



**E6 DE HPV18 Y SU EFECTO SOBRE  
PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA  
SEÑALIZACIÓN DE MAPK**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL  
GRADO DE M. en C.**

**P R E S E N T A**

**HÉCTOR URUETA CUÉLLAR**

**TUTOR**

**Dra. MARCELA LIZANO SOBERÓN**

**MÉXICO, D.F. 2011**



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.

Este trabajo se realizó en el  
Instituto Nacional de Cancerología

Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, México, D.F., C.P. 14080

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo del Instituto Nacional de  
Cancerología y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

*Sinodales designados*

PRESIDENTE: *Dra. Estela Sánchez Quintanar*

VOCAL: *Dra. Marina Macias Silva*

SECRETARIO: *Dra. Martha Robles Flores*

SUPLENTE: *Dr. Alejandro Zentella Dehesa*

SUPLENTE: *Dra. Elizabeth Langley McCarron*

Bajo la dirección de:

*Dra. Marcela Lizano Soberón*

## Dedicatorias

*Primeramente quiero agradecer a mis padres; Mamá y Papá que en este tiempo en el que no he estado mucho tiempo cerca de ellos, me he dado cuenta lo mucho que los quiero y he llegado a comprender muchas cosas y el porque de ellas... quiero agradecerles todo el amor, apoyo y confianza que me han brindado a lo largo de mi vida lo que me ha ayudado llegar hasta aquí. Cosa que tampoco habría sido posible sin la ayuda de una persona muy especial que se ha convertido en parte de mi vida, a quien admiro muchísimo y me da fuerza para continuar esforzandome día a día, quien me enseña que cada día es una nueva oportunidad de mejorar...Fati, te amo...*

*A mi directora de tesis: Dra Marcela Lizano Soberón por su estímulo para seguir creciendo intelectualmente, así como también por su comprensión en los momentos difíciles. Por su apoyo, por sus valiosas sugerencias y por sus observaciones críticas en la realización y redacción de este trabajo... Además de lo profesional, quiero agradecerle por ser la gran gran persona que es y por lo grandes momentos que hemos pasado conviviendo.*

*A mi comité tutorial; Dr Alejandro Zentella Dehesa y Dr Marco Antonio Cerbón, quienes estuvieron conmigo; cada semestre a lo largo de mi maestría, dandome sus consejos y sugerencias para sacar adelante este trabajo. Especialmente quiero agradecer al Dr. Alejandro quien ha sido para mi una gran ayuda y por quien siento una gran admiración, gran aprecio y a quien considero mi segundo tutor...Dr. Muchas Gracias!.*

*A mis sinodales: Dra. Estela Sánchez, Dra. Marina Macias, Dra, Martha Robles y Dra Elizabeth por todas sus críticas y observaciones para enriquecer y mejorar este trabajo.*

*Del mismo modo agradezco a Adelita y Adriana por toda su ayuda técnica y por todo su cariño que al igual que a mis otros compañeros del laboratorio cuatro hicieron más fácil y agradable mi trabajo... a todos ustedes les hago mi más profundo reconocimiento: Elenae, Mariana, Saida, Alfredo y Joakin... son todos, jaja como creen cuates que olvidaria mencionarlos; si son parte muy importante no solo profesionalmente, quiero agradecerles por todos esos inolvidables momentos que he compartido con ustedes, por sus sabios consejos, por aguantarme, por su gran amistad, por eso y mucho mas... Muchas gracias Verito y Fer.*

*Y por último quiero agradecer a todas aquellas personas que me ayudaron de alguna forma durante este trabajo, especialmente a mis mejores amigos: René, Rafael, Luz, Jan, Ara, Ceci... por todo su interés y apoyo. A todos ellos muchas gracias por toda su*

*ayuda y su gran amistad .... ¡muchas gracias!.*

*Amis padres,  
hermanos,  
sobrinos y a ti Faty*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Virus del papiloma humano.....	1
Tipos de VPH .....	1
Variantes intratipo.....	2
Historia natural de la infección por VPH-AR.....	4
Integración.....	6
Genoma de VPH.....	7
Región larga de control (LCR) y región tardía (L).....	8
Región temprana (E).....	8
Oncoproteína E7.....	10
Oncoproteína E6.....	10
Dominios de unión de la oncoproteína E6 de los VPH-AR.....	12
Unión mediante el dominio LXXLL.....	12
Unión mediante E6-AP.....	13
Unión mediante motivos PDZ.....	15
Unión mediante dedos de zinc.....	16
Otras asociaciones de E6.....	17
Procesamiento alternativo de E6.....	20
Papel de E6 en la señalización.....	20
Señalización de Notch-1.....	21
Ruta de transduccion de señales de MAPK.....	22
Ruta de PI3K.....	28
<b>2.- ANTECEDENTES</b> .....	31
<b>3.- JUSTIFICACIÓN</b> .....	33
<b>4.- HIPÓTESIS</b> .....	34
<b>5.- OBJETIVOS</b> .....	34
<b>6.- METODOLOGÍA</b> .....	35
<b>7.- RESULTADOS</b> .....	40
<b>8.- DISCUSIÓN</b> .....	51
<b>9.- CONCLUSIONES</b> .....	57
<b>10.- REFERENCIAS</b> .....	59
<b>11.- ANEXO</b> .....	63

## 1.- INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un problema de salud pública, debido a que cada año afecta a cerca de 500 000 nuevas víctimas a nivel mundial, encontrándose el 83% de los casos en países en vías de desarrollo. En México, ocupa el segundo lugar de mortalidad en mujeres de 35 a 64 años, siendo la enfermedad metastásica la principal causa de los fallecimientos por su detección tardía. Dentro de las principales razones del progreso del CaCu, en países en desarrollo como México, se encuentran la deficiencia de programas efectivos en educación para su detección y tratamiento oportuno [1].

El CaCu es una neoplasia maligna epitelial originada en la zona de transformación del cuello uterino, iniciando con una lesión precursora (displasia leve), evolucionando a cáncer *in situ*, llegando a cáncer invasor. La enfermedad metastásica se desarrolla por vía linfática siendo los sitios principalmente afectados ganglios linfáticos, hígado, pulmón y hueso [2].

Existen muchas causas que se asocian al desarrollo del CaCu. Estudios han mostrado que el DNA del virus del papiloma humano (VPH) puede ser encontrado en el 99.7 % de los casos de carcinomas cervicales. Los tipos virales 16 y 18 son los más frecuentes, encontrándose alrededor del 60 y 20% en el cáncer de cérvix a nivel mundial, asociados a tumores de origen escamoso y glandular, respectivamente; sin embargo, hay evidencias que muestran que la infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), es un factor necesario aunque no suficiente en la carcinogénesis cervical. Se ha observado que en mujeres de 20 a 35 años de edad, cerca del 30% están infectadas con VPH-AR y sólo pocas desarrollan cáncer cervicouterino [3].

### **Tipos de Virus del Papiloma humano (VPH)**

Los papilomavirus son virus pequeños que infectan epitelios estratificados cutáneos y mucosos de una gran diversidad de cordados. Se han identificado 34 tipos de virus

del papiloma en animales y más de 100 diferentes tipos de VPH; de éstos, cerca de 40 están involucrados en infecciones del tracto genital. Los VPH se agrupan en la familia de virus llamada *Papillomaviridae* (Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus, ICTV) y de acuerdo a las características filogenéticas se dividen en géneros, tipos y variantes. Los diferentes géneros se caracterizan por compartir máximo el 60 % de identidad en su secuencia de nucleótidos; los tipos de papilomavirus presentan menos del 90 % de similitud con respecto al genoma de otros papilomavirus en el ORF del gen L1; los subtipos se definen como aquellos papilomavirus que presentan entre el 90 y el 98 % de similitud en su secuencia nucleotídica (muy raros) [4, 5].

Epidemiológicamente los VPH que infectan el área anogenital se han dividido en dos grupos: los VPH de alto riesgo (VPH-AR) asociados con un alto riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) y los VPH de bajo riesgo (VPH-BR) con bajo potencial carcinogénico y asociados al desarrollo de verrugas genitales o condiloma acuminado (los más comunes son VPH-BR 6 y 11) [6-9].

### **Variantes intratipo**

Algunos autores sugieren que a lo largo del tiempo, la evolución de los VPH dio lugar al desarrollo de variantes tipo específicas y filogenéticamente relacionadas con comportamientos biológicos diferentes [4]. Las variantes intratipo son aquellos aislados de VPH que presentan el 98 % o 95 % de identidad en las regiones conservadas (E6, E7, L1, L2) o regiones no codificantes de su genoma, respectivamente, con respecto al tipo viral de referencia o prototipo [5].

El estudio de variantes ha permitido establecer una relación entre los VPH con la distribución geográfica y la historia de su origen. Las variantes de VPH son antiguas, surgen con el hombre y evolucionan mientras se diseminan junto con los grandes movimientos de las poblaciones humanas que los portan a través de la historia.



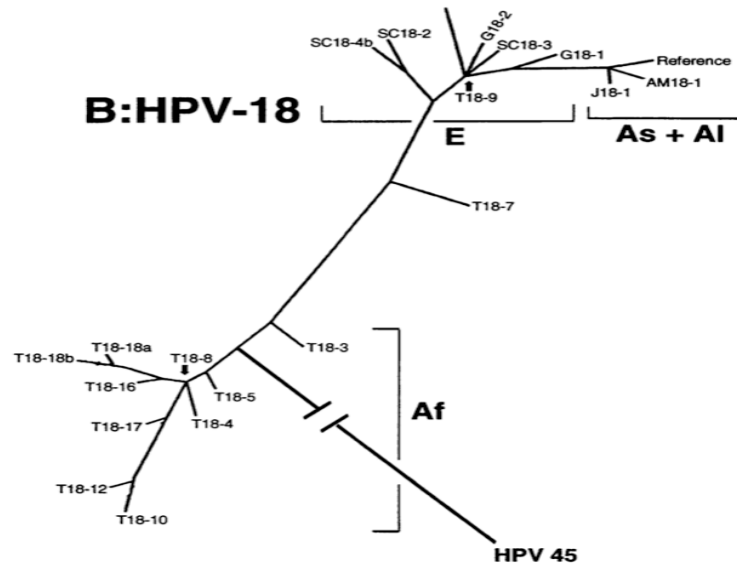
Existen ciertas evidencias que sugieren que al menos los VPH 16 y 18 tienen sus raíces en África [4, 10].

Mediante el análisis de secuencias de DNA; principalmente del gen L1 y la LCR de aislados virales VPH obtenidos de diferentes países y grupos étnicos, se a podido detectar la presencia de variantes de VPH18. Las principales variantes de las ramas filogenéticas del VPH18 son; la variante africana (Af), la europea (E), y la asiático-amerindia (AsAi), lo cual se muestra en la **figura 1**. Siendo esta última la clona de referencia o prototipo para el VPH 18, ésta es de origen brasileño y probablemente representa a las variantes de VPH 18 de los indígenas americanos [4].

Varios estudios han analizado la relación entre variantes del VPH y el proceso oncogénico, sugerido que las variantes de VPH18 difieren en su potencial oncogénico. Se ha encontrado predominio de algunas variantes asociadas positivamente con el desarrollo del cáncer y otras variantes con la disminución del potencial oncogénico, por lo que la relación de las variantes de VPH con el desarrollo de cáncer es de gran interés. Estas asociaciones podrían explicarse por diferencias en la regulación de la transcripción viral o en las actividades biológicas de las proteínas virales codificadas por las diferentes variantes [1, 5].

En un estudio realizado por Lizano y colaboradores (1997) con una población de mujeres mexicanas, se buscó si los cambios o variaciones conocidas entre los VPH-AR podrían explicar las diferencias en pronóstico entre diferentes grupos histológicos de carcinomas cervicales. Se encontraron asociaciones importantes de ciertas variantes con la edad de las pacientes y los tipos histológicos de tumores del cérvix, además de una asociación aparentemente exclusiva entre la variante Af de VPH18 y los tumores de origen escamoso. Mientras que la variante E se encontró en adenocarcinomas, carcinomas adenoescamosos, carcinomas de células escamosas y carcinomas de células pequeñas. Por lo que se sugirió que la Af pudiera estar asociada con un comportamiento biológico menos agresivo, dado que el carcinoma escamoso tienen un mejor pronóstico relativo en comparación con el

adenocarcinoma, el carcinoma adenoescamoso, y en particular el carcinoma de células pequeñas. En contraste, en el carcinoma de células pequeñas positivos para HPV18, sólo se encontró la clona de referencia, lo que refuerza la idea de una mayor agresividad de esta variante, con respecto a la Af [10].



**Figura 1.** Árbol filogenético de las variantes del VPH 18 encontrados en la población mexicana [4].

### Historia natural de la infección por VPH-AR

El factor indispensable para el desarrollo de CaCu es la infección por los VPH-AR y su forma de transmisión es sexual. Los viriones entran a las células de la capa basal de la zona de transformación del cérvix a través de microlesiones del epitelio estratificado. La entrada depende de la presencia de proteoglicanos de sulfato de heparina presentes en la membrana plasmática, que podría ser el lugar de unión inicial previo a la unión con el receptor, el cual se desconoce; sin embargo, el complejo integrina  $\alpha 6$ - $\beta 4$  es un buen candidato. La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina y una vez dentro, el virión se desensambla por el rompimiento de enlaces disulfuro internos de la cápside, dado el ambiente reductor de la célula. Se transporta el DNA viral al núcleo celular, en donde ocurre su integración al genoma y la posterior expresión de las proteínas virales E1 y

E2. El gen E1 es el más grande y de los más conservados entre los VPH; su secuencia es de aproximadamente 2 Kb, codifica para la proteína E1, factor necesario para la replicación viral, ya que en su ausencia, el genoma viral sólo se mantiene a través de su integración en el genoma celular. E1 forma hexámeros que rodean al origen de replicación en la LCR de modo que la cadena de DNA pasa a través del centro del anillo hexamérico. Al unirse E2 y E1 a sus respectivos sitios de unión, produce un pliegue en el DNA que promueve interacciones entre el dominio de transactivación de E2 y el dominio de helicasa de E1 (3'→5' helicasa hexamérica dependiente de ATP). El dominio de unión a DNA de E1 estimula la actividad transcripcional de E2 dependiente de E1, lo cual es crítico para el correcto ensamblaje del complejo de iniciación de la duplicación del genoma viral. Cuando la célula hospedera se divide, una célula hija permanece en la capa basal y otra migra a capas superiores para diferenciarse, disminuyendo su capacidad para dividirse. En esta etapa, el DNA viral se segrega con las dos células hijas manteniéndose entre 50 a 100 copias por célula en forma episomal y durante la cariocinesis, E1 y E2 facilitan la segregación correcta de los genomas durante la división celular. Esta fase inicial de la infección conduce al incremento del número de células basales que contienen el genoma viral (fase proliferativa). Por otro lado, conforme una célula hija empieza a migrar a estratos superiores del epitelio aumenta su diferenciación, resultando un problema para el virus, porque éste requiere de la maquinaria de la célula huésped para la síntesis de su DNA y una célula diferenciada contiene pocas o nulas enzimas replicativas. La expresión temprana de las oncoproteínas E6 y E7 retardan la diferenciación y promueven la proliferación celular mediante la transición de la fase G<sub>1</sub> a la fase S, evitando que la célula basal interrumpa el ciclo celular una vez que esta migra al estrato suprabasal del epitelio, en donde normalmente entraría a la fase G<sub>0</sub> para entrar a un proceso de diferenciación terminal. Todo esto mediante interacciones con proteínas celulares clave responsables del control del ciclo celular. Por ejemplo, E7 se une a la proteína Rb e impide que se una al factor de transcripción E2F inhibiendo su función. E2F regula la expresión de genes involucrados en la duplicación del DNA y al estar libre la célula entra a la fase S del ciclo celular. Además E7 se puede unir a otras proteínas involucradas en el ciclo

celular como es AP1, p21 y p27. Por otro lado, E6 evita que la célula entre en apoptosis en respuesta a la desregulación del ciclo celular mediante la degradación de p53 y otras. En conjunto ocasiona la acumulación de mutaciones, inestabilidad genómica, inmortalización y transformación celular, además de la duplicación viral. Una vez terminada la duplicación del DNA viral en las capas superiores del epitelio estratificado, aumenta la actividad transcripcional del promotor tardío dependiente de la diferenciación, que se halla en el marco de lectura del gen E7, expresándose la proteína L2 seguida de la L1, permitiendo el ensamblaje de las partículas virales (figura 2). La cápside viral se conforma de 360 copias de L1 y de 12 copias de L2 organizadas en 72 capsómeros. Eventualmente las células infectadas se desprenden de la capa superior del epitelio y pueden permanecer en el ambiente antes de que el virus sea transmitido a una nueva superficie epitelial, logrando transmitirse a otros individuos. El virus del papiloma humano no es lítico y se ha sugerido que la proteína E4 contribuye al egreso del virus de las capas superiores del epitelio mediante el rompimiento de los complejos de queratina [6, 7, 11, 12].

### **Integración**

El DNA del VPH es usualmente episomal (extracromosomal); sin embargo, en el caso del DNA de los VPH-AR la mayoría se encuentra integrado al genoma de la célula hospedera con cáncer cervical, así como en líneas celulares. Las células cancerosas simultáneamente pueden presentar las dos formas. Dentro de los VPH-AR, la integración ocurre con mayor frecuencia en las neoplasias malignas asociadas con VPH 18. La integración del DNA de los VPH-AR es el evento crítico en la carcinogénesis y conduce a la hidrólisis accidental de la región E1/E2, resultando a veces en la pérdida de los genes E1 y E2 (figura 2). E2 codifica para una proteína que además de funcionar como factor transcripcional del DNA viral, inhibe la transcripción de E6 y E7, por lo que la pérdida de expresión de este gen resulta en un incremento descontrolado en los niveles de ambas oncoproteínas, llevando a la transformación de la célula hospedera y a la formación del tumor [6].

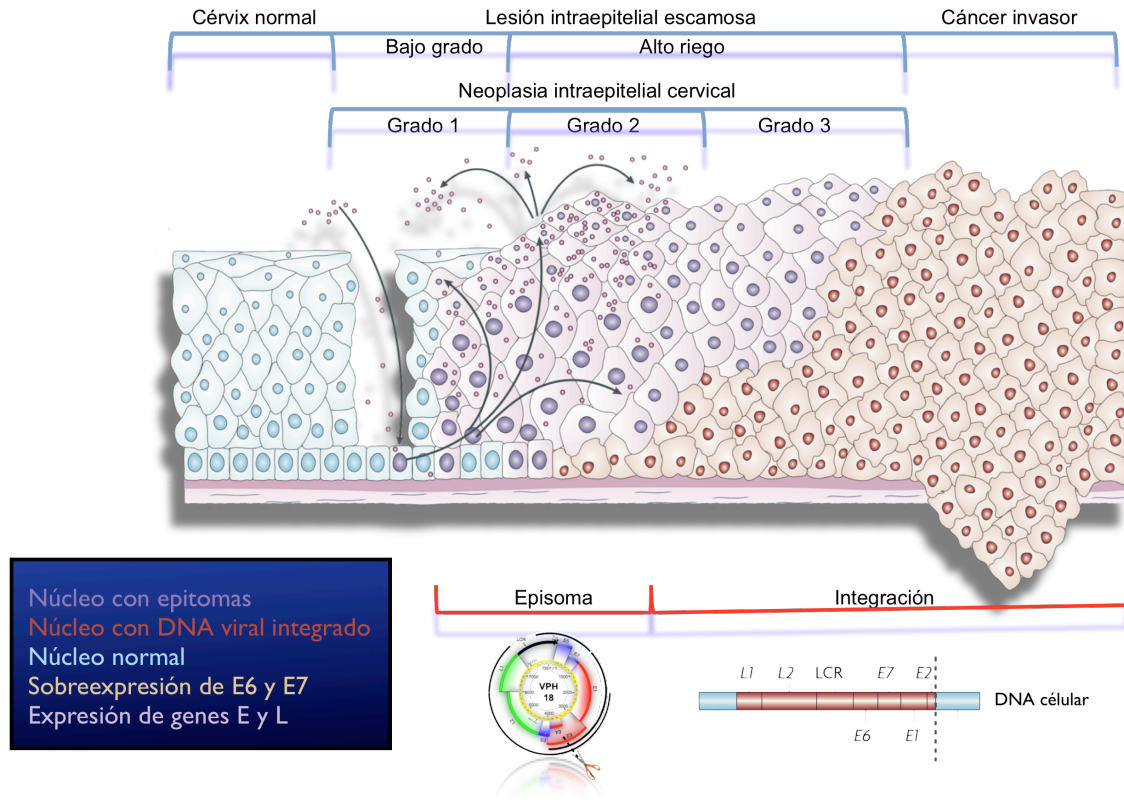


Figura 2.- Historia natural de la infección por el VPH, adaptado de [13].

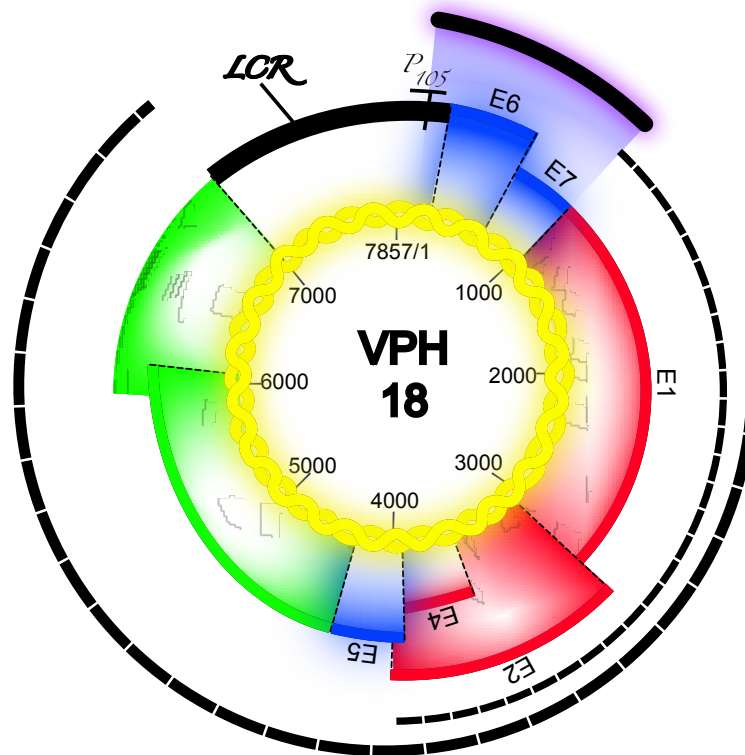
### Genoma del VPH

La partícula viral del VPH tiene una cápside icosaédrica de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), mide aproximadamente 55 nm y es desnudo. Su genoma consiste en una molécula de doble cadena de DNA cerrado covalentemente de 7 857 pb (VPH 18) en donde sólo una de las cadenas es la codificante. El genoma de los VPH está asociado a proteínas histonas semejante a la estructura de la cromatina celular, se encuentra organizado en tres regiones separadas por dos sitios de poliadenilación: una región larga de control (*LCR*), la región tardía (*L*) y la región temprana (*E*), ver [figura 3](#) [7].

### Región larga de control (*LCR*) y región tardía (*L*)

La *LCR* representa aproximadamente 10 % del genoma viral, es una región sin marco de lectura que presenta la función de regular la transcripción viral, contiene el origen de duplicación, el promotor temprano, varios sitios de unión para represores y

amplificadores (*enhancer*), así como elementos de respuesta a factores de transcripción tanto virales como celulares [6].



**Figura 3.-** El genoma del HPV es una molécula de doble cadena de DNA cerrado covalentemente. Se divide en tres regiones: larga de control (LCR), temprana (E) y tardía (L).

La región tardía comprende dos genes que codifican para las proteínas L1 y L2, las cuales son las constituyentes de la cápside de la partícula viral, en donde L1 se encuentra en mayor proporción que L2 [12].

### **Región temprana (E)**

Abarca más del 50 % del genoma viral y codifica para 6 genes bien caracterizados (E1, E2, E4, E5, E6, E7) que se expresan en las infecciones tempranas y latentes. Las proteínas tempranas son importantes para procesos como la duplicación y transcripción del DNA, la interacción con el citoesqueleto, la inmortalización y la transformación celular. E4 aunque se encuentra en esta región, se expresa en etapas

tardías de la infección viral participando en el rompimiento de fibras de queratina induciendo el colapso celular [6, 12, 14].

Estudios revelan que la expresión de los genes E6 y E7 de los VPH-AR es indispensable para la transformación celular y son los responsables de la desregulación del control del ciclo celular y alteración de rutas de señalización; principalmente por la interacción y neutralización de las funciones de las proteínas supresoras de tumores p53 y Rb, entre otras, **cuadro 1** [15].

LOCUS	PROTEÍNA	FUNCIÓN	REFERENCIA
LCR	-	Secuencia reguladora de la transcripción temprana; contiene el origen de la duplicación viral y elementos de respuesta a diversos factores (p. e. hormonas).	[11]
L1	Proteína L1	Constituyente principal de la cápside y altamente conservada en VPH's.	[12].
L2	Proteína L2	Constituyente menor en la cápside; ensamblaje de viriones.	[12]
E1	Proteína E1	Función helicasa, esencial para la duplicación del DNA viral y control de la transcripción génica. y ATPasa.	[69]
E2	Proteína E2	Factor de transcripción viral; esencial para la duplicación del DNA viral y control de la transcripción génica; segregación del genoma y encapsidación. Represor transcripcional de E6 y E7 a altas concentraciones y activador a bajas concentraciones.	[6, 14]
E4	Proteína E1^E4	Proteína expresada en etapas tardías de la infección, importante en la maduración del virus, rompe estructuras de citoqueratinas induciendo colapso celular.	[6]
E5	Proteína E5	Proteína transformante asociada a membrana; interacciona con receptores de factores de crecimiento. Regula positivamente los promotores de fos y c-jun.	[90]
E6	Proteína E6	Proteína Inmortalizante y transformante; promueve la degradación de p53, entre otros componentes celulares y activación de la telomerasa.	[17, 70]
E7	Proteína E7	Proteína Inmortalizante; promueve degradación de pRb, entre otros componentes del ciclo celular, puede interactuar con miembros de la familia AP-1 (c-jun, jun b, jun d y c-fos).	[11]

**Cuadro 1.-** Resumen de la función identificada para cada una de las proteínas del VPH y de la LCR.

### Oncoproteína E7

El gen E7 mide cerca de 317 pb y codifica para una proteína (E7) de 105 residuos con un peso molecular de 10 kDa en promedio. Esta puede activar la transcripción y tiene la mayor capacidad transformante. Su estructura presenta tres dominios: CR1 CR2 y CR3 (con base en su homología con el adenovirus E1A). Este último presenta motivos “dedos de zinc” (Cys-X-X-Cys) por medio de los cuales es capaz de dimerizarse, mientras que los dominios CR1 y CR3 son esenciales para la actividad

transformante. Quizá la propiedad mejor estudiada de E7 es la habilidad de unirse a la proteína supresora de tumores Rb mediante su dominio CR2. En su estado hipofosforilado, Rb puede unirse a factores de transcripción como E2F, el cual reprime la transcripción de genes particulares y la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. La familia Rb controla la duplicación y proliferación celular mediante la cooperación con la oncoproteína E6 [15].

### **Oncoproteína E6**

En el caso del VPH 18, el gen E6 es de 474 pb y codifica para una proteína de 158 residuos con un peso de 18 KDa. Presenta un alto contenido de  $\alpha$ -hélices y hojas- $\beta$  en su estructura. Su localización ha sido controversial; pero se ha localizado en el núcleo, citoplasma y membranas no nucleares. E6 es una proteína de expresión temprana durante la infección del VPH y juega un papel importante en la historia natural viral, en la immortalización y transformación celular. La característica común entre las proteínas E6 de otros tipos virales es la presencia de cuatro motivos formados de cuatro residuos: Cys-X-X-Cys capaces de unir Zn (dedos de zinc) y están implicados en funciones tales como la activación transcripcional, la transformación, la immortalización y la asociación con otras proteínas. E6 coopera con E7 para dicha capacidad transformante e immortalizante [16-18].

La capacidad transformante e immortalizante es debida principalmente a la degradación de las proteínas supresoras de tumores Rb y P53 mediante las oncoproteínas virales E7 y E6, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, hay evidencia de que variaciones intratipo de los VPH-AR se asocian con un riesgo diferencial de desarrollar cáncer cervical. En el caso del gen E6 de VPH18, mediante análisis de secuencia de clonas representativas de las tres variantes encontradas en México, se conoce que la variante E presenta tres cambios en el gen E6 en C287G, T485C y C549A provocando mutaciones silenciosas en los residuos 61, 127 y 149 respectivos a nivel de proteína (**cuadro 2**). Mientras que la variante africana presenta 10 cambios en el gen E6 que dan origen a ocho mutaciones silenciosas y a dos mutaciones H80Y y C129K a nivel de proteína.



Cambios en el oncogen E6 de las variantes de VPH18										
Nucleótidos	251	266	287	317	342	374	485	491	548	549
AsAi	T	G	C	T	C	G	T	C	A	C
Af	C	A	G	C	T	A	C	A	G	A
E	-	-	G	-	-	-	C	-	-	A

Cambios en la oncoproteína E6 de las variantes de VPH18										
Residuos	49	54	61	71	80	90	127	129	148	149
AsAi	F	V	P	F	H	L	F	N	R	R
Af	*	*	*	*	Y	*	*	K	*	*
E	-	-	*	-	-	-	*	-	-	*

**Cuadro 2.-** Cambios a nivel de secuencia y de nucleótidos del gen E6 (477 pb) de tres variantes del VPH 18: AsAi; asiático-amerindia, E; europea, Af, africana. \* Mutación silenciosa [1].

En una infección por VPH-AR, E6 se expresa tempranamente y crea el ambiente adecuado para la multiplicación viral mediante la interacción con numerosas proteínas celulares blanco. Estas proteínas se encuentran involucradas en una variedad de procesos celulares, tales como apoptosis, regulación transcripcional, estabilidad cromosomal, organización y diferenciación epitelial, adhesión célula-célula, polaridad y control de la proliferación en la célula infectada y también en el reconocimiento inmune. E6 de los VPH-AR puede interactuar con proteínas involucradas en estos procesos celulares al menos de cuatro formas: mediante el dominio LXXLL, mediante E6-AP, mediante dominios PDZ y mediante dedos de zinc. Existen proteínas blanco de E6 que no presentan ninguno de estos dominios por lo que se sugiere que puede haber otro dominio de unión o su efecto es indirecto ([ver cuadro 3 y figura 4](#)) [16, 19, 20].

## Dominios de unión de la oncoproteína E6 de los VPH-AR

### Unión a el dominio LXXLL

Experimentos de doble híbrido y datos con inhibidores específicos, revelan que E6 se une a secuencias consenso caracterizadas por los residuos **LxxΦLsh** [21, 22] en donde **x** representa cualquier residuo de aminoácido, **Φ** es un residuo hidrofóbico, **s** es un residuo con una cadena R corta y **h** es un residuo que puede hacer múltiples puentes de hidrógeno. En el caso de la interacción E6/E6-AP el motivo de siete residuos **LQELLGE** media la unión de E6. Esta secuencia consenso también ha sido referida como motivo **LXXLL** [23, 24] en donde los residuos más importantes en la unión de E6 con sus blancos son los de leucina [14, 25]. Por esta misma secuencia consenso E6 puede interactuar directamente con E6-BP/ERC-55, IRF-3, paxilina, tuberina y con E6-AP ([cuadro 3](#)).

### E6-AP

E6-AP (proteína asociada a E6) también llamada UBE3A, es una proteína celular ubiquitina ligasa E3 de 100 KDa, parte del sistema de degradación por ubiquitinización. Además de su dominio LXXLL, presenta un dominio HECT (*homologous to E6-associated protein carboxy-terminal domain*) lo que define a la gran familia de ligasas de ubiquitina. Fue la primera proteína identificada que se une a E6 de los VPH-AR [26].

### Tuberina

Por análisis de doble híbrido se observó que tuberina (TSC2) es otra proteína blanco de E6. Tuberina en su forma activa forma un complejo con TSC1 (TSC1/TSC2) el cual juega un papel regulador negativo del crecimiento y proliferación celular al regular la ruta de señalización de insulina río abajo de Akt. La interacción con E6 induce su degradación, permitiendo la diseminación viral de los VPH-AR al fomentar el crecimiento y proliferación celular por la destrucción de la función inhibitoria de tuberina en la regulación de S6K [27].

## Unión mediante E6-AP

E6 se une a un gran número de proteínas celulares que median diversas actividades en la célula. Estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que la unión de E6 a p53, Bak, hMCM7, E6TP1, hTERT, hADA, c-myc y PTPN3 es facilitada por la interacción con la ubiquitina ligasa E6-AP, resultando en la ubiquitinización y proteólisis de estas proteínas vía proteosoma, regulando así la transducción de señales en células en proliferación (cuadro 3).

## P53

La p53 es una proteína supresora de tumores que presenta dominios de oligomerización y de unión al DNA que fomentan la activación de la transcripción génica. La p53 responde a diversas señales celulares de stress regulando genes blanco que inducen arresto del ciclo celular (p21<sup>CIP</sup>), apoptosis (activa factores proapoptóticos como Bax y Fas e inhibe factores antiapoptóticos como Bcl-2 y survivina), senescencia, reparación del DNA, o cambios en el metabolismo. Mutantes de p53 frecuentemente ocurren en diferentes neoplasias malignas humanas, afectando su unión con el sitio de unión al DNA [28].

En células normales, Mdm2 (*murine double minute 2*) se une a p53 causando su degradación vía ubiquitina; sin embargo, ante un daño en el DNA, p53 es fosforilada en el dominio carboxilo evitando su interacción con Mdm2 y así su degradación, debido a que el sitio utilizado para la fosforilación es el mismo empleado por Mdm2 para la ubiquitinización [24].

Mediante estudios de interacción proteína-proteína se demostró que E6 se une a p53 y ahora se sabe que esta interacción puede regular su función de tres formas. La primera y más común es por la unión de E6 a E6-AP mediante el dominio HECT formando el complejo E6/E6-AP que reemplaza a Mdm2 en la degradación de p53; esto reduce dramáticamente la vida media de p53, desde tres horas hasta 20 min. La segunda forma es bloqueando su translocación al núcleo reteniéndola en el citoplasma, inhibiendo así su función independiente a su degradación y la tercera es

reduciendo su transcripción mediante la interacción con el factor de transcripción CBP/p300. Por lo tanto, células que expresan E6 mantienen bajos niveles de p53 funcional y no responden ante un daño al DNA, favoreciendo la acumulación de mutaciones en su genoma y permitiendo la supervivencia de las células transformadas por la infección del VPH al impedir la función fisiológica normal de p53 [1, 7, 11, 14, 29].

### BAK

En 1995, Pan y Gripe reportaron que en ratones nulos en p53 que expresan E6 del VPH 16, la apoptosis fue inhibida, sugiriendo que E6 puede inhibirla de forma independiente a p53 [30]. Ahora se sabe que además de p53, E6 puede unirse a la proteína proapoptótica Bak (miembro de la familia Bcl-2) mediante E6-AP, promoviendo su degradación vía proteosoma, y de este modo provocando una reducción en su habilidad para desencadenar la apoptosis. En células no infectadas, Bak se expresa en altos niveles en las capas superiores del epitelio en diferenciación en las mitocondrias y promueve la apoptosis. Interactúa con canales aniónicos dependientes de voltaje llevando a la pérdida de potencial de membrana y la liberación de citocromo c. Esta proteína puede interactuar con p53 ante una señal de estrés [31, 32].

### C-MYC

Similarmente E6 puede provocar la degradación de la proteína c-myc. El proto-oncogen c-myc (*myelocytomatosis*) codifica para un factor de transcripción implicado en varios procesos celulares; como el crecimiento celular, la proliferación, la pérdida de diferenciación y apoptosis. Presenta funciones opuestas; puede activar o reprimir la transcripción. En el primer caso, se une a secuencias consenso del DNA llamadas *E-box* (*Enhancer box sequences*) de otros genes activando su transcripción al reclutar a las *HATs* (acetiltransferasas de histonas), regulando así la transcripción de cerca del 15 % de todos los genes. En el segundo de los casos, se une al factor de transcripción Miz-1 desplazando al coactivador p300, inhibiendo la expresión de los genes blanco de Miz-1 [33].

La c-Myc es activado por varias señales mitogénicas tales como EGF (factor de crecimiento epidermal) vía MAPK/ERK. La activación de c-myc resulta en numerosos efectos biológicos; uno es dirigir la proliferación celular sobreactivando ciclinas y desregulando a p21, también juega un papel importante en el crecimiento celular (regulando al rRNA y proteínas involucradas) y en apoptosis (regulando a Bcl-2). Cuando E6 del VPH-AR está presente, resulta en una proliferación sostenida de las células infectadas, al acelerar su degradación mediante E6-AP impidiendo la apoptosis dependiente de c-myc [33, 34].

### **Unión a dominios PDZ**

A diferencia de los VPH-BR, todos los VPH-AR presentan un motivo designado como (R-R/T/N/Q-E-T-Q/E-V/L) en el extremo C-terminal. Este motivo de E6 permite la unión a dominios específicos sobre proteínas celulares conocidos como PDZ. El nombre de dominio PDZ es derivado de tres miembros de la familia MAGUK (PSD95, DlgA y ZO-1); sin embargo, los dominios PDZ no están restringidos a las MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase*), sino que hay más de 50 proteínas conocidas que los contienen (**cuadro 3**). Mediante este motivo de unión a PDZ, E6 puede interactuar con proteínas que contienen múltiples copias de dicho dominio, éstas incluyen a las proteínas homólogas a MAGUK; hDlg, MAGI-1, MAGI-2, MAGI-3 y hScrib, así como MUPP1, PATJ y PTPN3. La interacción de E6 con dominios PDZ de esta clase de proteínas supresoras de tumores son blanco de degradación por la vía de la ubiquitina/26s [14, 35].

### **hDlg**

El potencial transformante y tumorigénico de los VPH-AR se ha relacionado a la habilidad de la oncoproteína E6 para unirse a proteínas involucradas en la adhesión célula a célula, polaridad y control de la proliferación; entre ellas la proteína hDlg. E6 se une mediante el motivo de unión al dominio PDZ en su C-terminal al segundo dominio PDZ de hDlg induciendo su degradación vía proteosoma. hDlg es un supresor de tumores miembro de la familia de las MAGUK. Colocaliza con E-caderina en las uniones adherentes en células epiteliales e interviene en la integridad

del citoesqueleto mediada por actina mediante su unión con b-catenina y con la proteína supresora de tumor APC (adenomatous polyposis coli). También hDlg juega un papel en la vía de señalización de PI3K/Akt al estabilizar a la proteína supresora de tumores PTEN un regulador negativo de esta vía [16, 26].

Por lo que la interacción de E6 con hDlg interrumpe la formación apropiada de las uniones célula a célula. El rompimiento de estas uniones abate la fosforilación de E-caderina por la proteína cinasa CK2. Este evento de desregulación es común en la carcinogénesis y contribuye a la actividad invasora de las células infectadas con VPH-AR. La unión de E6 con hDlg también interfiere con la regulación de la señalización de PI3K al interferir con la estabilidad de PTEN. Aunque la proteína E6 de VPH 18 tiene mayor afinidad por hDlg en comparación con otras proteínas E6 de los otros tipos virales, correlacionando así los datos de la progresión tumoral del CaCu en donde los tipos más invasivos y recurrentes son los causados por el VPH 18 [14, 16].

### **Unión mediante dedos de zinc**

#### **CBP / p300**

Ademas de las proteínas que promueven la apoptosis y de las que se encuentran involucradas en la adhesión celular, E6 también interactúa con proteínas involucradas en el control de la transcripción. La proteína p300 funciona como una acetiltransferasa de histonas que regula la transcripción vía remodelación de cromatina y es importante en el proceso de diferenciación y proliferación celular. La p300 y CBP (proteína de unión a CREB) son grandes moléculas nucleares con un alto grado de homología. El complejo CBP/p300 interactúan y modulan la transcripción de varios genes, entre ellos p53 [36].

El mecanismo de acción de CBP/p300 es a través de la formación de cAMP mediante la activación de la adenilato ciclasa mediante proteína G. El cAMP puede unirse a la PKA, que en su forma inactiva contiene dos subunidades catalíticas y dos subunidades regulatorias formando un complejo tetramérico. Cuando el cAMP se une

a las dos subunidades regulatorias, estas cambian de conformación y el complejo se disocia produciendo dos subunidades activas catalíticamente. Estas se translocan al núcleo y activan a la proteína CREB. La CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP) es un factor de transcripción que se une a ciertas secuencias del DNA llamadas CRE (elementos de respuesta a cAMP) en donde es acetilada por CBP (proteína de unión a CREB) incrementando o decrementando principalmente la transcripción génica dependiente de CREB [37, 38].

La CBP puede incrementar la expresión génica a través de tres caminos: el primero es por la relajación de la estructura de la cromatina en el promotor del gen blanco por medio de su actividad intrínseca de HAT, el segundo es por el reclutamiento de la maquinaria transcripcional, incluyendo a la RNA pol II al promotor y el tercer camino es actuando como una molécula adaptadora, como en el caso de p53. La unión de E6 de los VPH-AR con CBP/p300 evita dichos mecanismos. También esta unión previene la acetilación de p53 mediada por CBP, anulando su activación al abatir su afinidad por su sitio de unión en el DNA, ya que E6 se une al CBP en el mismo sitio que lo hace p53, ocasionando una regulación negativa de la transcripción de genes dependientes de p53. La interacción E6/CBP involucran el dedo de zinc del C-ter de E6 y los residuos 1808 a 1826 de CBP. Esta interacción está limitada sólo a las oncoproteínas E6 de los VPH-AR que son capaces de degradar a p53 y asociadas a cáncer cervical [36, 38].

### **Otras asociaciones de E6 de VPH**

Se conoce que CBP/p300 pueden interactuar con la proteína Gps2 para facilitar la regulación transcripcional de p53. Se ha observado que E6 interactúa con Gps2 y promueve su degradación, por lo que la unión de E6 tanto con CBP/p300 y Gps2 lleva a una inapropiada supervivencia y división de las células infectadas [39]. Interesantemente, GPS2 no presenta motivos LXXLL, ni tampoco dominios PDZ; al igual que las proteínas FADD, hADA3, TLR9, Fibulina-1, Zyxina, TNR-1, XRCC1, survivina, MGMT y procaspasa 8; sin embargo, tienen asociación con E6, sugiriendo

la existencia de un motivo de unión adicional para esta oncoproteína (**cuadro 3**) [20, 39].

### Pro-caspasa 8

El virus del papiloma humano ha desarrollado numerosos caminos para modular diversos procesos de la célula hospedera. La E6 de los VPH-AR, pero no los VPH-BR, altera a procaspasa 8. Tanto la forma corta (E6\*) como la completa de E6, originadas por procesamiento alternativo de E6 (como se mencionará mas adelante) pueden unirse y modular a la procaspasa 8, pero E6 (forma completa) acelera su degradación, mientras que E6\* la estabiliza [40].

La caspasa 8 es miembro de la familia de proteasas de cisteína de ácido aspártico. La activación secuencial de las caspasas juega un papel central en la ejecución de la apoptosis celular. Las caspasas existen como proenzimas inactivas compuestas de un predominio, una subunidad proteasa larga y una subunidad proteasa corta. Su activación requiere el procesamiento proteolítico en un residuo de aspártico interno conservado para generar una enzima heterodimérica que consiste de una subunidad larga y una pequeña. Esta proteína está involucrada en la apoptosis inducida por Fas y varios estímulos apoptóticos. El dominio efector de muerte semejante a FADD en su N-ter (DED) le permite interactuar con FADD. La unión del ligando a su receptor produce la oligomerización del receptor, siendo el trímero la mínima unidad requerida para la señalización. La oligomerización causa la agregación de un gran número de proteínas formando al “complejo de señalización e inducción de muerte”, o DISC (*death-inducing signalling complex*). El incremento local de la concentración de procaspasas daría lugar al corte por autoproteólisis de estas caspasas. En el DISC también puede encontrarse a la proteína cFLIP que inhibe el procesamiento de la caspasa 8 por la unión a FADD a través de su DED activando vías de supervivencia celular. Las caspasas también pueden ser reguladas negativamente por las IAPs (proteínas inhibidoras de apoptosis). Por lo que la degradación de procaspasa 8 por E6 evita su unión a su receptor (ej. FADD) bloqueando su función [40].



BLANCOS QUE INTERACTUAN CON LA ONCOPROTEÍNA E6 DE VPH-AR				
FORMA DE UNIÓN DE E6	PROTEINA BLANCO	PROCESO CELULAR EN QUE PARTICIPA	DEGRADACIÓN	REFERENCIA
LXXLL	E6-AP	Mediador de la apoptosis	No	[26]
	E6-BP/ ERC-55	Mediadores de la organización epitelial y diferenciación	No	[89]
	IRF-3	Mediadores del reconocimiento inmune	No	[71]
	Paxilina	Mediadores de la organización epitelial y diferenciación	No	[88]
	Tuberina	Reguladores transcripcionales	Si	[27]
	A TRAVÉS DE E6-AP (E6/E6-AP)	BAK	Mediador de la apoptosis	Si
C-MYC		Mediador de la apoptosis	Si	[19]
E6TP1		Reguladores transcripcionales	Si	[68]
hMCM7		Mediadores de la estabilidad cromosomal	Si	[72]
p53		Mediador de la apoptosis	Si	[28]
PTPN3		Mediadores de la adhesión celular, polaridad y control de la proliferación	Si	[73]
hADA		Reguladores transcripcionales	No	[87]
MGMT		Mediadores de la estabilidad cromosomal	Si	[74]
DOMINIO PDZ	hSCRIB	Mediadores de la adhesión celular, polaridad y control de la proliferación	Si	[86]
	hDlg	Mediadores de la adhesión celular, polaridad y control de la proliferación	Si	[75]
	MAGI	Mediadores de la adhesión celular, polaridad y control de la proliferación	Si	[26]
	MUPP1	Mediadores de la adhesión celular, polaridad y control de la proliferación	Si	[76]
	PATJ	Mediadores de la adhesión celular, polaridad y control de la proliferación	Si	[85]
DEDOS DE ZINC	CBP / p300	Reguladores transcripcionales	No	[36]
OTRAS ASOCIACIONES	FADD	Mediador de la apoptosis	Si	[84]
	hTERT	Mediadores de la estabilidad cromosomal	No	[77]
	Gps2	Reguladores transcripcionales	Si	[39]
	Procaspasa 8	Mediador de la apoptosis	Si	[40]
	Fibulina-1	Mediadores de la organización epitelial y diferenciación	No	[83]
	Zyxina	Mediadores de la organización epitelial y diferenciación	No	[78]
	TLR9	Mediadores del reconocimiento inmune	No	[82]
	XRCC1	Mediadores de la estabilidad cromosomal	No	[79]
	Survivina	Mediador de la apoptosis	No	[81]
	TNFR1	Mediador de la apoptosis	Si	[80]

**Cuadro 3.-** Se muestra la interacción de E6 con otras proteínas celulares, así como las consecuencias de dicha interacción.

## Procesamiento alternativo de E6

Por otro lado, a diferencia de los VPH-BR, los transcritos de los genes tempranos E6 y E7 de los VPH-AR son producto de un mRNA bicistrónico. En células derivadas de neoplasias cervicales, los transcritos de la región temprana son procesados codificando formas truncadas de E6, llamados E6\*. En el VPH 16 se han encontrado cuatro llamados E6\* I-IV y en el VPH 18 sólo se reporta el E6\*I. En el procesamiento alternativo de E6 que origina a los transcritos E6\*, se pierde la región C-terminal X-T/S-X-V/L del gen E6 completo al generarse un codón de paro anticipado, perdiéndose el sitio de unión a dominios PDZ, además de perder ambos dominios de dedos de zinc [16, 18, 41].

Los antecedentes muestran que la expresión de E6\*I tiene un efecto antiproliferativo en líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino. También se ha observado que los transcritos E6\*1 pueden interactuar tanto con E6 completo como con E6-AP formando el complejo E6\*/E6/E6-AP y subsecuentemente bloquea la asociación de E6 completo con la proteína p53 y con ello evita su degradación, aunque a la fecha no se le ha atribuido un papel intrínseco a los transcritos E6\*1 [1, 42-45].

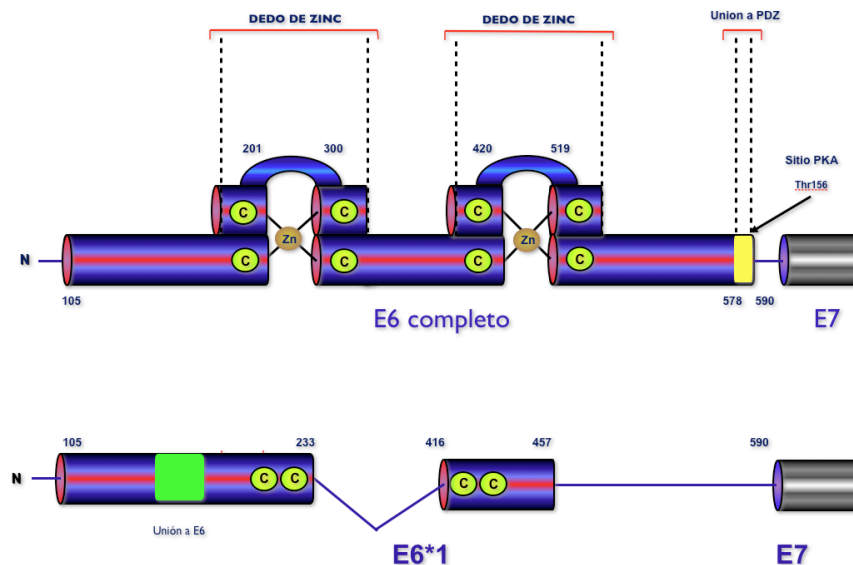


Figura 4. Esquema de la oncoproteína E6 del VPH en donde se muestran los dedos de zinc y su motivo de unión a dominios PDZ. También se muestra la isoforma corta originada por procesamiento alternativo de E6.

### **Papel de E6 en la señalización**

Existen pocos estudios que han reportado diferencias funcionales dentro de las variantes VPH. Un estudio muestra que un cambio de residuo (Leucina –Valina) en la posición 83 de E6 del VPH 16, aumenta la señalización por MAPKs en cooperación con la señalización de Notch-1 llevando a la transformación celular. Las oncoproteínas E6 y E7 regulan independientemente la expresión y actividad de Notch-1 a nivel post-trancripcional. La desregulación de la expresión de Notch-1 en líneas celulares de carcinoma cervical que expresan E6 y E7 causa la inhibición de la proliferación *in vitro* y la tumorigenicidad *in vivo*. Esto sugiere que el incremento de la señalización de Notch-1 mediada por las oncoproteínas E6 y E7 (E7 resulta más efectivo que E6 del VPH 16) puede contribuir a la interrupción de la regulación del crecimiento celular y que Notch-1 es esencial para la inducción de la transformación de las células del epitelio cervical. Se han encontrado aumentadas las formas intracelulares del producto del gen Notch1 en cáncer cervical invasivo a diferencia de las lesiones de alto grado [46].

### **Señalización de Notch**

Como se menciona anteriormente, el mayor blanco de la proteína E6 es p53 y se conoce que p53 regula la transcripción de Notch1, esto lleva a una reducción en los niveles de expresión de Notch1 en células de carcinoma cervical positivos a VPH-AR [7, 47].

Notch-1 es considerado como un supresor de tumores en epidermis de mamíferos y funciona como un determinante en la diferenciación de queratinocitos. La ruta de señalización de Notch es un sistema de señalización fundamental usado por células vecinas para comunicarse unas con otras para asumir su propio papel en el desarrollo. Las proteínas Notch son receptores transmembranales que regulan importantes funciones celulares a través del contacto célula a célula. Interacciones con sus ligandos inician una cascada de señalización que gobierna las decisiones de la célula; tales como diferenciación, proliferación y apoptosis. Los elementos centrales del sistema de señalización de Notch incluyen el receptor Notch, los

ligandos DSL (Delta and Serrate/Jagged in *Drosophila* and vertebrates, Lag2 in *Caenorhabditis elegans*) y las proteínas de unión a DNA CSL (CBF1/RBPJ-kappa in vertebrates, Su(H) [Suppressor of hairless] in *Drosophila*, Lag1 in *C. elegans*) [48].

El producto del gen Notch-1 es un polipéptido precursor (pre-Notch) que es procesado proteolíticamente por una convertasa semejante a Furina en el aparato de Golgi, dando lugar a un precursor heterodimérico. Este último se ancla a la membrana, está formado por una subunidad EC (*extracellular subunit*) y una subunidad TM (*transmembrane subunit*) que está unida a la región IC (*intracellular subunit*). La región EC tiene varias repeticiones en su secuencia de aminoácidos, similares a las del factor de crecimiento epidérmico (*EGF-like*), constituyendo las repeticiones 11 y 12 y el principal sitio de unión a su ligando, proveniente de otra célula [46].

Existen cuatro receptores Notch 1-4, los cuales presentan estructuras muy semejantes con diferencias esenciales entre sí en las porciones extracelulares y citoplásmicas. Notch 1 y 2 presentan 36 repeticiones *EGF-like* en sus dominios EC, mientras que Notch-3 contiene 34 y Notch-4 solamente 29. A nivel del dominio IC Notch-1 presenta un dominio de transactivación fuerte (TAD), mientras que en Notch-2 el TAD es débil y en Notch-3 y 4 no está presente [49].

Cuando el receptor Notch lleva a cabo su unión con el ligando en otra célula, la subunidad TM es procesada proteolíticamente por la Presenilina-1 que es parte del complejo enzimático  $\gamma$ -secretasa, generando que la subunidad IC se transloque al núcleo e interactúa con factores de transcripción de la familia de CLS (*CBF-1/Lag-1/supresor of Hairless*). Al unirse a IC, CBF-1 se disocia un complejo represor que incluye una desacetilasa de histona (HDAC1) y recluta coactivadores nucleares como SKIP y MAML1 (mastermind), lo que hace a CBF-1 actuar como un activador de la transcripción (**Ver figura 5**) [47].

Los ligandos del receptor Notch son Jagged (JAG) o serrate (JAG1, JAG2 y H-Delta 1, -3, y -4; DLL1, DLL3 y DLL4). Los genes blanco de Notch incluyen factores de transcripción represores pertenecientes a las familias de proteínas HES (*hairy and enhancer of Split*) y HRT/HERP/Hey (familia “*Basic helix-loop-helix-Orange*”), IL-4, p21 y ciclina D1 [46].

Aunque la expresión de Notch1 se ha encontrado en lesiones cervicales neoplásicas, particularmente en células de carcinoma escamoso bien diferenciadas, esto desaparece en etapas tardías o pobremente diferenciadas del cáncer cervical [7].

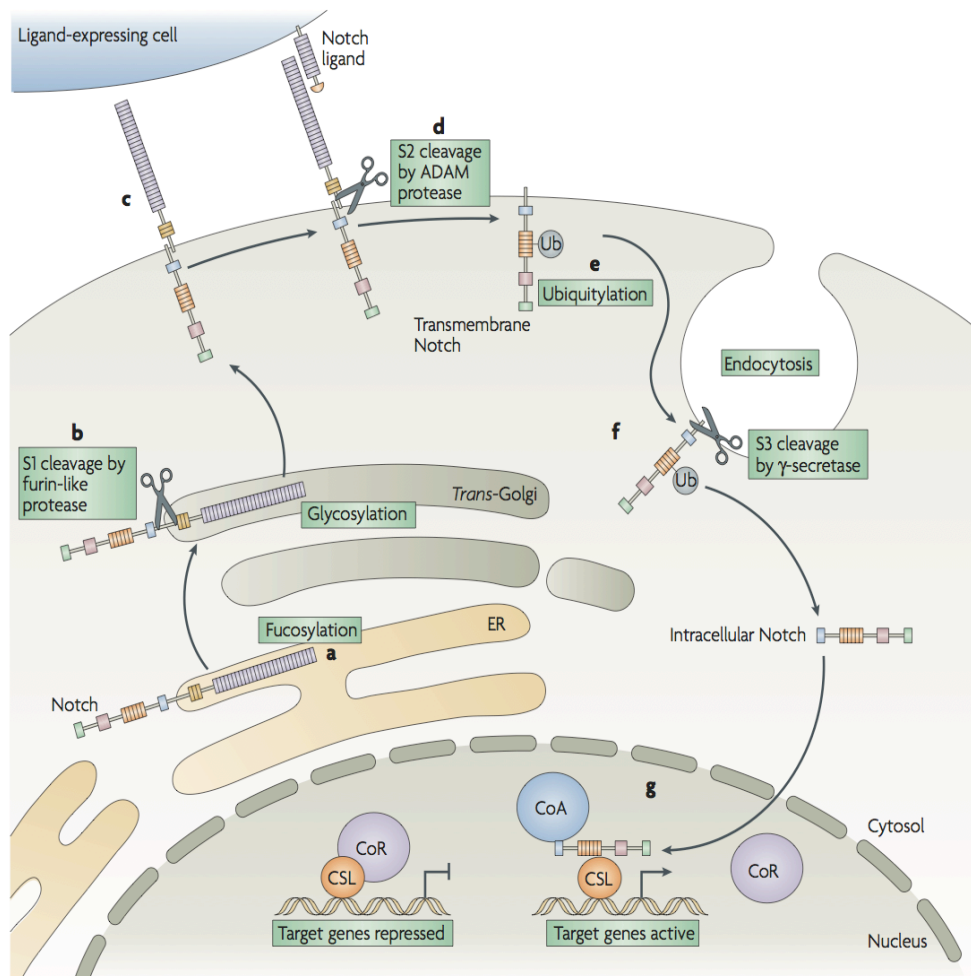


Figura 5. Esquema de la señalización de Notch. Tomado de [7].

## **Ruta de transducción de señales de MAPK**

Las cascadas de señalización son la principal fuente de comunicación entre la membrana plasmática y los blancos en varios compartimentos celulares. Se encuentra presente en todos los eucariotes por lo que es un sistema de señalización primordial. La activación secuencial de cinasas es un mecanismo común de transducción de señales en muchos procesos celulares. Las MAPK son un grupo de proteínas serina /treonina cinasas que son activadas en respuesta a una variedad de estímulos y median la transducción de señales de la superficie celular al núcleo. En combinación con otras cascadas de señalización pueden alterar el estado de fosforilación de numerosas proteínas. Alteraciones en estas enzimas o en la cascada de señalización has sido implicadas en varios tipos de enfermedades incluyendo el cáncer. Existen cuatro mayores grupos de MAPK: las ERKs (Extracellular signal-Regulated Kinases), las MAPK3 p38, las JNK y las ERK5. Cada una de ellas presenta tres niveles; MAPKKK, MAPKK, MAPK [50].

Las ERK son las mas estudiadas y son en las que nos centraremos en este trabajo. Esta cascada de señalización puede ser activada por una amplia variedad de receptores, incluyendo GPCRs (receptores acoplados a proteínas G), RTKs (receptores de tirosina cinasa), integrinas y canales iónicos. El esquema general de activación involucra la activación de RTKs por factores de crecimiento, tales como el EGF (factor de crecimiento epidermal). La subsecuente autofosforilación de la parte intracelular del receptor en residuos de tirosina lleva a la fosforilación de proteínas adaptadoras SHC. Las SHC pueden a su vez reclutar al complejo GRB2 (*Growth Factor Receptor Bound Protein-2*)- SOS (*Son of Sevenless protein*) en la membrana vía SH2 de GRB2 uniéndose a la fosfotirosinas sobre SHC. La SOS, una GEF para Ras, puede intercambiar el GDP unido a Ras por GTP. Una vez unido Ras a GTP puede reclutar a la serina/treonina cinasa Raf a la membrana. Cuando Raf se transloca a la membrana puede fosforilar y así activar a la MEK y esta a su vez fosforilar a ERK1/2 en el residuo de treonina 183 y tirosina 185. Las GPCR también juegan un papel importante en la activación de las ERKs. Cuando las GPCR se activan por ligando; como citocinas, lleva al intercambio de GDP por GTP sobre la

subunidad  $\alpha$  de la proteína G, esta subunidad es separada de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  y son convertidas a un estado unido a GTP que presentan características regulatorias distintivas sobre la adenilato ciclasa, para regular la concentración de cAMP intracelular. Este cAMP puede activar a Rap1 a través de la ruta dependiente de EPAC (*Exchange Protein Activated by cAMP*). Rap1 cuando forma un complejo activo con b-Raf puede activar a MEK1/2 resultando finalmente en la activación de las ERK1/2. El cAMP también puede activar a la PKA como ya habíamos mencionado anteriormente, la cual puede activar a su vez a Rap1 y a su vez a b-Raf. Por otro lado, PKA también puede inactivar a c-Raf. Además la subunidad  $\alpha$  también activa directamente a la PLC (*Phospholipase-C*) que puede activar a PKC (*Protein Kinase-C*) vía DAG (*Diacylglycerol*). PKC además activa a Raf y así hasta llegar a la activación de las ERKs. UN nuevo mecanismo recientemente se ha identificado que regula las interacciones MEK-ERK y es dependiente de Rac y PAK (*p21-Activated Kinase*). Las integrinas también juegan un importante papel en la regulación de la eficiencia de la ruta RTK/Ras/ERK. FAK (*Focal Adhesion Kinase*) es el mayor tirosina cinasa (no receptor) activada por después de la unión de proteínas como la fibronectina a la matriz extracelular. La interacción entre FAK y la parte intracelular de la integrina resulta en la autofosforilación de FAK (FAK pY397) que pueden llevar a la estimulación de la cascada de señalización que activa a la ruta Ras/ERK. Además, los miembros de la familia Src de proteínas cinasas de tirosina (no receptores) también se asocian con FAK y son involucrados en la señalización mediante integrinas. Interesantemente, Src y FAK aparecen para funcionar en asociación una con otra como resultado de la unión del dominio SH2 de Src a un sitio de autofosforilación de FAK creando sitios de unión para dominios SH2 para otras moléculas de señalización río abajo, incluyendo PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*) y Rac. Un blanco clave de Rac es PAK. Rac puede sinergizar con c-Raf para promover la activación de las ERKs a través de mecanismos que involucran la fosforilación de MEK1 por PAK1, y la fosforilación de Raf por PAK3. PAK3 puede fosforilar a c-Raf, aumentando la activación de c-Raf y esta finalmente activar a las ERK1/2 vía MEK1/2. Las ERKs una vez activadas se translocan al núcleo para fosforilar y activar a varios blancos celulares. El mayor blanco celular de ERKs es

RSK (90 kDa Ribosomal protein S6 Kinase). Activar a RSK parece jugar un gran papel en la regulación transcripcional, la translocación al núcleo y la fosforilación de blancos como c-Fos, c-myc y CREB, entre otros (figura 6) [31, 51-55].

Recientemente se ha reportado que E6 de VPH18 aumenta la fosforilación de las ERK1/2 en la línea celular MCF7. Esta es una forma por la cual el VPH puede regular la proliferación de las células a las que infecta, aunque se desconoce su mecanismo [56].

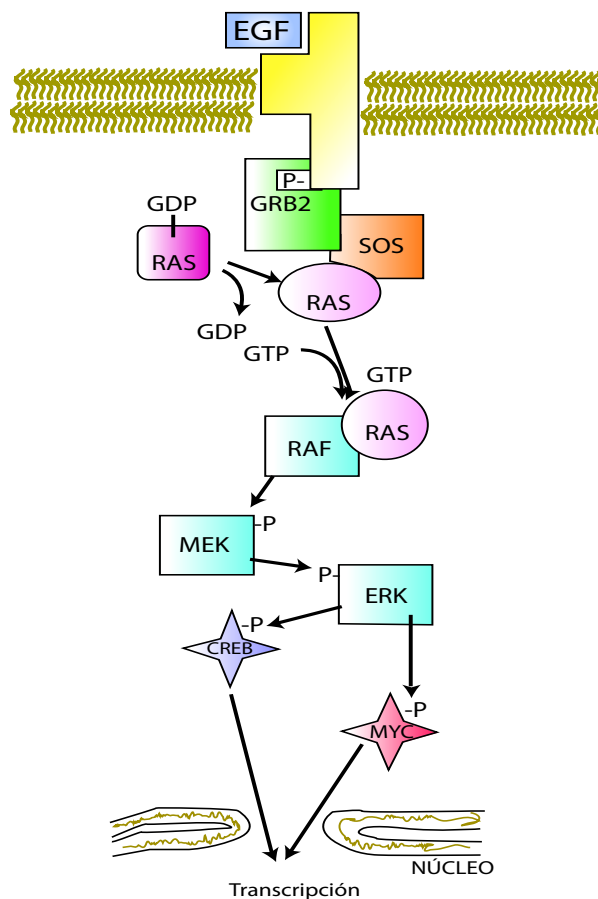


Figura 6. Esquema de la Señalización de las MAPK.

### RUTA de PI3K/Akt

Otra ruta de señalización involucrada en la regulación de la proliferación, crecimiento y movilidad celular, es la vía de PI3K/Akt. Se ha reportado que en células MCF7



transfectadas con E6 de VPH18 puede modularla vía activación de PI3K y por la influencia de E6 sobre PTEN, correlacionado con la degradación de la proteína hDlg, que como ya se menciono, sirve como anclaje de PTEN a la membrana celular [56].

Los ligandos más comunes que activan la vía de PI3K incluyen factores de crecimiento, citocinas y hormonas. Todos ellos se unen a los RTKs (receptor de tirosina cinasa) y causan la autofosforilación de residuos de tirosina en el dominio intracelular del receptor. La PI3K (*Phosphoinositol 3-Kinase*) es reclutada a los residuos de fosfotirosina vía dominios SH2 (homólogo a Src-2) en el dominio regulatorio (p85) y es translocada a la membrana celular. La unión de la subunidad p85 de PI3K a los RTKs fosforilados lleva a cambios conformacionales en el dominio catalítica de PI3K (p110) y conecuentemente la activación de la cinasa. La PI3K también puede ser activada por Ras. La insulina puede activarla mediante los IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate-1*). Las GPCR pueden activar a PI3K vía subunidades b y g de las proteínas G y las citocinas la pueden activar mediante la vía de JAK1 (*Janus Kinase-1*). La PI3K activa fosforila el grupo hidroxilo de la posición 3 del anillo de inositol del PIP2 en la membrana para generar PIP3. La unión de PIP3 al domino PH (*pleckstrin homology*) de Akt provoca su translocación a la membrana llevando a su fosforilación por la PDK1 (*Phosphoinositide-Dependent Kinase-1*). También se ha reportado que PKC $\beta$  (*Protein Kinase-C*) puede fosforilar a AKT, al igual que las integrinas vía FAK. La actividad de AKT es regulada negativamente por la fosfatasa PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*) [50, 57-60].

La PTEN es una fosfatasa dual (para fosfoproteínas y para fosfoinositidos). Aunque puede desfosforilar a la proteína FAK, predominantemente la actividad anzimática de PTEN es la desfosforilación de PIP3 (*Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*) y (*Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate*) en la posición 3 del anillo de inositol, genrando PIP2 (*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) y PIP (*Phosphatidyl Inositol Phosphate*) respectivamente, así antagoniza a la activación de PI3K y regula indirectamente a la AKT. Ésta se encuentra involucrada en varias respuestas

biológicas, tales como la inhibición de la apoptosis y la estimulación de la proliferación celular, síntesis de proteínas, regulación de factores de transcripción en el ciclo celular. AKT ejerce sus efectos en la célula por la fosforilación de una gran variedad de sustratos río abajo, los cuales incluyen a BAD (*BCL2 Antagonist of Cell Death*), caspasa 9, MDM2, CREB, c-Raf, mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), TSC (*Tuberous Sclerosis*), entre otros muchos [57, 61].

La Akt puede fosforilar e inhibir así a la proteína TSC2 (tuberina) que en su forma activa forma un complejo (TSC1-TSC2) con TSC1 (hemartina) que actúa como GAP para la GTPasa Rheb (de la familia Ras). Rheb-GTP promueve la fosforilación de la cinasa mTOR (*Target of rapamycin*) activándola. La mTOR forma un complejo con Raptor (*Regulatory-associated protein of TOR*). La activación de mTOR resulta en la fosforilación de la proteína ribosomal S6 cinasa y en la fosforilación e inactivación de eIF4EBP (*Eukaryotic Initiation Factor-4E Binding Protein*). El eIF4EBP es un inhibidor de la síntesis de proteínas por su habilidad de unirse y bloquear al factor de inicio de la traducción eIF4E; la fosforilación de eIF4EBP por Akt causa la liberación de eIF4E y con ello la estimulación de la síntesis de proteínas. Tanto la fosforilación de la proteína ribosomal S6 cinasa como del eIF4EBP, resulta en una regulación selectiva de la traducción, produciendo proteínas específicas requeridas por la célula para crecer y/o iniciar la división celular [60, 62].

Entre los mensajes cuya traducción es regulada selectivamente por esta vía de señalización se encuentran los que codifican para las proteínas ribosomales y algunos factores de traducción. Estos mensajes tienen una característica estructural común que consiste en una secuencia rica en pirimidinas en su región 5'UTR. Esta firma de nucleótidos, designada 5'TOP (*tract of oligopyrimidine*), confiere selectividad traduccional a los mensajes, en células inducidas por estímulos mitogénicos y/o nutricionales (figura 7) [63] [64].

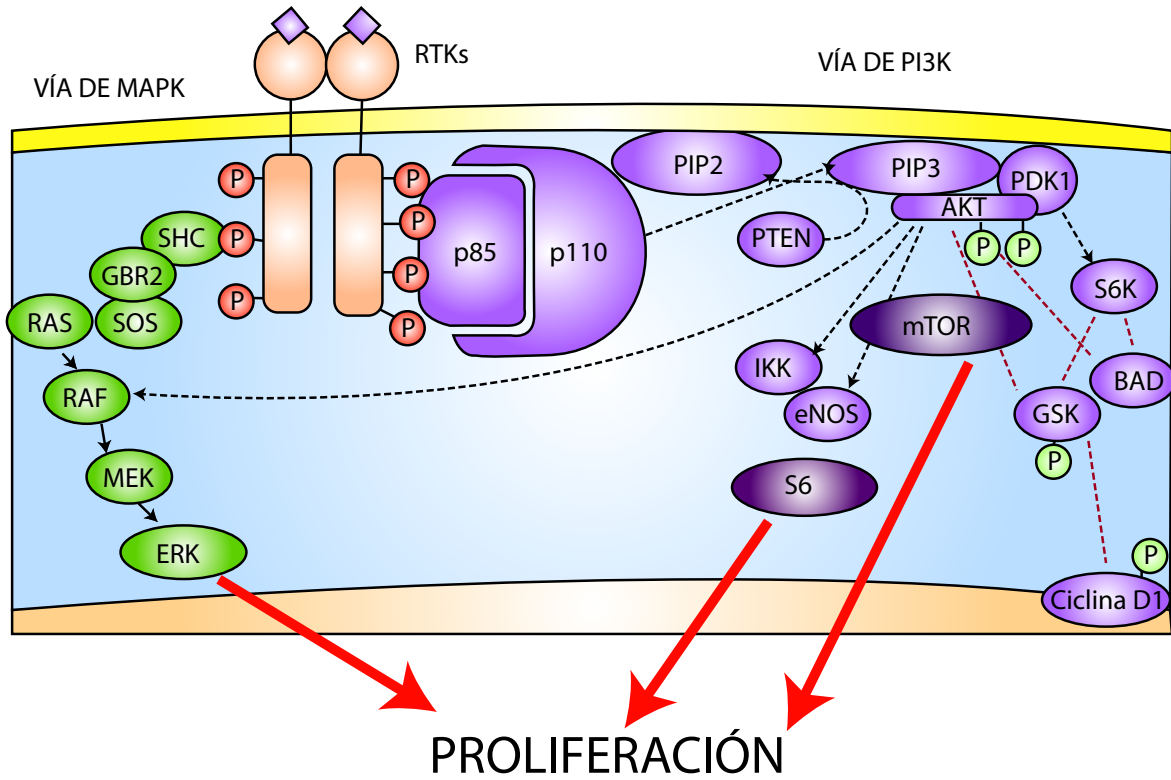


Figura 7. Esquema de las Vías de señalización de las MAPK y PI3K. Las líneas punteadas de color rojo denotan inactivación y las flechas oscuras activación.

## 2.- ANTECEDENTES

Trabajos en el laboratorio han mostrado que en la población mexicana se encuentran tres variantes del VPH 18: europea (E), africana (Af) y la asiático-amerindia (variante de referencia, AsAi) [10]. Se ha encontrado una estrecha asociación entre estas variantes y el grado de malignidad. En el caso de las variantes europea y asiático-amerindia se observó que células transfectadas con estas variantes presentan bajos niveles de la proteína p53 con respecto a la variante africana, afectando a los niveles de las proteínas celulares reguladas por p53. Por otro lado se ha comprobado que E6 corto (E6\*I) puede unirse a E6 completo y competir por la unión a p53 formando el complejo E6/E6\*/E6-AP [43]. Así, E6\*I probablemente pueda controlar la degradación de p53, inhibiendo la inmortalización celular y la integración genómica viral durante la infección viral.

Por otro lado, en el laboratorio se ha analizado el efecto de E6 de las variantes del VPH 18 en proteínas que intervienen en la vía de señalización de PI3K/Akt (PI3K, PTEN y Akt), así como hDlg, PKC y ERKs, y se ha demostrado que E6 del VPH 18 modula diferencialmente la degradación de hDlg, repercutiendo en la actividad de PTEN y Akt. En células transfectadas con E6 de la variante africana se ha encontrado una menor degradación de hDlg a diferencia de las variantes europea y asiático-amerindia que presentaron una mayor degradación. Para el caso de la PTEN, en presencia de las variantes de E6 de VPH 18 no se encontraron diferencias en el nivel total de la proteína, pero sí se encontraron grandes diferencias en el nivel de fosforilación dentro de las variantes. Las variantes europea y asiático-amerindia mostraron niveles muy bajos de PTEN fosforilada con respecto a la variante africana. Para el caso de la PI3K, se encontró que la presencia de E6 de las variantes AsAi Y E inducen un aumento en la fosforilación de esta cinasa, mientras que con la variante africana el nivel de PI3K fosforilada fue semejante al observado en células sin E6. También se ha observado que la presencia de las tres variantes E6 inducen un incremento de la forma Akt fosforilada, aún cuando no existe una diferencia clara entre las tres variantes [56].

Se conoce que la vía de señalización de PI3K se encuentra asociada con la señalización de las MAPK, la cuales regulan la supervivencia y la proliferación celular, respectivamente. Se encontró que E6 de las variantes de VPH 18 modulan diferencialmente esta última vía de señalización, ya que al determinarse los niveles de fosforilación de las ERK1/2 en células tranfectadas con E6 de estas variantes, se encontró que las variantes E y AsAi aumentan considerablemente la fosforilación de ERK1/2 a diferencia de la variante Af. Esto se correlacionó con el incremento significativo en la tasa de proliferación inducida por las variantes E y AsAi [56].

### **3.- JUSTIFICACIÓN**

Dada la alta frecuencia de VPH 18 en cáncer cervicouterino, es necesario el estudio de este tipo viral así como de las variantes encontradas en México. Previamente en nuestro laboratorio se ha demostrado que E6 de la variante AsAi de VPH 18 puede aumentar el nivel de fosforilación de PI3K, y de las ERKs, las cuales forman parte de las vías de señalización de Akt y MAPKs, respectivamente. Existen reportes de que E6 del VPH 16 en células HaCat, puede activar la vía de señalización de las MAPK y que su variante (L83V) aumenta éste efecto, lo cual es explicado a través de una cooperación con la señalización desregulada de Notch-1 [48]. Sin embargo, no hay estudios acerca de los elementos involucrados en la activación de la señalización de MAPKs por E6 de las variantes de VPH 18. De igual modo, se desconoce si la activación por E6 sobre las MAPK es directa por las ERKs o si existen otros elementos involucrados de esta vía.

Dado los antecedentes nos preguntamos ¿qué efectos tendrán las proteínas E6 de las variantes de VPH 18 río arriba de la vía de señalización de las ERK's y cómo se relacionan estos efectos con la señalización de PI3K y la proliferación celular?.

#### **4.- HIPÓTESIS**

La proteína E6 de las variantes africana y asiático-amerindia de VPH 18 modulan diferencialmente elementos río arriba de las ERKs repercutiendo en un aumento en la proliferación celular.

#### **5.- OBJETIVOS:**

##### **OBJETIVO GENERAL:**

Definir el efecto de las proteínas E6 de variantes de VPH 18 en los elementos que participan en la vía de señalización de MAPK.

##### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- \*Determinar el patrón de expresión de las proteínas E6 de las variantes africana y asiático-amerindia de VPH18 en las líneas celulares MCF7 y C33A, transfectadas establemente.
- \*Corroborar la participación de las proteínas E6 de las variantes de VPH18 en la activación de PI3K en las líneas celulares MCF7 y C33A.
- \*Demostrar la participación de E6 de las variantes Af y AsAi en la activación de los elementos de la vía de MAPKs.
- \*Definir el efecto de las proteínas E6 de las variantes de VPH18 en proliferación celular.

## 6.- METODOLOGÍA

### Líneas celulares:

**C33A.-** Es una línea celular de origen epitelial de biopsias de cáncer de cérvix, la expresión de p53 es elevada y se encuentra en forma mutada. Las células son negativas para DNA del VPH.

**MCF7.-** Línea celular de adenocarcinoma de mama, p53 se encuentra en su estado silvestre.

### Cultivo de células:

Para el desarrollo del presente trabajo se emplearon clonas estables de las líneas celulares MCF7 y C33A previamente transfectadas con el gen de la proteína E6 de las variantes asiática-amerindia (AsAi) y africana (Af). El medio base para las células fue DMEM F12, GIBCO, BRL, Gaithersburg, MD, USA, suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF, GIBCO, BRL, Gaithersburg, MD, USA). Los cultivos celulares se mantuvieron en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37 °C.

### Transfección:

Los plásmidos pcDNA3.1-E6 de Invitrogen (presenta el promotor de citomegalovirus y genes de resistencia para genitocina) con los genes E6 clonados de las variantes africana (Af) y asiático-amerindia(AsAi), fueron transfectados en las líneas celulares MCF7 y C33A por el método de liposomas mediante el kit *Lipofectin Reagent* (Gibco-BRL). Para ello se sembraron 200 000 células por pozo en cajas de 6 hasta obtener 40 al 60 % de confluencia. Se prepararon las siguientes soluciones: Solución A (Se diluyeron 4 µg de DNA en 100 µL de medio sin suero, para cada transfección), Solución B (Se diluyó 10 µL de lipofectina en 100 µL de medio sin suero), Se dejaron a temperatura ambiente 30 a 45 min. Posteriormente se combinaron mezclando gentilmente y se incubaron de 10 a 15 min a temperatura ambiente. Aparte, las células se lavaron con medio sin suero dos veces y se les adicionó 800 µL de la

mezcla de las soluciones a cada pozo y se incubaron de 5 a 24 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>; pasado este tiempo se cambió el medio.

Para la selección de las clonas estables de las variantes del gen E6, se dejaron crecer durante 48 horas y se crecieron en presencia de 800 µg/mL de geneticina o G418 (neomicina) (Sigma) con la finalidad de seleccionar las clonas transfectadas. El proceso de selección se mantuvo por lo menos durante un mes.

### **Extracción de DNA a partir de líneas celulares:**

Se retiró el medio de las cajas de cultivo con pipeta pasteur y bomba de vacío, se lavaron las células con PBS 1X y se les adicionó una solución de tripsina 1X hasta cubrir la monocapa (entre 0.7 a 1 mL para cajas de 50 mL y 1.5 mL para cajas de 250 mL). Se dejó actuar hasta que la monocapa empezó a opalescer. El efecto de la tripsina se detuvo adicionando 2 volúmenes de medio de cultivo. Se transfirieron las células a un tubo falcon y se centrifugaron a 1500 rpm (Beckman GPR, rotor GH3-7) durante 5 min. Los botones se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron nuevamente con las mismas condiciones.

Los botones obtenidos se resuspendieron en 500 µL de amortiguador de lisis (Tris-Cl 10 mM pH 8, EDTA 0.1 M pH 8, RNasa 20 µg/mL, SDS 0.5 %) y 20 µL de proteínasa K (20 mg/ mL). Se incubaron dos horas a 55 °C 450 rpm. y se les adicionó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) saturado y equilibrado con TRIS. Se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 12 000 rpm (Sorvall Heraeus) durante cinco min. Se recuperó las fases acuosas y se repitió la extracción orgánica. Se les añadió 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), y se centrifugaron a 12 000 rpm (Sorvall Heraeus) durante 5 min. Se les agregó 2 volúmenes de etanol al 100 % y 0.1 volúmenes de acetato de amonio 10 M a la fase acuosa. Las muestras se incubaron al menos 30 min a -70 °C. y se centrifugaron a 12 000 rpm (Sorvall Heraeus) por 25 min, los botones se lavaron con etanol al 70 % y se centrifugaron a 12 000 rpm (Sorvall Heraeus) por 5 min. Finalmente, los botones se resuspendieron



en 200  $\mu$ L de agua esterilizada. Una vez obtenidos los DNA se cuantificaron en un espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer). La calidad y concentración de los DNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa.

### Amplificación del gen E6:

Se amplificó por PCR el gen E6 con los oligonucleótidos:

E6 5' VPH 18Bam HI

5'-GGG **GGA TCC** ATG GCG CGC TTT GAG GAT CCAACA-3'

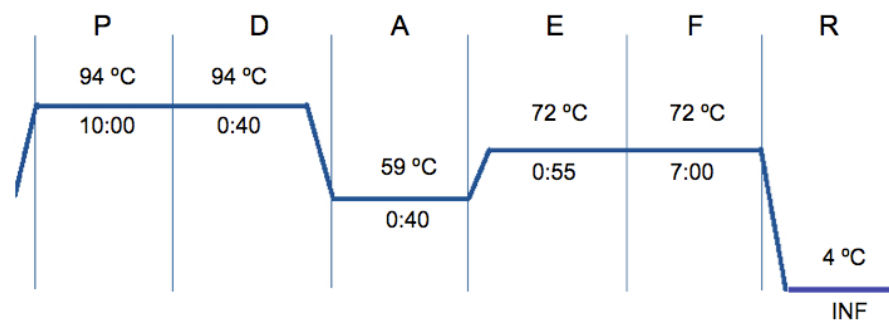
E6 3'VPH 18 Hind III

5'-GGG **AAG CTT** TTA TAC TTG TGT TTC TCT GCG TCG-3'

Estos delimitan al gen E6 completo que consta de 477 pb, y consta de las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción Hind III y Bam HI (marcada con **negritas** en la secuencia mostrada, así se obtiene un fragmento de 495 pb

El volumen de reacción para la PCR fue de 25  $\mu$ l totales, con dNTP a 200  $\mu$ M, MgCl 2 mM, amortiguador de la Taq 1x, 10 pM de cada oligonucleótido, 0.4 U de Taq Gold (Perkin Elmer) y 200 ng de DNA previamente obtenido.

Las condiciones de la reacción fueron:



### **Extracción de RNA**

Para la extracción de RNA se usó el sistema RNAeasy (Invitrogen). A los botones de las células transfectadas con E6 de las variantes de HPV 18 obtenidos con tripsina se les añadió 400  $\mu$ L de amortiguador RLT (agregando 1  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol por 100  $\mu$ L de amortiguador RTL). Los botones se disgregaron y se les agregó 400  $\mu$ L de etanol al 70% y se continuó con las recomendación del fabricante.

### **RT-PCR:**

El RNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer). La calidad y concentración del RNA se verificaron por electroforesis en geles de agarosa. Se utilizó 1  $\mu$ g de RNA total para transcripción inversa a cDNA, usando hexámeros de oligonucleótidos aleatorios con el sistema de síntesis de la primera cadena para RT-PCR: Superscript (Invitrogen Life Technologies). Las condiciones de la reacción fueron: 15 min 42 °C, 5 min 99 °C y 5 min 4 °C. Posteriormente, el cDNA se amplificó por PCR usando los primer antes mencionados específicos para el gen E6 del VPH18.

### **Extracción de proteínas totales:**

A los botones de las células MCF7 y C33A transfectadas con las variantes referencia y Af, se les adicionó 250  $\mu$ L de amortiguador RIPA (Np40 1%, desoxicolato de sodio 12 mM, SDS 0.1 %, en PBS 1X) y un cocktail de inhibidores de proteasas (Complete de Roche), se disgregaron y se incubaron durante 30 min en hielo. Las muestras se centrifugaron (Mikro 22R Hettich Zentrifugen) a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C y los sobrenadantes se cuantificaron mediante el método del ácido bicinonílico.

### **PAGE-SDS y Western blot:**

Las proteínas se separaron en geles de acrilamida-SDS (PAGE-SDS) a una concentración de 10 % durante 90 min. Se transfirieron por electrotransferencia (60 min a 100 mV) a Membranas de difluoruro de polivinil (PVDF; ROCHE). Para el Western blot se bloquearon los sitios no específicos de la membrana con leche baja

en grasa durante al menos una hora. Para la detección de las diferentes proteínas, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos policlonales contra PI3K, Ras, c-Raf, MEK y Rap1, en su caso también para sus formas fosforiladas (1:1000) (Cell signal). Se dieron tres lavados de 15 min c/u con TBS Tween 0.1 %. Para la detección del complejo proteína-anticuerpo primario se usaron anticuerpos (1: 5000 durante 60 min a temperatura ambiente, y se repitieron los lavados) peroxidados y se detectaron por medio del sistema de quimioluminiscencia (Amersham, LIFE Science, Chalfont, Buckinghamshire, England). Para visualizarlos se les colocó el sustrato durante unos segundos y se eliminó el exceso. La membrana se expuso a una placa radiográfica (Hyper film ECL, Amersham, LIFE Science, Chalfont, Buckinghamshire, England) por 10 min y se fijó. Para normalizar la cantidad de proteínas totales se utilizó anticuerpo contra actina (Santa Cruz Biotechnology).

### **Ensayo de cristal violeta**

En cajas de 24 pozos se sembraron 70 000 células por pozo, las células se sincronizaron por privación de suero y se incubaron durante 24, 48 y 72 h. Al término de cada tiempo se fijaron con 300 µL de formol y una vez fijadas se tiñeron con 300 µL de cristal violeta al 0.1 % durante 20 min a temperatura ambiente y con agitación. Las placas se lavaron y secaron para eluir el colorante con 300 µL de ácido acético al 10 % durante 20 min a temperatura ambiente con agitación. Se tomó una alícuota de 100 µL del colorante eluido y se analizaron a 570 nm.

### **Análisis estadístico**

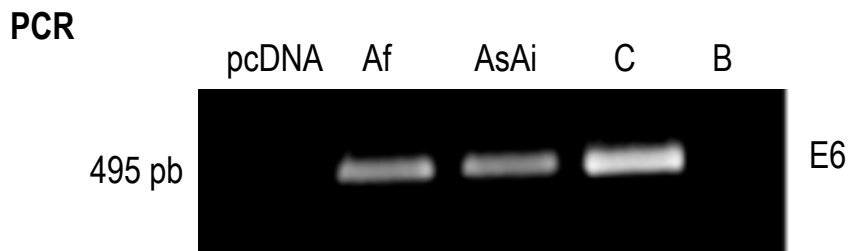
Los resultados mostrados de los efectos de la oncoproteína E6 de VPH 18 sobre las proteínas involucradas en la señalización de las MAPK y de PI3K fueron graficadas con  $\pm$ SD de tres ensayos. Los análisis de densitometría de los Western blots se realizaron con el programa NIH IMAGEN version 1.62 y los resultados fueron expresados como porcentaje por arriba del control, marcadas con un asterisco indicando la diferencia significativa al 95 % de confiabilidad.

## 7.- RESULTADOS:

### Amplificación del oncogen E6 de las variantes africana (Af) y asiático-amerindia (AsAi) del VPH 18 en MCF7.

En este trabajo se tuvo el interés de observar el efecto de las variantes africana y asiático-amerindia de VPH18 sobre los elementos de la cascada de señalización de las MAPK.

Para observar el efecto de E6 sobre los elementos de la señalización de las MAPK, el gen E6 de las variantes AsAi y Af de VPH 18 se transfectó en la línea celular MCF7. Se obtuvo el DNA y se amplificó usando el par de oligonucleótidos que se indican en Métodos. La amplificación originó una banda de alrededor de 495 pb, la cual corresponde al fragmento esperado para E6 (figura 8).



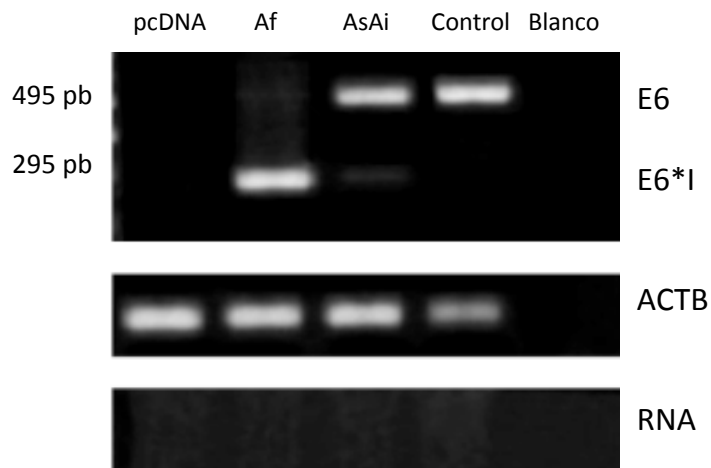
**Figura 8.-** Amplificación de las variantes africana y asiático-amerindia del oncogen E6 del VPH 18 en la línea celular MCF7. *pcDNA*; Células transfectadas con el vector solo, *Af*; Células transfectadas con E6 de la variante africana del VPH 18, *AsAi*; Células transfectadas con E6 de la variante asiático-amerindia del VPH 18, *C*; DNA de la línea celular HeLa como control (VPH 18 positiva), *B*; Blanco.

### Patrón de expresión diferencial de E6 dentro de las variantes Af y AsAi de VPH 18 en la línea celular MCF7.

El patrón de expresión de E6 se obtuvo mediante RT-PCR usando el mRNA total obtenido de las células previamente transfectadas. Del cDNA obtenido, se realizó una amplificación por PCR específica para E6 de VPH18, como se indica en

métodos. En la figura 9 se muestran las diferencias encontradas a nivel transcripcional entre la variante africana y la variante asiático-amerindia de VPH18 del oncogen E6 en la línea celular MCF7. En ambas variantes se encontraron los dos transcritos, que corresponden a 495 nt para el transcrito de E6 completo y de 295 nt para el transcrito E6\*I, producto del procesamiento alternativo de E6.

### RT-PCR



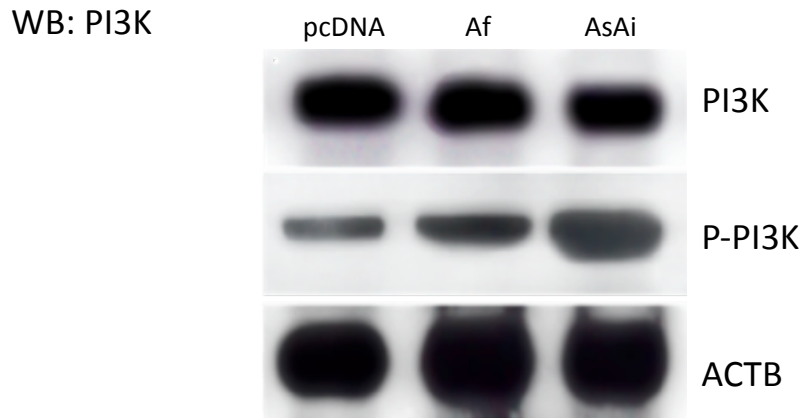
**Figura 9.-** Análisis del patrón de expresión de las dos variantes del oncogen E6 del VPH 18 en la línea celular MCF7 transfectada. *pcDNA*; células transfectadas con el vector vacío, *Af*; células transfectadas con la variante africana, *AsAi*; células transfectadas con la variante asiático-amerindia, *C*; DNA de HeLa (control), *B*. Blanco.

En las células transfectadas con la variante asiático-amerindia se encontraron altos niveles del transcrito completo de E6 en relación con el transcrito E6\*I. A diferencia, las células transfectadas con la variante africana que fue favorecida la expresión del transcrito E6\*I y los niveles de E6 completo fueron mínimos. En la misma figura se muestra la comparación de los productos del RT-PCR del gen actina (ACTB) mostrando el equivalente de RNA usado en cada ensayo y como control de contaminación de DNA, en las reacciones de PCR se incluyeron muestras de RNA que resultaron negativas a la amplificación.

### **Efecto sobre las proteínas PI3K, Ras, c-Raf, MEK1/2 y Rap1 de la expresión diferencial de E6 de las variantes africana y asiático-amerindia del VPH 18.**

El importante papel de E6 en la carcinogénesis cervical resulta de las propiedades de E6 para interactuar con diversas proteínas involucradas en varios procesos celulares (ver cuadro 3). La señalización de PI3K y MAPK son vías centrales en la supervivencia y proliferación celular que comúnmente se encuentran afectadas en varios tipos de cáncer. En este trabajo se tuvo el interés de determinar el efecto de E6 de las dos variantes de VPH18 sobre los elementos involucrados en esta señalización. Esto se analizó mediante anticuerpos que reconocen a los diferentes elementos de esta vía en su forma total y en su caso; en su forma fosforilada. Para ello, las células previamente transfectadas con ambas variantes se cultivaron hasta obtener alrededor del 70 % de confluencia, se obtuvieron las proteínas totales y se cuantificaron según los métodos descritos. Se determinó la influencia de E6 sobre los niveles de las proteínas PI3K, Ras, Raf, Mek1/2 y Rap1, mediante Western blot. En todos los casos se compararon los productos de los Western blots con actina (ACTB) mostrando el equivalente de proteína usado en cada ensayo.

La figura 10 muestra el Western blot de detección de la cinasa PI3K. Aunque ambas variantes presentaron un incremento en la fosforilación de PI3K, la variante AsAi mostró un mayor aumento en los niveles de la cinasa fosforilada con respecto a la variante Af y al control pcDNA.

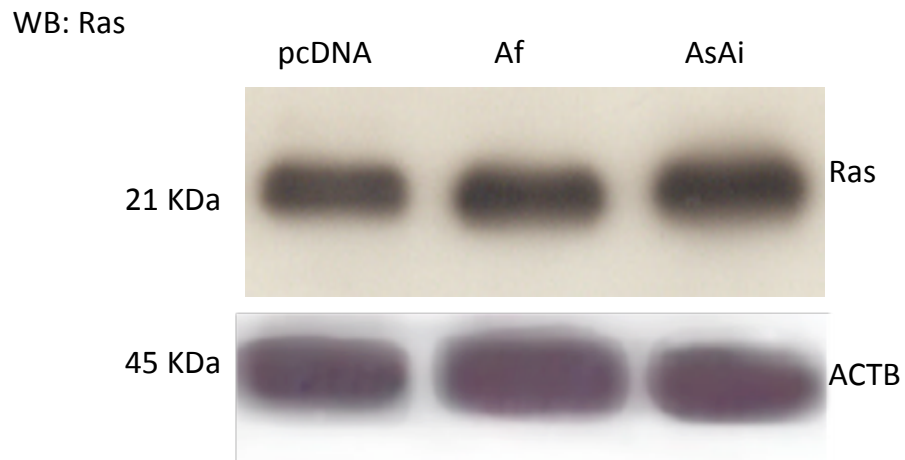


**Figura 10.-** Western blot contra PI3K en las línea celular MCF7 previamente transfectada con E6 de las variantes africana y asiático-amerindia de VPH18.

PI3K es una cinasa clave en la cascada de señalización de PI3K/Akt que regula la supervivencia celular. Es bien conocido que esta vía de señalización se encuentra muy relacionada con la cascada de señalización de las MAPK. En el laboratorio ya se había encontrado que E6 de las variantes de VPH18 inducen diferencialmente la activación de PI3K [56]. Es por ello que en este trabajo nos enfocamos en determinar los efectos de estas variantes en la vía de señalización de las MAPK.

La señalización de las MAPK puede ser activada por Ras, como ya se mencionó anteriormente. En mamíferos se han encontrado tres genes de esta GTPasa; NRAS, KRAS y HRAS, las proteínas correspondientes funcionan como reguladores de diferentes señales de proliferación y supervivencia. Aunque varios efectores de RAS se han descrito, la vías de PI3K y MAPK son las más importantes.

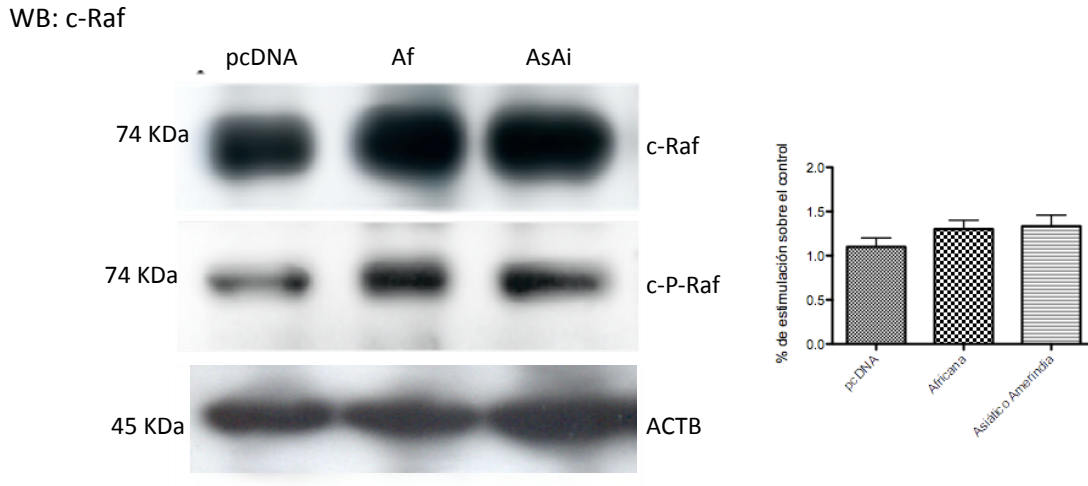
En este estudio se determinó el efecto de E6 de las variantes de VPH18 sobre los niveles totales de RAS en la línea celular MCF7, mediante el Western blot. No se encontraron diferencias en los niveles de la proteína Ras para las dos variantes con respecto al control pcDNA (figura 11).



**Figura 11.-** Western blot contra Ras en las línea celular MCF7 previamente transfectadas con E6 de las variantes africana y asiático-amerindia.

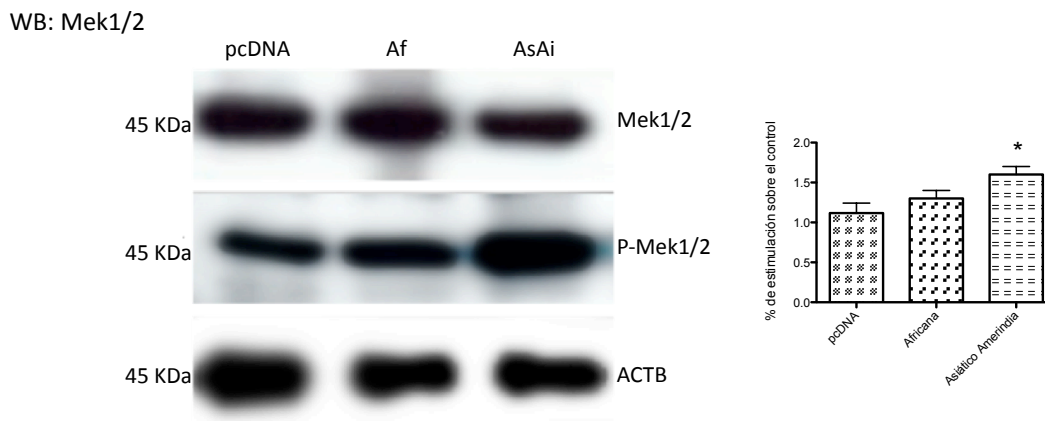
La cascada de las MAPK es una ruta central que juega en papel en la regulación de varios procesos celulares tales como la diferenciación, desarrollo, supervivencia y proliferación. Esta cascada de señalización se puede dividir en tres niveles, en el primero se encuentra c-Raf (MAPKKK), en el segundo nivel encontramos a Mek (MAPKK) y por último encontramos a las ERK1/2 (MAPK). De la misma forma que Ras, se analizó el efecto de E6 de VPH18 sobre la fosforilación de los dos primeros niveles. En el Western blot contra c-Raf (figura 12) no se observaron cambios significativos en la fosforilación de esta cinasa en ambas variantes con respecto al control pcDNA.





**Figura 12.-** Western blot de c-Raf en la línea celular MCF7 previamente transfectadas con E6 de las variantes africana y asiático-amerindia. A la derecha se representa los análisis de densitometría de tres ensayos independientes con un intervalo de confianza del 95 % ( $\alpha = 0.05$ ).

En el segundo nivel de la cascada se encuentra la MAPKK llamada Mek. El análisis del Western blot contra esta cinasa mostró que la presencia de E6 de ambas variantes de VPH18 (figura 13) induce un aumento en la fosforilación de Mek1/2 y entre las variantes, la AsAi mostró un mayor nivel de fosforilación.

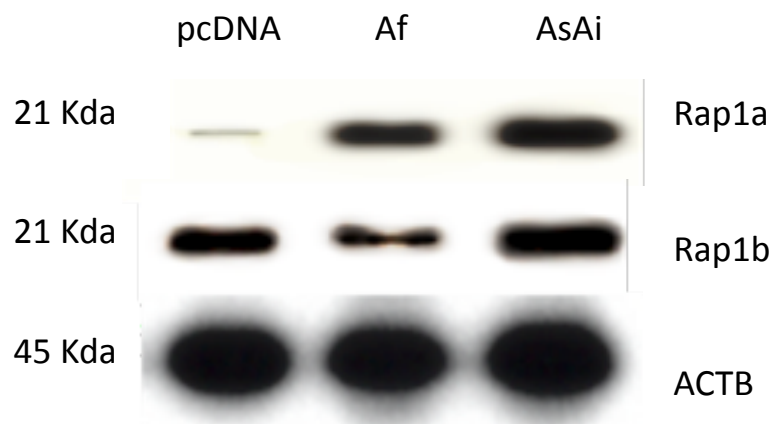


**Figura 13.-** Western blot de Mek1/2 en las línea celular MCF7 previamente transfectadas con E6 de las variantes africana y asiático-amerindia. A la derecha se representa los análisis de densitometría de tres ensayos independientes, en la que el asterisco (\*) indica la diferencia significativa relacionada al control pcDNA con un intervalo de confianza del 95 % ( $\alpha = 0.05$ ).

Ahora bien, se mencionó que la pequeña GTPasa Ras es responsable de la activación de la cascada de las MAPK mediante la activación de Mek al reclutar y activar a c-Raf, pero las MAPK también pueden ser activadas de forma independiente a Ras y es por otra pequeña GTPasa homóloga a Ras llamada Rap1. Ras y Rap1 son altamente similares a nivel de su secuencia de residuos, las regiones más conservadas corresponden a las regiones *switch1* y *switch2*, que son las dos regiones que adoptan diferentes conformaciones cuando se encuentran unidas a GDP o GTP y aunque son idénticas en la región efectora y las dos moléculas son afines por c-Raf, solo Ras puede activarlo [65].

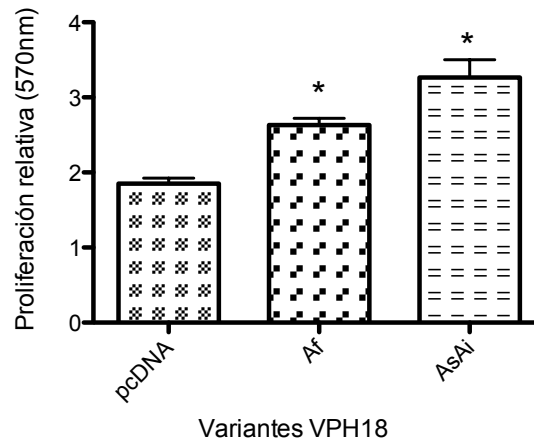
Estudios iniciales se centraron en la habilidad de Rap1 para antagonizar a Ras [66]. Sin embargo, Rap1 también puede activar a la isoforma B-Raf para activar a las ERKs. Nosotros determinamos el efecto de E6 de las variantes Af y AsAi de VPH18 sobre esta GTPasa. En la figura 14 se muestra un Western blot contra Rap1. Se encontró que E6 de ambas variantes de VPH18 aumentan los niveles de esta proteína.

WB: Rap1



**Figura 14.-** Western blot representativo de dos ensayos independientes contra las isoformas de Rap1 en la línea celular MCF7, previamente transfectada con E6 de las variantes africana y asiático-amerindia.

Para observar las consecuencias biológicas de los efectos mostrados por la oncoproteína E6 sobre los elementos de la señalización de MAPK, se realizaron curvas de proliferación (figura 15). Se encontró un aumento en la proliferación de las células transfectadas con E6 de ambas variantes, aunque la variante AsAi mostró un aumento del 20% en la proliferación a las 72 h.



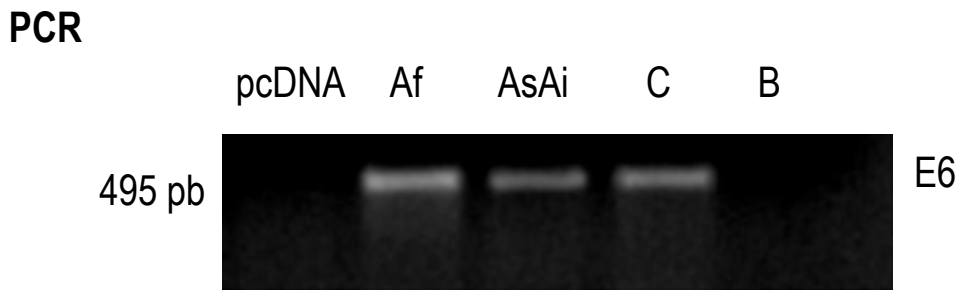
**Figura 15.-** Proliferación de la línea celular MCF7 transfectada con E6 de las variantes de VPH18 a las 72 h. La gráfica representa el promedio +/- la desviación estándar de tres ensayos independientes, en la que el asterisco (\*) indica la diferencia significativa relacionada al control pcDNA con un intervalo de confianza del 95 % ( $\alpha = 0.05$ ).

### **Amplificación del oncogen E6 de las variantes Af y AsAi del VPH 18 en la línea celular C33A.**

Además de la línea celular MCF7 también se usó la línea C33A que es negativa para el genoma del VPH y con p53 mutado para ver el efecto de E6 sobre los elementos antes estudiados.

De la misma forma, se obtuvo el DNA de células previamente transfectadas con las dos variantes de VPH18, la presencia de E6 se comprobó mediante una PCR, dando

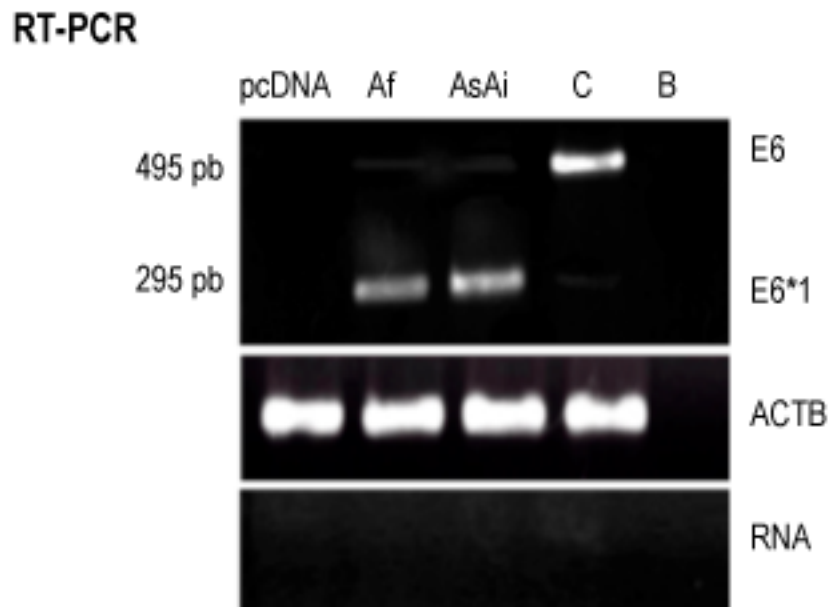
como resultado de la amplificación un fragmento de aproximadamente 495 pb, mostrado en la figura 16.



**Figura 16-** Amplificación de las variantes africana y asiático-amerindia del oncogen E6 del VPH 18 en la línea celular C33A. *pcDNA*; Células transfectadas con el vector solo, *Af*; Células transfectadas con E6 de la variante africana del VPH 18, *AsAi*; Células transfectadas con E6 de la variante asiático-amerindia del VPH 18, *C*; DNA de la línea celular HeLa usado como control, *B*; Blanco.

#### **Expresión de E6 de las variantes Af y AsAi de VPH 18 en la línea celular C33A.**

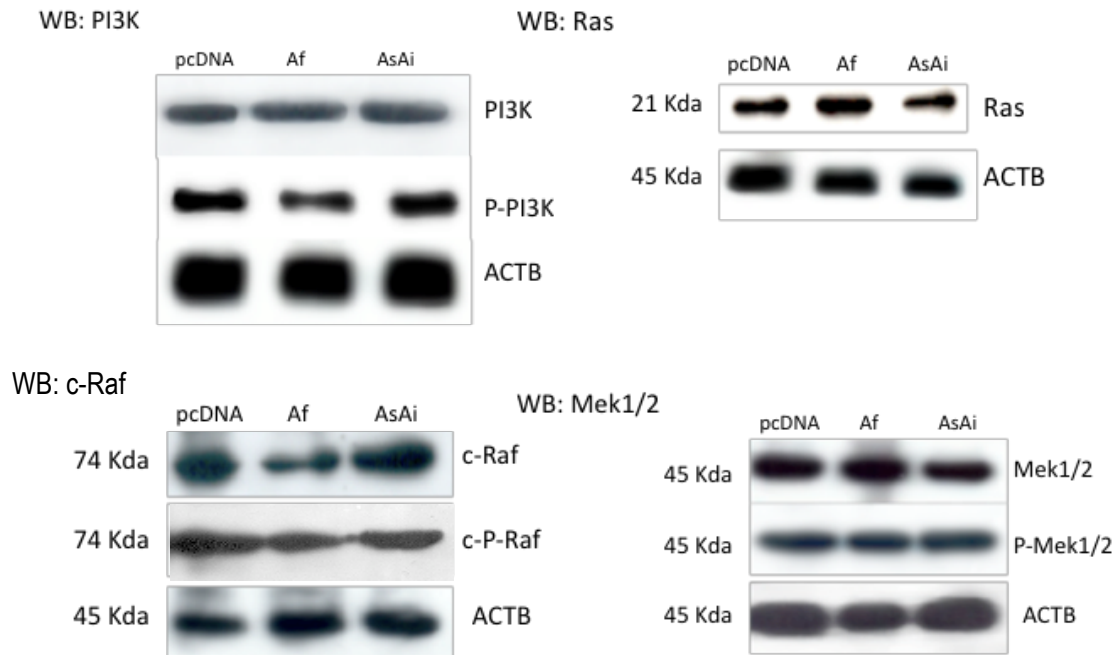
Mediante RT-PCR se verificó el patrón de expresión de E6 de las variantes Af y AsAi de VPH18 en esta línea celular. La figura 17 muestra que a diferencia del patrón de expresión encontrado en la línea celular MCF7, las células de C33A trasfectadas con E6 de las variantes Af y AsAi mostraron un patrón semejante. Ambas variantes presentaron los dos transcritos, que corresponden a 495 nt para el transcrito de E6 completo y de 295 nt para el transcrito E6\*1 y en ambas el transcrito E6\*1 fue favorecido y los niveles encontrados de E6 completo fueron mínimos. En la misma figura 13 se muestra la comparación de los productos del RT-PCR del gen de actina (ACTB) mostrando el equivalente de RNA usado en cada ensayo y como control de contaminación de DNA en la extracción del RNA, se incluyeron en las reacciones las muestras de RNA, de las cuales no se obtuvo ninguna amplificación.



**Figura 17.-** Análisis del patrón de expresión de las variantes del oncogen E6 del VPH 18 en la línea celular MCF7 transfectada. *pcDNA*; células transfectadas con el vector vacío, *Af*; células transfectadas con la variante africana, *AsAi*; células transfectadas con la variante asiático-amerindia, HeLa; el DNA de HeLa se utilizó como control, *B*. Blanco.

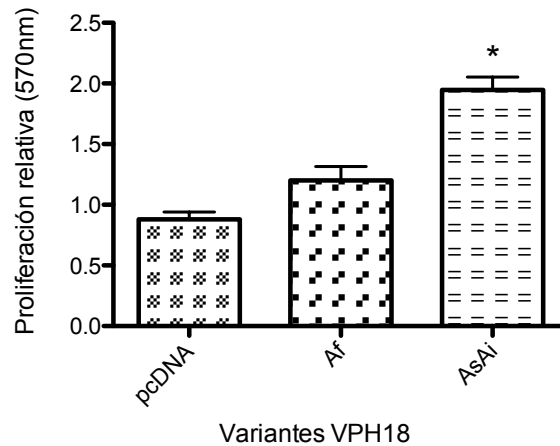
**Análisis de los niveles de PI3K, Ras, c-Raf, Mek1/2 y Rap1 en presencia del oncogen E6 de las variantes africana y asiático-amerindia del VPH 18 en la línea celular C33A.**

Se determinó si la condición E6/E6\*1 en la línea celular C33A, afectaría a los elementos antes estudiados en la línea celular MCF7. Los Western blot contra PI3K, Ras, c-Raf y Mek1/2 no mostraron diferencias en células trasfectadas con las variantes *Af* y *AsAi*. En la figura 18 se muestra un Western blot representativo de tres ensayos independientes.



**Figura 18-** Western blot contra PI3K, Ras, c-Raf y Mek1/2 de las tres en la línea celular C33A previamente transfectadas con E6 de las variantes africana, europea y asiático-amerindia.

De la misma forma que en la línea celular MCF7, se realizaron ensayos de cristal violeta para determinar los efectos de las proteínas E6 de las variantes de VPH18 sobre la proliferación celular, en la siguiente figura se muestra el promedio de tres curvas a las 72 h. Estos resultados indican que aunque no se encontraron diferencias en los elementos analizados de la vía de señalización de las MAPK dentro de las variantes, sí encontramos diferencias significativas a nivel de la proliferación en la variante asiático-amerindia con respecto al control pcDNA.



**Figura 19.-** Proliferación de la línea celular C33A transfectada con E6 de las variantes de VPH18 a las 72 h. La gráfica representa el promedio +/- la desviación estándar de tres ensayos independientes, en la que el asterisco (\*) indica la diferencia significativa relacionada la control pcDNA con un intervalo de confianza del 95 % ( $\alpha = 0.05$ ).

## 8.- DISCUSIÓN:

La infección del VPH 18 se ha asociado a un peor pronóstico de las lesiones cervicales en aquellas pacientes que desarrollan cáncer cervicouterino. En México se han reportado tres variantes para el VPH 18; la variante africana (Af), la variante europea (E) y la variante asiático-amerindia (AsAi). Se ha encontrado que estas variaciones genómicas intratipo presentan actividad biológica diferencial en la degradación de la proteína hDLg (*Human disc large*) repercutiendo en los niveles de fosforilación de PTEN y Akt. Además E6 puede aumentar la fosforilación de PI3K, dando como resultado un aumento en la proliferación celular [56]. Los efectos observados entre las variantes europea y asiático-amerindia fueron semejantes y marcados en comparación con la variante africana.

Con el fin de entender el efecto que juega el gen E6 del virus del papiloma humano tipo 18 en la carcinogénesis cervical, en este trabajo nos propusimos conocer los efectos que pudiera estar ejerciendo E6 de las variantes africana y asiático-amerindia

de VPH18 sobre algunos elementos involucrados en la señalización de las MAPK, río arriba de las ERKs1/2.

Dado que resulta difícil encontrar una línea celular de cáncer de cervix sin que tenga presente el genoma del VPH, se eligieron las líneas celulares C33A y MCF7, además de saber si la presencia de p53 (MCF7) pudiera tener algún efecto en la señalización de las MAPK. La transfección de E6 mostró diferencias importantes en su patrón de expresión entre las líneas celulares y entre las variantes de VPH18 en una misma línea celular cuando se analizó por RT-PCR. En la línea celular C33A (figura 13) se encontró que en las dos variantes del VPH18 predomina el transcrito E6\*1 sobre el transcrito E6 completo, contrariamente a lo encontrado en la línea MCF7, en donde si bien se encontraron los dos transcritos en las células transfectadas, la variante AsAi mostró preferencialmente el transcrito E6 completo sobre el E6\*1, mientras que en la variante africana se encontró mayormente en transcrito E6\*1 y los niveles de E6 completo fueron mínimos (figura 5). Ya se había mencionado que E6 de VPH18 es traducido de un mRNA bicistrónico E6E7 y generalmente presenta procesamiento alternativo originando el mRNA E6\*1 (en el caso del VPH18) que codifica para una proteína truncada con la misma región N-ter de la proteína E6 completa; los mecanismos por los cuales se lleva a cabo dicho procesamiento son desconocidos, pero está claro que el ambiente celular juega un papel importante en este procesamiento. Esto resulta ser muy importante ya que los efectos observados en los Western blots realizados en la línea celular MCF7 muestran diferencias más marcadas en las células en donde se presenta una mayor expresión de la proteína E6 completa; esto es, los efectos encontrados en las células transfectadas por E6 de la variante africana, aunque si bien presentó cierto efecto sobre el nivel de los elementos estudiados comparando con el control pcDNA, fue menos marcado que en las células transfectadas por E6 de la variante asiático-amerindia.

En el 2005 De la Cruz y cols reportaron un patrón de expresión para E6 en clones de células MCF7 semejante al encontrado, en el cual se menciona que los cambios nucleotídicos de E6 de las variantes de VPH18 juegan un papel en el patrón de



expresión de E6, el ORF de E6 de la variante Af presenta cambios en las posiciones 251, 266, 287, 317, 342, 374, 485, 491, 548 y 549 originando cambios en los residuos His342Tyr y Asn491Lys con respecto al aislado AsAi (cuadro 2) [1].

En un trabajo previo [56] reportaron el efecto de E6 de las variantes de VPH18 en la vía de PI3K/Akt y su implicación en la proliferación celular. Los autores encontraron que E6 de las variantes de este tipo viral modulan diferencialmente la degradación de hDlg repercutiendo en los niveles de activación de la fosfatasa PTEN y Akt. También encontraron que E6 diferencialmente aumenta la fosforilación de la proteína PI3K, correlacionando estos efectos con la activación de las ERK1/2 y la proliferación celular. En todos los casos reportan un mayor efecto de E6 de la variante asiático-amerindia con respecto a las variantes europea y africana. Un efecto similar fue confirmado en este trabajo en el que la activación de PI3K aumenta en presencia de E6, principalmente de la variante AsAi de VPH18 (figura 6).

Aunque se encontró que E6 es capaz de fomentar la fosforilación de las ERKs, se desconocía si habían otros elementos involucrados en este efecto, por lo que nos interesamos en determinar el efecto de E6 sobre los elementos río arriba de las ERK1/2.

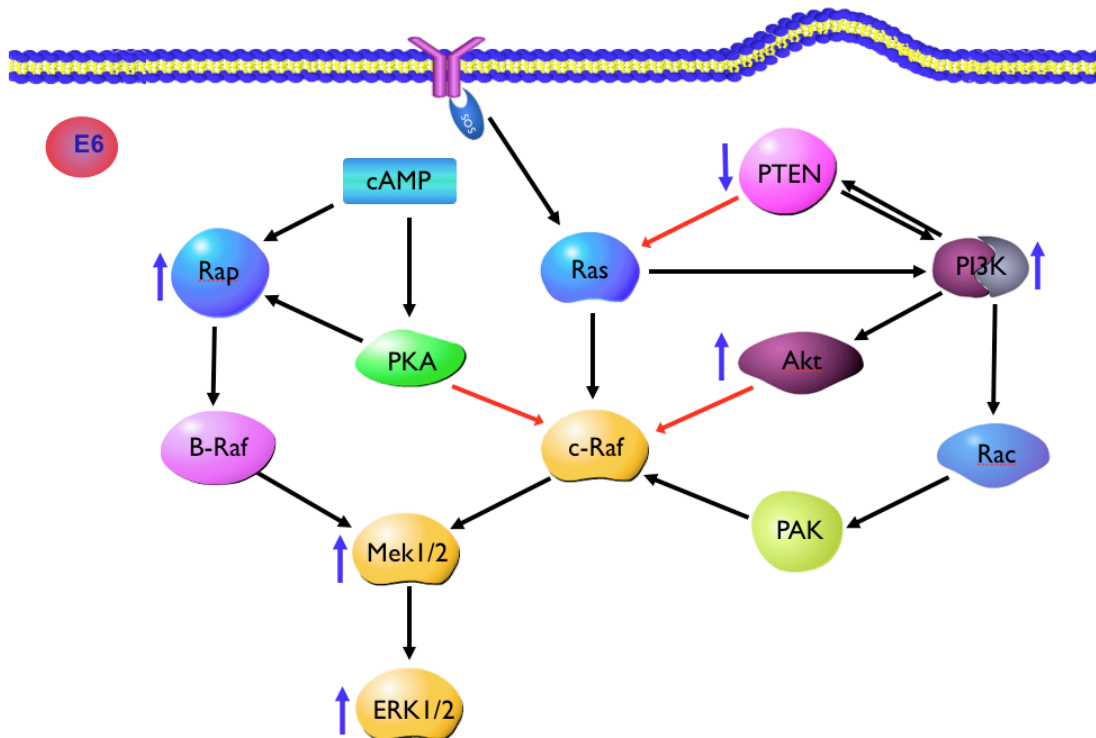
La MAPK comprende una vía clave en varias cascadas de señalización celular. Se han reportado varias proteínas que convergen en esta vía. Una de estas proteínas involucradas en la activación de la cascada de fosforilación de las MAPK es Ras, un controlador crítico de esta vía. Es bien conocido que este oncogen se encuentra frecuentemente mutado en varios tipos de tumores. Se ha reportado que mutaciones en estos genes coexisten con VPH-AR en el cáncer cervicouterino y se asocian a una rápida progresión de las lesiones inducidas por el VPH en el cáncer cervical [67]. De este modo, nos interesamos en determinar si E6 de las diferentes variantes de VPH18 podría tener un efecto sobre esta proteína. No encontramos diferencias entre las variantes africana y asiático-amerindia en los niveles de la proteína Ras en las dos líneas celulares estudiadas (figuras 7 y 14), pero nuestro grupo de trabajo ha

reportado que la variante AsAi de VPH18 contribuye a la activación de las ERK1/2, aunque el mecanismo de esta activación se desconoce, por lo que es posible que dicha activación sea por medio de otros elementos involucrados en esta cascada de señalización.

Al analizar a c-Raf y Mek1/2, nosotros encontramos que E6 de la variante AsAi, al menos en la línea celular MCF7, aumenta la fosforilación de Mek1/2, aunque los resultados muestran que no es por medio de la vía de la cinasa c-Raf (figura 8), sugiriendo que este aumento de fosforilación es mediado por una vía alterna. Nosotros proponemos un posible modelo de esta vía alterna, en donde se ve involucrada la isoforma B-Raf, la cual es blanco directo de la proteína Rap1 (figura 16), dado que sus niveles se encontraron aumentados en presencia de E6 de VPH18 y además no encontramos un aumento en la fosforilación de las proteínas Ras y c-Raf, las cuales se encuentran río arriba (figura 10).

En un estudio realizado por el grupo de Chakrabarti con una variante de E6 (Leu83Val) de VPH 16 en células HaCat se muestra un aumento en la señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). En el mismo trabajo se menciona que esta variante de E6 coopera en la transformación con la señalización desregulada de Notch1 [48]. Por lo que además de la vía de B-Raf, otra posibilidad del aumento en la señalización de las MAPK puede ocurrir a través de la vía de Notch1, de ahí que sería interesante analizar el papel de este receptor en la carcinogénesis cervical inducida por la oncoproteína E6.

El oncogen p53 juega un papel importante en esta última posibilidad, ya que es capaz de regular la transcripción del receptor Notch-1, y es otra de las razones por las que se eligieron las líneas celulares C33A y MCF7.



**Figura 20.-** Un posible modelo en donde se muestra la interacción de la oncoproteína E6 de VPH 18 y su efecto sobre proteínas involucradas en la señalización de la vía de PI3K/Akt y la señalización de las MAPK.

Para que E6 aumente la fosforilación de Mek1/2 debe de ser indirectamente; es decir, para que la Mek1/2 sea activada debe de ser fosforilada y E6 no es una cinasa, por lo que su efecto sobre Mek1/2 debe ser resultado de algún elemento que se encuentre regulando esta activación. Rap1 puede llevar a cabo la activación de Mek1/2 mediante B-Raf, pero Rap1 es una GTPasa y hasta la fecha no se conoce que E6 tenga actividad de GEF, pero sí se conoce que E6 de VPH-AR es capaz de interactuar y promover la degradación de una proteína activadora de GTPasa de Rap1 (GAP) llamada E6TP1. Se ha observado que mutaciones en E6 que inhiben su unión a E6TP1 reducen su degradación dando como resultado un menor potencial de immortalización de E6 [68]. Por lo que es un buen candidato para ser el elemento sobre el cual E6 de VPH18 en la línea celular MCF7 pueda promover la activación de la señalización de las ERK1/2.

Por otro lado, la señalización de PKA juega un papel importante en la activación de Rap1. Se ha reportado que PKA la puede fosforilar en el residuo Ser179 aumentando así el intercambio de GDP/GTP de Rap1. Otro papel de PKA es fosforilar a E6 de los VPH-AR (hacia el extremo C-ter) estabilizando a la oncoproteína, aunque esto sólo se ha observado en la unión con p53, pero E6 se une a p53 por medio de la E6-AP por lo que podría estar no sólo afectada la estabilización con p53, sino a todas aquellas proteínas que interaccionan con E6 por medio de esta forma.

Ahora bien, ya se había mencionado que E6 completo puede interaccionar con muchas proteínas de varias formas. Pero cuando E6 de VPH18 sufre procesamiento alternativo, general a la isoforma corta E6\*1, la cual pierde los motivos de unión a los dominios PDZ y los dedos de zinc, por lo que las formas de interactuar con otras proteínas se reduce (figura 21). Es por ello que en aquellas células que solo presentarán esta isoforma corta de E6 (células C33A), no se esperaba que tuviera efectos marcados en la activación de los elementos estudiados (figura 18). Pero sorprendentemente sí encontramos diferencias en la proliferación entre las variantes con respecto al control (figura 19). Dado estos resultados nosotros podemos especular que las diferencias en la proliferación podrían estar mediadas por vías alternas e independientes a la vía de señalización de las MAPKs.

Los resultados obtenidos en la línea celular MCF7 sugieren que la variabilidad intratipo de los VPH puede estar relacionada a su potencial oncológico, además de que la vía de señalización de las MAPK presenta un papel clave en la transformación de las células infectadas con el virus del papiloma humano de alto riesgo, proponiendo que la oncoproteína E6 podría cooperar con la señalización de las MAPK en esta transformación y podría explicar las diferencias encontradas en la carcinogénesis cervical en mujeres infectadas con VPH-AR.

## **9.- CONCLUSIONES:**

Se corroboró que E6 presenta un procesamiento alternativo, en el cual se favorece la expresión de la forma completa de E6 en la variante AsAi, mientras que en la variante africana predomina la forma de E6\*1 en un pool de la línea celular MCF7.

Los mayores niveles de E6 completo a su vez se correlacionan con un efecto mayor en la proliferación y activación de Mek1/2.

Aunque se han encontrado mutaciones en la proteína Ras que coexisten con el VPH-AR en cáncer cervical y se asocian a una rápida progresión de las lesiones inducidas por el VPH, no se encontraron alteraciones en los niveles de esta proteína en presencia de E6 de las variantes AsAi y Af de VPH18 en células MCF7. Su expresión en lesiones cervicales podría estar afectada por otras proteínas virales como E7.

En el análisis de los elementos de la vía de las MAPK afectados por E6, se encontró un aumento en la fosforilación de la cinasa Mek1/2 por la variante AsAi de VPH18 y un aumento en los niveles de la proteína Rap1; pero no en la cinasa río arriba de ésta llamada c-Raf, lo que sugiere que la activación de Mek1/2 por E6 es mediada por activación de una vía alterna que involucra a la isoforma B-Raf, en la línea celular MCF7

El aumento de activación de la cinasa Mek1/2 por E6 de la variante AsAi del VPH18 se reflejó en un aumento en la proliferación en la línea MCF7.

En un pool de células C33A transfectadas con E6 de las variantes AsAi y Af de VPH18 no se encontraron diferencias en el patrón de expresión de E6, en ambas se favoreció el transcrito E6\*1 y estas células no mostraron efectos en PI3K, Ras, c-Raf y Mek1/2.

Aunque no se encontraron efectos en los elementos estudiados en la línea celular C33A, si se encontraron diferencias en la proliferación, sugiriendo que E6 de VPH18 puede afectar la proliferación celular de una forma independiente a la señalización de la vía de las MAPK.

## Bibliografía

1. De la Cruz-Hernandez, E., et al., *Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 9): p. 2459-68.
2. Kumar, V., et al., *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 7th ed. 2005, Philadelphia: Elsevier Saunders. xv, 1525 p.
3. von Knebel Doeberitz, M., *New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections*. Eur J Cancer, 2002. **38**(17): p. 2229-42.
4. Ong, C.K., et al., *Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups*. J Virol, 1993. **67**(11): p. 6424-31.
5. Lizano, M., J. Berumen, and A. Garcia-Carranca, *HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants*. Arch Med Res, 2009. **40**(6): p. 428-34.
6. Motoyama, S., et al., *The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis*. Kobe J Med Sci, 2004. **50**(1-2): p. 9-19.
7. Narisawa-Saito, M. and T. Kiyono, *Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins*. Cancer Sci, 2007. **98**(10): p. 1505-11.
8. Bosch, F.X., et al., *Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(11): p. 796-802.
9. de Villiers, E.M., *Human Papillomavirus. Introduction*. Semin Cancer Biol, 1999. **9**(6): p. 377.
10. Lizano, M., et al., *Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(16): p. 1227-31.
11. McMurray, H.R., et al., *Biology of human papillomaviruses*. Int J Exp Pathol, 2001. **82**(1): p. 15-33.
12. Doorbar, J., et al., *Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network*. Nature, 1991. **352**(6338): p. 824-7.
13. Woodman, C.B., S.I. Collins, and L.S. Young, *The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(1): p. 11-22.
14. Sterlinko Grm, H., et al., *Inhibition of E6-induced degradation of its cellular substrates by novel blocking peptides*. J Mol Biol, 2004. **335**(4): p. 971-85.
15. Chakrabarti, O. and S. Krishna, *Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression*. J Biosci, 2003. **28**(3): p. 337-48.
16. Zhang, Y., et al., *Structures of a human papillomavirus (HPV) E6 polypeptide bound to MAGUK proteins: mechanisms of targeting tumor suppressors by a high-risk HPV oncoprotein*. J Virol, 2007. **81**(7): p. 3618-26.
17. Fan, X. and J.J. Chen, *Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2004. **14**(3): p. 183-202.
18. Mantovani, F. and L. Banks, *The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression*. Oncogene, 2001. **20**(54): p. 7874-87.
19. Tungteakkhun, S.S. and P.J. Duerksen-Hughes, *Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein*. Arch Virol, 2008. **153**(3): p. 397-408.
20. Tungteakkhun, S.S., et al., *The interaction between human papillomavirus type 16 and FADD is mediated by a novel E6 binding domain*. J Virol, 2008. **82**(19): p. 9600-14.
21. Baleja, J.D., et al., *Identification of inhibitors to papillomavirus type 16 E6 protein based on three-dimensional structures of interacting proteins*. Antiviral Res, 2006. **72**(1): p. 49-59.
22. Elston, R.C., S. Naphine, and J. Doorbar, *The identification of a conserved binding motif within human papillomavirus type 16 E6 binding peptides, E6AP and E6BP*. J Gen Virol, 1998. **79** ( Pt 2): p. 371-4.
23. Cooper, B., N. Brimer, and S.B. Vande Pol, *Human papillomavirus E6 regulates the cytoskeleton dynamics of keratinocytes through targeted degradation of p53*. J Virol, 2007. **81**(22): p. 12675-9.
24. Cooper, B., et al., *Requirement of E6AP and the features of human papillomavirus E6 necessary to support degradation of p53*. Virology, 2003. **306**(1): p. 87-99.

25. Liu, Y., et al., *Design and characterization of helical peptides that inhibit the E6 protein of papillomavirus*. *Biochemistry*, 2004. **43**(23): p. 7421-31.
26. Grm, H.S. and L. Banks, *Degradation of hDlg and MAGIs by human papillomavirus E6 is E6-AP-independent*. *J Gen Virol*, 2004. **85**(Pt 10): p. 2815-9.
27. Lu, Z., et al., *Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferences with insulin signaling pathway by binding to tuberlin*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(34): p. 35664-70.
28. Lechner, M.S. and L.A. Laimins, *Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins*. *J Virol*, 1994. **68**(7): p. 4262-73.
29. Patel, D., et al., *The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300*. *Embo J*, 1999. **18**(18): p. 5061-72.
30. Pan, H. and A.E. Griep, *Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development*. *Genes Dev*, 1995. **9**(17): p. 2157-69.
31. Kolch, W., *Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions*. *Biochem J*, 2000. **351 Pt 2**: p. 289-305.
32. Thomas, M. and L. Banks, *Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types*. *J Gen Virol*, 1999. **80 ( Pt 6)**: p. 1513-7.
33. Soucek, L., et al., *Modelling Myc inhibition as a cancer therapy*. *Nature*, 2008. **455**(7213): p. 679-83.
34. Kinoshita, T., et al., *Transactivation of prothymosin alpha and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein*. *Virology*, 1997. **232**(1): p. 53-61.
35. Massimi, P., et al., *HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation*. *Oncogene*, 2004. **23**(49): p. 8033-9.
36. Zimmermann, H., et al., *The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300*. *J Virol*, 1999. **73**(8): p. 6209-19.
37. Snowden, A.W. and N.D. Perkins, *Cell cycle regulation of the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein*. *Biochem Pharmacol*, 1998. **55**(12): p. 1947-54.
38. Vo, N. and R.H. Goodman, *CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(17): p. 13505-8.
39. Degenhardt, Y.Y. and S.J. Silverstein, *Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins*. *J Virol*, 2001. **75**(1): p. 151-60.
40. Filippova, M., et al., *The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity*. *J Virol*, 2007. **81**(8): p. 4116-29.
41. Thomas, M., D. Pim, and L. Banks, *The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV*. *Oncogene*, 1999. **18**(53): p. 7690-700.
42. Guccione, E., D. Pim, and L. Banks, *HPV-18 E6\*1 modulates HPV-18 full-length E6 functions in a cell cycle dependent manner*. *Int J Cancer*, 2004. **110**(6): p. 928-33.
43. Pim, D., P. Massimi, and L. Banks, *Alternatively spliced HPV-18 E6\* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth*. *Oncogene*, 1997. **15**(3): p. 257-64.
44. Shally, M., et al., *The E6 variant proteins E6I-E6IV of human papillomavirus 16: expression in cell free systems and bacteria and study of their interaction with p53*. *Virus Res*, 1996. **42**(1-2): p. 81-96.
45. Sedman, S.A., et al., *The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture*. *J Virol*, 1991. **65**(9): p. 4860-6.
46. Weijzen, S., et al., *HPV16 E6 and E7 oncoproteins regulate Notch-1 expression and cooperate to induce transformation*. *J Cell Physiol*, 2003. **194**(3): p. 356-62.
47. Dotto, G.P., *Notch tumor suppressor function*. *Oncogene*, 2008. **27**(38): p. 5115-23.
48. Chakrabarti, O., et al., *Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras*. *J Virol*, 2004. **78**(11): p. 5934-45.



49. Rangarajan, A., et al., *Activated Notch1 signaling cooperates with papillomavirus oncogenes in transformation and generates resistance to apoptosis on matrix withdrawal through PKB/Akt.* Virology, 2001. **286**(1): p. 23-30.
50. Goldstein, B.J., et al., *Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway.* Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(7-8): p. 1021-31.
51. Eralp, Y., et al., *MAPK overexpression is associated with anthracycline resistance and increased risk for recurrence in patients with triple-negative breast cancer.* Ann Oncol, 2008. **19**(4): p. 669-74.
52. Raman, M., W. Chen, and M.H. Cobb, *Differential regulation and properties of MAPKs.* Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3100-12.
53. Shaul, Y.D. and R. Seger, *The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1213-26.
54. Wang, R.A., et al., *PAK1 hyperactivation is sufficient for mammary gland tumor formation.* Oncogene, 2006. **25**(20): p. 2931-6.
55. Vergarajauregui, S., A. San Miguel, and R. Puertollano, *Activation of p38 mitogen-activated protein kinase promotes epidermal growth factor receptor internalization.* Traffic, 2006. **7**(6): p. 686-98.
56. Contreras-Paredes, A., et al., *E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway.* Virology, 2009. **383**(1): p. 78-85.
57. Fornaro, M., et al., *Fibronectin protects prostate cancer cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis via the AKT/survivin pathway.* J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50402-11.
58. Basso, A.D., et al., *Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function.* J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39858-66.
59. Pommery, N. and J.P. Henichart, *Involvement of PI3K/Akt pathway in prostate cancer--potential strategies for developing targeted therapies.* Mini Rev Med Chem, 2005. **5**(12): p. 1125-32.
60. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR.* Genes Dev, 2004. **18**(16): p. 1926-45.
61. Hay, N., *The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer.* Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 179-83.
62. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts.* Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2905-27.
63. Proud, C.G., *Regulation of mammalian translation factors by nutrients.* Eur J Biochem, 2002. **269**(22): p. 5338-49.
64. Waite, K.A. and C. Eng, *Protean PTEN: form and function.* Am J Hum Genet, 2002. **70**(4): p. 829-44.
65. Caron, E., *Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges.* J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 3): p. 435-40.
66. Stork, P.J., *Does Rap1 deserve a bad Rap?* Trends Biochem Sci, 2003. **28**(5): p. 267-75.
67. Cordova-Alarcon, E., et al., *Effects of HRAS oncogene on cell cycle progression in a cervical cancer-derived cell line.* Arch Med Res, 2005. **36**(4): p. 311-6.
68. Gao, Q., et al., *Human papillomavirus type 16 E6-induced degradation of E6TP1 correlates with its ability to immortalize human mammary epithelial cells.* J Virol, 2001. **75**(9): p. 4459-66.
69. Wilson, V.G., et al., *Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features.* Virus Genes, 2002. **24**(3): p. 275-90.
70. Howie, H.L., R.A. Katzenellenbogen, and D.A. Galloway, *Papillomavirus E6 proteins.* Virology, 2009. **384**(2): p. 324-34.
71. Ronco, L.V., et al., *Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity.* Genes Dev, 1998. **12**(13): p. 2061-72.
72. Kukimoto, I., et al., *Human papillomavirus oncoprotein E6 binds to the C-terminal region of human minichromosome maintenance 7 protein.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **249**(1): p. 258-62.
73. Jing, M., et al., *Degradation of tyrosine phosphatase PTPN3 (PTPH1) by association with oncogenic human papillomavirus E6 proteins.* J Virol, 2007. **81**(5): p. 2231-9.

74. Srivenugopal, K.S. and F. Ali-Osman, *The DNA repair protein, O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is a proteolytic target for the E6 human papillomavirus oncoprotein*. *Oncogene*, 2002. **21**(38): p. 5940-5.
75. Gardiol, D., et al., *Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation*. *Oncogene*, 1999. **18**(40): p. 5487-96.
76. Lee, S.S., et al., *Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins*. *J Virol*, 2000. **74**(20): p. 9680-93.
77. Sekaric, P., J.J. Cherry, and E.J. Androphy, *Binding of human papillomavirus type 16 E6 to E6AP is not required for activation of hTERT*. *J Virol*, 2008. **82**(1): p. 71-6.
78. Degenhardt, Y.Y. and S. Silverstein, *Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the e6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation*. *J Virol*, 2001. **75**(23): p. 11791-802.
79. Iftner, T., et al., *Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1*. *Embo J*, 2002. **21**(17): p. 4741-8.
80. Filippova, M., et al., *Complexes of human papillomavirus type 16 E6 proteins form pseudo-death-inducing signaling complex structures during tumor necrosis factor-mediated apoptosis*. *J Virol*, 2009. **83**(1): p. 210-27.
81. Borbely, A.A., et al., *Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression*. *J Gen Virol*, 2006. **87**(Pt 2): p. 287-94.
82. Hasan, U.A., et al., *TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16*. *J Immunol*, 2007. **178**(5): p. 3186-97.
83. Du, M., et al., *Interaction of oncogenic papillomavirus E6 proteins with fibulin-1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **296**(4): p. 962-9.
84. Filippova, M., L. Parkhurst, and P.J. Duerksen-Hughes, *The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(24): p. 25729-44.
85. Storrs, C.H. and S.J. Silverstein, *PATJ, a tight junction-associated PDZ protein, is a novel degradation target of high-risk human papillomavirus E6 and the alternatively spliced isoform 18 E6*. *J Virol*, 2007. **81**(8): p. 4080-90.
86. Nakagawa, S. and J.M. Huibregtse, *Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(21): p. 8244-53.
87. Hu, Y., et al., *HPV16 E6-induced and E6AP-dependent inhibition of the transcriptional coactivator hADA3 in human cervical carcinoma cells*. *Cancer Invest*, 2009. **27**(3): p. 298-306.
88. Vande Pol, S.B., M.C. Brown, and C.E. Turner, *Association of Bovine Papillomavirus Type 1 E6 oncoprotein with the focal adhesion protein paxillin through a conserved protein interaction motif*. *Oncogene*, 1998. **16**(1): p. 43-52.
89. Imai, T., et al., *ERC-55, a binding protein for the papilloma virus E6 oncoprotein, specifically interacts with vitamin D receptor among nuclear receptors*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **233**(3): p. 765-9.
90. Kim, S.W. and J.S. Yang, *Human papillomavirus type 16 E5 protein as a therapeutic target*. *Yonsei Med J*, 2006. **47**(1): p. 1-14.