indicar diferencias en la expresión de E6*I a lo largo del tiempo en las transfecciones transitorias.

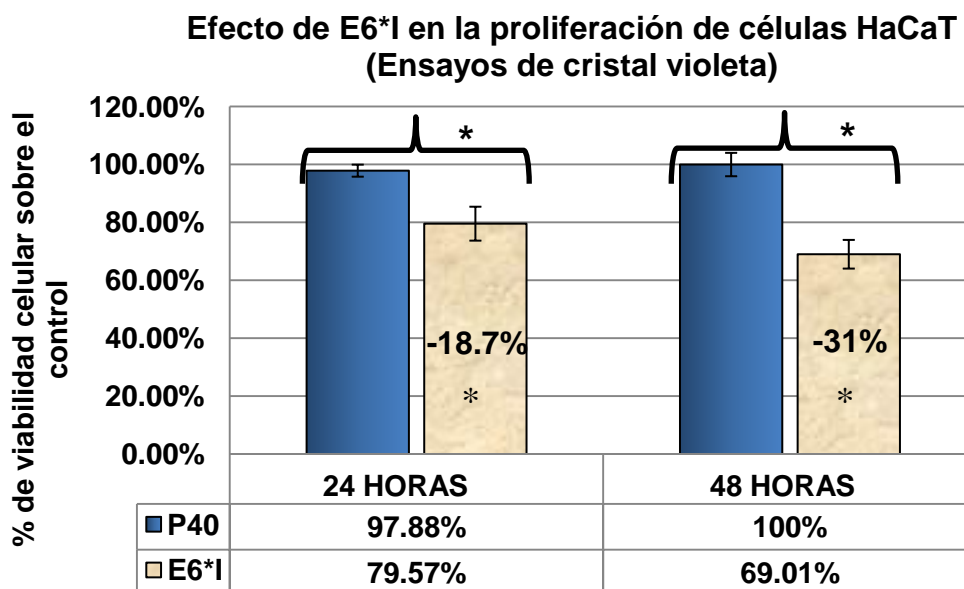


Figura 21. Viabilidad de las células HaCaT transfectadas transitoriamente con el vector pXJ 40 FT (p40) y con pXJ 40 FT-E6*I. La densidad celular se evaluó a las 24 y 48 horas de crecimiento por medio del colorante cristal violeta. Las barras azules muestran la viabilidad de las células transfectadas con el vector vacío, mientras que las barras de color café indican la viabilidad de las células transfectadas con el vector que expresa E6*I. La densidad de las células que expresan a E6*I fue menor que la de la células transfectadas con el vector pXJ 40 FT, ($p < 0.05$ con la prueba t-Student); además, se presentaron diferencias entre las 24 y 48 horas (ANOVA de una sola vía, $p < 0.05$).

4. E6*I induce un aumento en la subfase G₀ en células MCF7

Con base en los resultados obtenidos mediante el ensayo de cristal violeta, se procedió a determinar si la disminución en la densidad celular, era debida a un paro en alguna fase del ciclo celular, o a una inducción de muerte por apoptosis. Para ello, primero, el contenido de ADN de las células MCF7 transfectadas establemente con el vector pcDNA3.1-E6*I fue analizado por citometría de flujo.

Diferencias significativas ($p < 0.05$) en la distribución del ADN fueron encontradas en las células transfectadas con el vector pcDNA3.1-E6*I con respecto a los controles (células MCF7 transfectadas con el vector pcDNA vacío y células MCF7 transfectadas con E6 variante Europea). En la figura 22, se muestran los histogramas que indican la distribución de la población en cada fase del ciclo celular. Mediante este análisis, se observó un incremento en la subfase G_0 , lo que podría indicar muerte celular. El 18.9 % de las células con E6*I se situaron dentro de esta área, mientras que para los controles, fue menor el número de células localizadas en esta subfase, se tuvo un 1.91% y un 4.33% para las poblaciones celulares MCF7-pcDNA y MCF7-E6 Var Europea respectivamente.

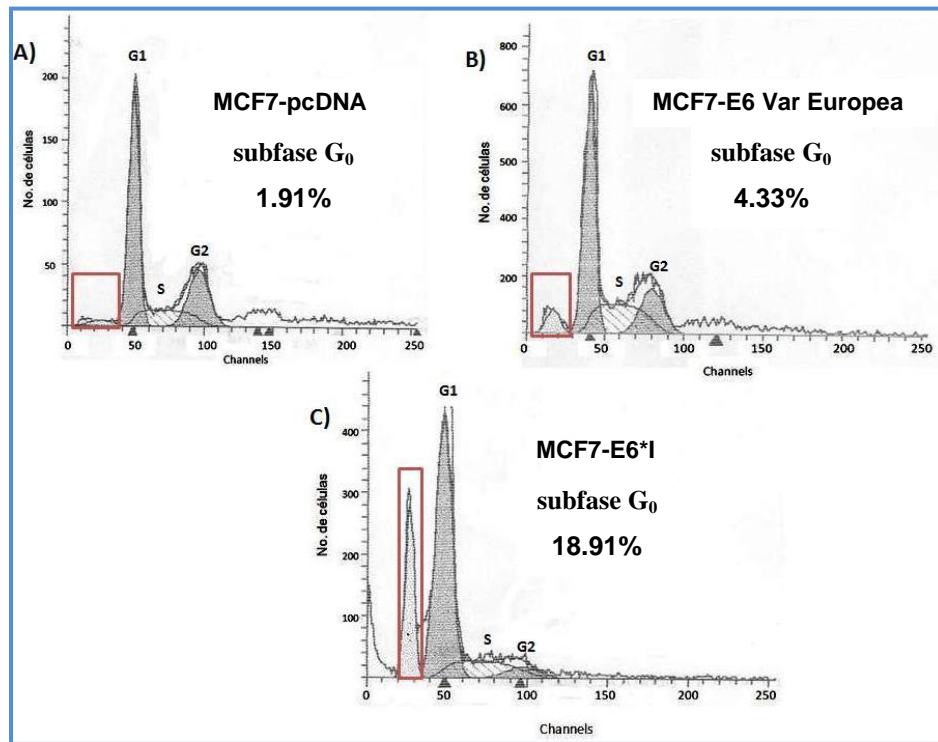


Figura 22. La expresión de E6*I promueve un incremento en la subfase G_0 que indica un proceso de muerte celular. Se realizaron ensayos de citometría de flujo con el colorante yoduro de propidio y el análisis se realizó a las 48 horas después de la sincronización, en células MCF7 transfectadas con el vector pcDNA vacío (A), con la variante Europea de E6 (B), y con E6*I del VPH 18 (C). Los histogramas representan los resultados mostrados en el cuadro 3. En el histograma, el cuadro rojo indica la subfase G_0 .

El cuadro 4 muestra los porcentajes de células observados en cada una de las fases del ciclo celular.

| Células | G0/G1 | S | G2 | Subfase G ₀ |
|------------------------|----------------|----------------|--------------|------------------------|
| MCF7-pcDNA | 56.785 ± 1.37 | 24.16 ± 4.84 | 19.05 ± 6.02 | 1.9175 ± 1.23 |
| MCF7-E6 Var Europea | 39.325 ± 16.58 | 46.955 ± 23.17 | 13.72 ± 6.11 | 4.33 ± 1.81 |
| MCF7-E6*I | 64.5625 ± 11.5 | 33.47 ± 13.44 | 1.97 ± 2.93 | 18.9125* ± 6.4 |

Cuadro 4. Se muestran los porcentajes de células MCF7 transfectadas establemente (con E6*I, E6 variante Europea y pcDNA) en cada fase del ciclo celular. Los resultados se expresan como el promedio de dos experimentos.

* Diferencia significativa ($p < 0.05$ con la prueba t-Student) entre las células transfectadas con E6*I y las células control (células MCF7 transfectadas con el vector pcDNA vacío y células MCF7 transfectadas con la variante Europea)

5. E6*I del VPH 18 induce apoptosis en células MCF7 y HaCaT

Para corroborar si la población celular localizada en la subfase G₀, estaba en un proceso apoptótico, se procedió a evaluar la inducción de apoptosis en las células MCF7/E6*I, MCF7-pcDNA y MCF7-E6 Var Europea; así como en HaCaT-pXJ 40 FT y pXJ 40 FT-E6*I, mediante el ensayo de TUNEL.

En la figura 23, se muestra la fragmentación del ADN en células MCF7. Como control positivo de la técnica, las células MCF7 sin transfectar fueron permeabilizadas y tratadas con DNasa para promover el rompimiento del ADN (**A-B**). Como control negativo de la técnica, las células MCF7 sin transfectar fueron permeabilizadas (**C-D**). Posteriormente los cultivos se trataron con la mezcla de TUNEL (solución que contiene a la enzima desoxittransferasa terminal y desoxinucleótidos marcados con fluoresceína). **F-J** muestran de igual manera la fragmentación del ADN en células MCF7- pcDNA (**E-F**), MCF7-E6 Variante Europea (**G-H**) y MCF7/E6*I (**I-J**). En el cuadro J, la fluorescencia emitida por los núcleos celulares es evidente, lo que nos indica un proceso apoptótico. Además, hay un número mayor de células en apoptosis en comparación con las células control (MCF7-pcDNA y MCF7-E6 Variante Europea)

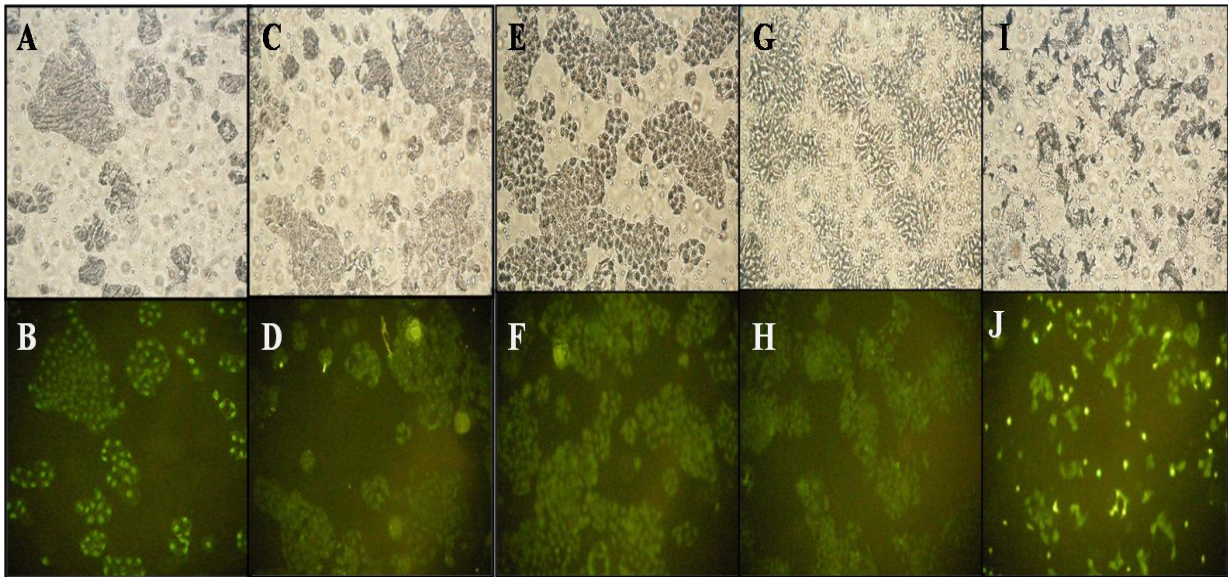


Figura 23. Ensayo de apoptosis en células MCF7. (A-B) control positivo, MCF7 tratadas con DNasa; (C-D) control negativo, células únicamente permeabilizadas. MCF7 pcDNA (E-F), MCF7-E6 Var Europea (G-H) y MCF7/E6*I (I-J).

En la figura 24 se muestra el porcentaje promedio de células con señal de apoptosis en relación al total de las células observadas en 3 campos distintos.

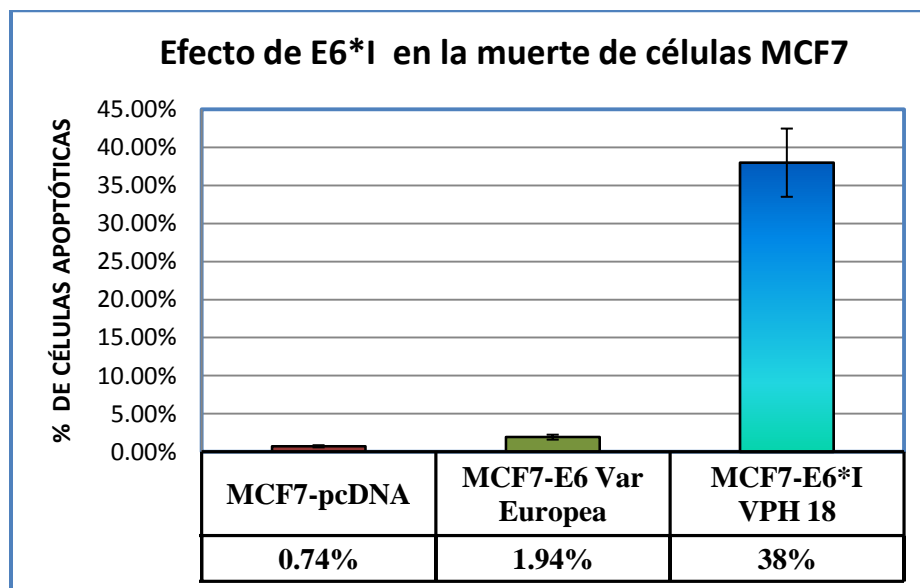


Figura 24. Porcentaje de células MCF7 apoptóticas evaluadas por la técnica de TUNEL.

Para la línea celular HaCaT, las células transfectadas con E6*I presentan niveles superiores de apoptosis en comparación con las células control (HaCaT-pXJ 40 FT), esto se observa en el cuadro H, donde la fluorescencia emitida por los núcleos celulares es evidente, lo que nos indica que hay rompimiento del ADN, mientras que en el cuadro F los niveles de fluorescencia nuclear son menores (Fig. 25).

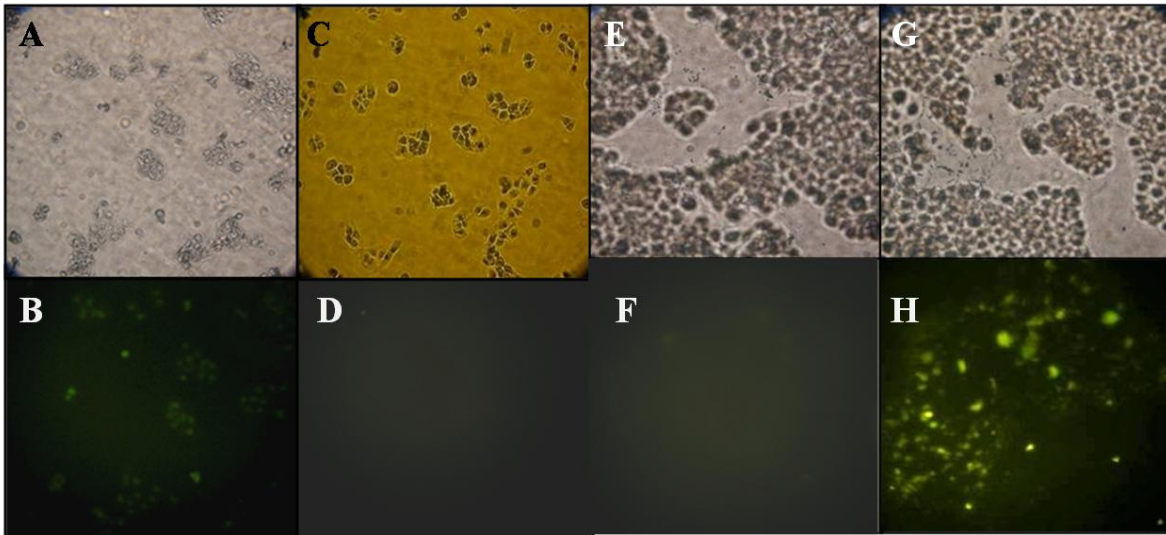


Figura 25. Ensayo de TUNEL en células HaCaT-pXJ 40 FT (A-H). A-D controles del experimento: (A-B) control positivo, MCF7 tratadas con DNasa y con mezcla de TUNEL; (C-D) control negativo, células permeabilizadas y tratadas con la mezcla de TUNEL (C-D). (E-F) Células HaCaT-pXJ 40, (G-H) HaCaT-pXJ 40 FT/E6*I.

En la figura 26, se muestra el porcentaje promedio de células con señal de apoptosis con relación al total de las células observadas.

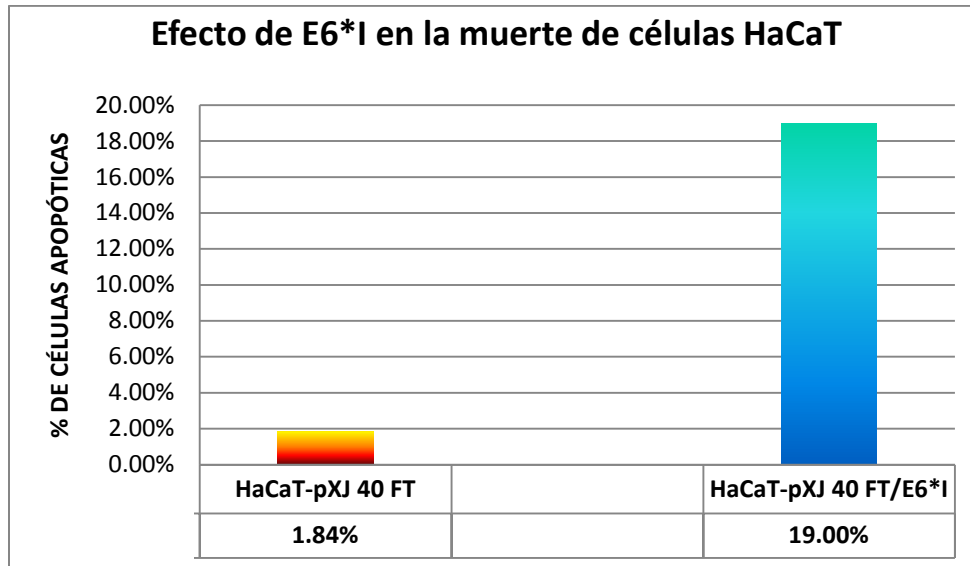


Figura 26. Porcentaje de células HaCaT en estado apoptótico evaluadas por la técnica de TUNEL

Los ensayos de TUNEL, muestran que uno de los papeles biológicos de E6*I en células sin Virus del Papiloma Humano, es el de promover la apoptosis celular, lo cual se demostró al efectuar los ensayos en dos líneas celulares distintas: por un lado, en MCF7, línea celular derivada de adenocarcinoma de mama; y en HaCaT, queratinocitos inmortalizados. En ambos casos, E6*I de VPH 18 promovió el rompimiento del ADN.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se demostró el papel pro-apoptótico de E6*I en líneas celulares carentes del genoma del VPH.

Es importante resaltar que el efecto pro-apoptótico de E6*I se observó tanto en transfecciones transitorias, como estables. Para ello se utilizaron los vectores pXJ 40 FT y pcDNA3.1 respectivamente, ambos con el mismo promotor (CMV). Consideramos que en una transfección transitoria el efecto de E6*I podría ser más evidente, dado que en una transfección estable en donde la expresión de E6*I podría ser constante, las células pudieran adaptarse al efecto de dicha proteína. Sin embargo, los ensayos de cristal violeta mostraron que la única diferencia entre los dos modelos es que en la transfección transitoria el efecto de E6*I era dependiente del tiempo, observándose el mayor efecto en la disminución de la densidad celular a las 48 horas post-transfección (**ANOVA de una sola vía, $p < 0.05$**). En contraste, en la transfección estable el efecto fue constante durante las mediciones, realizadas a distintos tiempos después de sincronizar a las células. Actualmente se están realizando experimentos que implican transfecciones transitorias con el vector pcDNA 3.1/E6*I en distintas estirpes celulares, incluida MCF7, con lo cual, se descartaría la variable del vector en nuestros experimentos, además de estudiar el comportamiento de E6*I en diversos contextos celulares.

Una de las funciones más estudiadas de la oncoproteína E6 de los VPHs de alto riesgo, es su capacidad para unirse e inducir la degradación de p53, a través de la vía del proteosoma. Al respecto, se ha reportado que E6*I es un regulador de dicha función, debido a su capacidad de unirse tanto a la ligasa de ubiquitina E6-AP, como a E6 de longitud completa, lo que evita que p53 sea degradado. Estos eventos, resultan en una disminución de la proliferación celular.

Por otro lado, se han documentado diferencias en los patrones de procesamiento alternativo entre las variantes del VPH 18 que originan proporciones diferenciales de E6*I, siendo la variante Africana, la que presenta un mayor porcentaje de este transcrito. Esta variante se

ha asociado a un menor potencial oncogénico, puesto que las células transfectadas con el gen E6 completo de esta variante, presentan menor capacidad transformante **(21)**, así como una tasa de crecimiento tumoral más baja en comparación con las células transfectadas con las variantes que presentan una expresión menor de E6*I.

En resumen, estos resultados, proponen un papel para E6*I como regulador de las funciones de E6, tales como la inmortalización y transformación celular.

A la fecha, poco se conoce sobre el efecto de E6*I en la ausencia de productos génicos del VPH. Algunos trabajos, han propuesto que E6*I del VPH 18, en células sin VPH, promueve una disminución en la expresión de la proteína Akt, lo que traería consigo una disminución en la proliferación celular y un aumento en la apoptosis **(62)**.

En este trabajo, determinamos que la expresión de E6*I del VPH 18, disminuye la viabilidad celular significativamente, en ausencia de la oncoproteína E6 completa **(Fig. 20, 21)**. Estos datos se correlacionan con los reportes de Pim y col., donde observan una disminución en la proliferación celular en líneas positivas a VPH **(59)**.

No se conoce el mecanismo implicado en la disminución de la viabilidad celular inducida por E6*I en sistemas ausentes de papilomavirus, sin embargo, en este trabajo determinamos que la expresión de E6*I induce un aumento en el número de células en la fase subG₀ del ciclo celular, indicando la existencia de muerte celular **(Fig. 22)**. Finalmente los ensayos de TUNEL, mostraron la presencia de un mayor porcentaje de células apoptóticas en las líneas MCF7 y HaCaT transfectadas con E6*I, en ausencia de E6 completo **(Fig. 24, 26)**. Estos resultados se relacionan con el trabajo de Pim y col., en el que muestran que E6*I del VPH 18, en células sin VPH, promueve una disminución en la actividad de la proteína Akt **(62)**. Akt es una proteína que juega un papel clave en la regulación de la proliferación y apoptosis celular, promoviendo o inhibiendo respectivamente ambos procesos. Uno de los mecanismos por los cuales Akt inhibe la apoptosis, es fosforilando directamente a la caspasa 9, impidiendo así su actividad **(74)**. Por lo tanto, si E6*I es capaz de disminuir la

actividad de Akt, no se promovería la inhibición de apoptosis. Esta podría ser una de las razones por las cuales, nuestros experimentos de TUNEL muestran un mayor porcentaje de células apoptóticas en las líneas celulares transfectadas con E6*I. Por otro lado, Filippova y col. (61), muestran que E6*I del VPH 16, es capaz de estabilizar a la procaspasa 8, lo que promovería la apoptosis. Esta actividad podría ser similar para el caso E6*I de VPH 18. Mediante estas dos vías, sería probable que E6*I ejerciera un efecto apoptótico.

Cabe destacar que la línea celular MCF7 es deficiente en caspasa 3 (75), rasgo que no le impidió a E6*I promover la apoptosis celular. Probablemente, la actividad de las caspasas efectoras 6 y 7 sea suficiente para culminar en un fenotipo apoptótico, las cuales podrían ser blanco de E6*I.

Si bien es cierto, que el análisis por citometría de flujo arrojaría los mismos datos que el ensayo de cristal violeta, no consideramos que sea redundante el haber efectuado ambos experimentos. El ensayo de cristal violeta nos indicó a grandes rasgos la presencia de un efecto promovido por E6*I, el cual fue la disminución en la viabilidad celular. Esto nos dio pie a usar técnicas que nos permitieran medir características particulares de las células, como lo es el caso de la citometría de flujo, donde se mide la distribución de DNA en las distintas subpoblaciones celulares. Ambos experimentos, respaldan fuertemente el efecto antiproliferativo observado por E6*I en nuestras líneas celulares. La citometría de flujo además mostró que E6*I no promueve un arresto celular (fase G0/G1).

Los experimentos sobre la línea celular HaCaT, arrojaron resultados relevantes. Uno de ellos, es que el efecto apoptótico de E6*I es independiente de p53, ya que en HaCaT, esta proteína supresora de tumores no es funcional. Las mutaciones de p53 en las células HaCaT se encuentran en sitios dipirimidina localizados en el codón 179 del exón 5, y en los codones 281 y 282 del exón 8, y son típicas de un daño inducido por radiación ultravioleta (sustituciones de bases de tipo CC---TT). Estos cambios están implicados en el mecanismo de inmortalización de esta línea celular (76).

Nuestro trabajo, da a conocer una nueva actividad de E6*I en células sin VPH, que es la de promover la apoptosis celular, lo que es un hallazgo de gran relevancia, pues a pesar de que E6*I únicamente estaría presente en el contexto de una infección por VPH, las características pro-apoptóticas de este producto, podrían ser utilizadas en algún futuro (posterior a una investigación más profunda) como un posible agente antitumoral.

Además de lo anterior, se demuestra que dentro de una infección por VPH, E6*I juega un papel importante no solo en la regulación de E6, sino también, en la de otras proteínas celulares. Esto da pie a verificar cuales son los elementos involucrados en la promoción de la apoptosis celular promovida por E6*I, tales como las caspasas efectoras 6 y 7, así como caspasa 9, proteína estructural del apoptosoma (77). También, sería relevante estudiar la actividad de PI3K, que es una proteína activadora de Akt. Algunos de estos aspectos, ya están siendo estudiados en nuestro laboratorio.

Por el momento, aterrizando nuestra investigación en el campo del cáncer cervicouterino, la proteína E6*I podría estar jugando un papel relevante en la progresión de la infección por VPH. Como se mencionó, dentro de los papilomavirus de alto riesgo, el tipo 18 es de particular importancia, pues se ha asociado con tumores de peor pronóstico clínico, comparado con aquellos que poseen el tipo 16 (21). Sin embargo, el tipo 18, algunas veces se identifica en lesiones con una morfología de bajo grado, en contraste a las lesiones de alto grado asociadas con el VPH 16. Lizano et al. (1997), identificaron tres diferentes aislados del VPH 18 en la población mexicana, y encontraron una asociación aparentemente exclusiva entre el aislado con la variante Africana y el carcinoma de células escamosas, en contraste a las variantes Asiático Amerindia y Europea que estuvieron asociadas a diversos tipos histológicos de peor pronóstico (adenocarcinoma y carcinoma de células pequeñas) (78). Estos eventos sugieren un comportamiento biológico distinto entre las variantes del VPH 18. Una propuesta, es que este comportamiento se puede correlacionar con las variaciones en los niveles de los transcritos de E6 y E6*I, siendo la variante Africana, la que presenta un mayor porcentaje de este último transcrito. Por lo tanto, los hallazgo de este trabajo, apoyan la idea de que las variantes del VPH 18 poseen un potencial oncogénico diferente y que este se podría deber en parte, a los niveles de

expresión de E6*I, puesto que a niveles más altos de este transcrito, habría una mayor actividad de p53, lo que ocasionaría que el arresto y/o apoptosis celular se activasen ante el estímulo de dicho factor de transcripción en caso de haber un daño celular. Por otro lado, el encendido de vías apoptóticas independiente de p53 dado por E6*I, promovería una mayor tasa de muerte celular. Estos eventos en conjunto, impedirían a las células infectadas proseguir su camino hacia la malignidad, disminuyendo así, las probabilidades de que células infectadas con el VPH 18 de la variante Africana persistan y progresen a cáncer, o el tiempo necesario para que estos eventos se suscitaran fuese mayor. Este mismo fenómeno, probablemente se observaría en todas las demás variantes intratipo con niveles altos del transcrito E6*.

Actualmente, hay un amplio cúmulo de interrogantes relacionadas con la historia natural del cáncer cervicouterino; sin embargo, el desarrollo de una investigación básica y clínica de calidad, contribuirán a mejorar el diagnóstico y tratamiento de los pacientes que adquieran una infección por VPH.

Conclusiones

- E6*I disminuye la densidad celular de las líneas MCF7 y HaCaT.
- E6*I promueve la acumulación de células MCF7 en la subfase G₀, que indica, presencia de muerte celular.
- Uno de los papeles biológicos de E6*I en células sin Virus del Papiloma Humano, es el de promover la apoptosis celular, en líneas MCF7 y HaCaT.

REFERENCIAS

1. Robins S., Cotran R., Kumar V. 2004. *Patología humana*. 7ª ed. Elsevier España S.A. Madrid. p 166-167.
2. Longe J. L. 2005. *The Gale Encyclopedia of Cancer*. A guide to cancer and its treatments. Second edition. **Volume 1**.
3. World Health Organization. Cancer control: knowledge into action: WHO guide for effective programmes; module 1. [en línea] [fecha de consulta 03-12-09] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
4. Ferlay J, Bray P, Pizani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase N0 5, Version 2.0. IARC Press, Lyon, 2004. Available at: <http://www.iarc.fr>
5. GLOBOCAN 2002. <http://www-dep.iarc.fr/>
6. Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>
7. Walboomers J. M. M., Jacobs M. V., Manos M. M., et al. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*. **189**: 12-19.
8. Castellsague X. 2008. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. **110**: S4-S7.
9. Saavedra L. A., Lizano S. M., 2006. Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*. **1**: 31-5.
10. Garcea L. R. Dimaio D. 2007. *The Papillomaviruses*, Springer US, pp 419.
11. Ronald T. J., Butel J. S. 2008. The History of Tumor Virology. *Cancer Research*. **68**: 7693-7706.
12. Alonso de Ruiz P., Lazcano P. E. C., Hernández A. M. 2005. *Cáncer Cervicouterino: diagnóstico, prevención y control*. 2ª. ed. Panamericana, México, pp 385.
13. Eifel P. J., Levenback C. 2001. *Cancer of the female lower genital tract*. American Cancer Society PMPH-USA, pp 308.
14. Burd. E. M. 2003. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. **16**: 1-17

15. Muñoz N. et. al. 2003. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*. **348**: 518-527
16. De Villiers M. E., Fauquet C., Broker R. T., Bernard U. H., zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**: 17-27
17. Bernard U. H., Calleja M. I. E., Dunn T. S. 2006. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *International Journal of Cancer*. **118**: 1071-1076.
18. Picconi M., Alonio L., García C. A., Lizano S. M., Cervantes G., Distefano J., Bazan A., Teyssie A. 2000. Variantes moleculares del Virus del Papiloma Humano (HPV) tipos 16 y 18 en adenocarcinomas de cérvix. *Medicina*. **60**: 889-894
19. Steenberg R. D. M. et. al. 2005. HPV mediated transformation of anogenital tract. *Journal of Clinical Virology*. **32 S**: S25-S33
20. Woodman J. B. C., Collins I. S., Young S. L. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews of Cancer*. **7**: 11-22
21. De la Cruz E., García C. A., Lizano S. M. 2005. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *Journal of General Virology*. **86**: 2459-2468
22. Longworth S. M., Laimins A. L. 2004. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **68**: 362-372.
23. Prendiville W., Davis P. The Human Papillomavirus. In: Prendiville W, Davis P, eds. *The Health Professionals HPV Handbook: Human papillomavirus and cervical cancer*, Oxford: Taylor and Francis, 2004b:11-26
24. Zheng Z. M., Baker C. C. 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in Bioscience*. **11**: 2286-2302.
25. http://www.medizin.unituebingen.de/med_virologie/exp_viro_/Exp_Viro_de/Forschung/Projekte/target.html
26. telemedicine.org/warts/cutmanhpv.htm
27. López S. A., González M. L., Ponce de León S., García C. A., Mohar A., Lizano S. M. 2009. Functional implication of sequence variation in the long control region and E2 gene among human papillomavirus type 18 variants. *Archives of Virology*. **154**: 747-754.
28. Bouallaga I., Thierry F. 1999. Control of Human Papillomavirus type 18 transcription: role in carcinogenesis. *Recent Research Developments in Virology*. **1**: 369-

29. Álvarez S. L., M. López B. E. 1995. Regulación genética de los papilomavirus humanos genitales. *Salud Pública de México*. **37**: 240-247.
30. <http://www.123bio.net/revues/ibouallaga/index.html>
31. Doorbar J., Foo C., Coleman N., et. al. 1997. Characterization of events during the late stages of HPV 16 infection in vivo using high affinity synthesis fabs to E4. *Virology*. **238**: 40-52.
32. Trus L. B., Buck B. C., Cheng N., Lowy D. R., Steven C. A., Schiller T. J. 2005. Localization of the HPV-16 Minor Capsid Protein L2 by Difference Imaging. *Microscopy and Microanalysis*. **11**: 642-643.
33. Huges F. J., Romanos M. A. 1993. E1 protein of papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Research*. **25**: 5817-5823.
34. Wilson V. G., West M., Woytek K., Rangasamy D. 2002. Papillomavirus E1 Proteins: Form, Function and Features. *Virus Genes*. **24**: 275-290.
35. McBride A., Myers G. 1997. The E2 proteins. Human papillomavirus. *Los Alamos National Laboratory*, p. III-54 - III-72.
36. Rashmi S. 2002, (41). The papillomavirus E2 proteins: Structure, Function and Biology. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. **31**: 343-60.
37. Abbate E. A., Berger J. M., Botchan M. R. 2004. The X-ray structure of the papillomavirus helicasa in complex with its molecular matchmarker E2. *Genes and Development*. **18**: 1981-1996.
38. Doorbar J. A., Parton K., Hartley L., Banks T. 1990. Detection of novel splicing patterns in a HPV-16 containing keratinocyte cell line. *Virology*. **178**: 254-262.
39. Raj K., Berguerand S., Southern S., Doorbar J., Beard P. 2004. E1^{E4} Protein of Human Papillomavirus Type 16 Associates with Mitochondria. *Journal of Virology*. **78**: 7199-7207
40. Sorathia C., Davy J., Doorbar J. Regulation of E2-mediated transcription by 16 E4. Study ongoing.
41. Zur Hausen H. 2000. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. **92**: 690-698.
42. Garnett T. O., Duerksen-Hughes P. J. 2006. Modulation of apoptosis by Human Papillomavirus (HPV) Oncoproteins. *Archives of Virology*. **151**: 2321-2335.

43. Oelze I., Kartenbeck J., Crusius K., Alonso A. 1995. Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. *Journal of Virology*. **69**: 4489–4494.
44. Lace M. J., Anson J. R., Thomas G. S., Turek L. P., Haugen T. H. 2008. The E8^{E2} Gene Product of Human Papillomavirus Type 16 Represses Early Transcription and Replication but Is Dispensable for Viral Plasmid Persistence in Keratinocytes. *Journal of Virology*. **82**: 10841-10853.
45. De la Cruz Hernández E., Mohar Betancourt A., Lizano Soberón M. 2004. Elementos víricos y celulares que intervienen en el proceso de replicación del virus del papiloma humano. *Clinical and Translational Oncology*. **6**: 263-271.
46. Liu X., Clements A., Zhao K., Marmorstein R. 2006. Structure of Human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *The Journal of Biological Chemistry*. **281**: 578-586.
47. McLaughlin-Durbin M. E., Münger K. 2009. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*. **384**: 335-344.
48. Howie H. L., Katzenellenbogen R. A., Galloway D. A. 2009. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, **384**: 324-334.
49. Mantovani F., Banks L. 2001. The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. **20**: 7874-7887.
50. Thomas M., Pim D., Banks L. 1999. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. **18**: 7690-7700.
51. Tungteakkhum S. S., Duerksen H. P. J. 2008. Cellular binding partners of human papillomavirus E6 protein. *Archives of Virology*. **153**: 397-408.
52. Contreras Paredes A., De la Cruz H. E., Martínez R. I., Dueñas G. A., Lizano M. 2009. E6 variants of papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinasa (Akt/PI3K) signaling pathway. *Virology*. **383**: 78-85.
53. Chow L. T., Nasser M., Wolinsky S. M. 1987. Human papillomavirus type 6 and 11 mRNAs from genital acuminata. *Journal of Virology*. **61**: 2581-2588.
54. Smotkin D., Wettstein F. O. 1986. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer derived cell line and identification of the E7 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **83**: 4680-4684.
55. Roggenbuck B., Larsen P. M., Fey J. S., Bartsch D., Gissman L., Schwartz E. 1991. Human Papillomavirus Type 18 E6*, E6 and E7 Protein Synthesis in Cell-Free Translation

Systems and Comparison of E6 and E7 in vitro Translation Products to Proteins Immunoprecipitated from Human Epithelial Cells. *Journal of Virology*. **65**: 5068-5072.

56. Zhang Y., Dasgupta J., Banks L., Thomas M., Chen X. S. 2007. Structures of a human papillomavirus (HPV) E6 polypeptide bound to MAGUK proteins: mechanisms of targeting tumor suppressors by a high-risk HPV oncoprotein. *Journal of Virology*. **81**: 3618–3626.

57. Sedman S. A., Barbosa M. S., Vass W. C., et. al. 1991. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *Journal of Virology*. **65**: 4860-4866.

58. Shally M., Alloul N., Jackman A. et. al. 1996. The E6 variant proteins E6*I-E6*IV of human papillomavirus 16: expression in cell free systems and bacteria in a study of their interaction with p53. *Virus Research*. **42**: 81-96.

59. Pim D., Banks L. 1999. HPV-18 E6* I protein modulates the E6-directed degradation of p53 by binding to full-length HPV-18 E6. *Oncogene*. **18**: 7403-7408.

60. Goodwin E. C., Di Maio D. 2001. Induced senescence in HeLa cervical carcinoma cells containing elevated telomerase activity and extended telomeres. *Cell Growth and Differentiation*. **12**: 525-534.

61. Filippova M., Filippov A. V., Kagoda M., Garnet T., Fodor N., Hughes D. J. 2009. Complex of Human Papillomavirus Type 16 E6 Proteins Form Pseudo-Death-Inducing Signaling Complex Structures during Tumor Necrosis Factor-Mediated Apoptosis. *Journal of Virology*. **83**: 210-227.

62. Pim D., Tomiac V., Banks L. 2009. The HPV E6* proteins from high-risk, mucosal human papillomaviruses can direct the degradation of cellular proteins in the absence of full-length E6 protein. *Journal of Virology*. **83**: 9863-9874.

63. Day P. M., Lowy D. R., Schiller J. T. 2003. Papillomavirus infect cells via clathrin-dependent pathway. *Virology*. **307**: 1-11.

64. Bousarghin L., Touze A., Sizaret P. Y., Coursaget P. 2003. Human papillomavirus types 16, 31 and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *Journal of Virology*. **77**: 3846-3850.

65. Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cancer cervical. *Clinical Science*. **110**: 525-541.

66. Doorbar J. 2005. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, **32S**: S7-S15.

67. Kajada M., Silla T., Ustav E., Ustav M. 2009. Papillomavirus DNA replication – From initiation to genomic instability. *Virology*. **384**: 360-368.

68. Manser E., Huang H. Y., Loo T. H., Chen X. Q., Dong J. M., Lim. L. 1997. Expression of constitutively active α -PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Molecular and Cellular Biology*. **17**: 1129-1143.
69. Bumpus J.A. and Brook B. J. 1988. Biodegradation of Crystal Violet by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**: 1143-1150.
70. Barrera R. L., Drago S. M., Ramos P. J., Zamora A. C., Gómez A. F., Sainz E. T., Mendoza P. F. 2004. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*. **17**: 42-55.
71. Darzynkiewicz, Z., Juan, G. 2001. DNA content measurement for DNA ploidy and cell cycle analysis. USA. *Current. Protocols in Cytometry*. May; Chapter **7**: Unit 7.5
72. Javois C. L. 2009. Methods in Molecular Biology: Immunocytochemical Methods and Protocols. 3a. ed. **Vol. 115**. Humana Press Inc. Totowa, N.J. p 142-148.
73. <http://www.medmol.es/glosario/23/>
74. Laelor M. A., Alessi R. D. 2001. PKB/Akt: a key mediator of proliferation, survival and insulin responses? *Journal of Cell Science*. **114**: 2903-2910.
75. Kagawa S., Gu J., Honda T., McDonnell T. J. Swisher S. G., Roth J. A., Fang B. 2001. Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but no cell death. *Clinical Cancer Research*. **7**: 1474-1480.
76. Henseleit U. et. al. 1997. Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT Keratynocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*. **109**: 722-727.
77. Pradelli L. A., Bénétiau M., Ricci J. E. 2010. Mitochondrial control of caspase dependent and -independent cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **67**: 1589-1597.
78. Lizano M., Berumen J., Guido M. C., Casas L., García Carrancá A. 1997. Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. **89**: 1227-1231.