



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMEDICAS

Facultad de Medicina

**Expresión de las proteínas p16^{INK4A} y p14^{ARF} en líneas celulares de cáncer
cervicouterino. Regulación de la expresión de p14^{ARF} por las
oncoproteínas E6 y E7 del Virus del Papiloma Humano tipo 18**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA: M. en C. SALVADOR VÁZQUEZ VEGA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. LUIS SOTERO BENÍTEZ BRIBIESCA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COMITÉ TUTORIAL

DR. LUIS S. BENÍTEZ BRIBIESCA

DR. ALEJANDRO M. GARCÍA CARRANCÁ

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Patología Molecular y Celular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología del Centro Médico Siglo XXI-IMSS y en el Laboratorio de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología. Con apoyo del Fondo de Financiamiento para la **Investigación-IMSS y CONACYT SALUD 2003-CO1-023** y parcialmente financiado por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT 127722.**



AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y a la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de doctorado otorgada durante el desarrollo de este trabajo, con número de referencia 81714.

A la Coordinación Delegacional de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social, Delegación Norte del DF por todo su apoyo.

A la Dirección del Hospital de Gineco-Pediatría 3A por todas las facilidades otorgadas

Al Doctor Luis S. Benítez Bribiesca por permitirme aprender a su lado en el terreno académico y personal. A los Doctores Alejandro García Carrancá, Luis Herrera Montalvo y Marcela Lizano Soberón por su apoyo y respeto.

A las Doctoras Patricia Pérez Sánchez, Elena A. Vilchis Guizar, Victoria Pineda Aquino y al Doctor Víctor M. Aguilar de la Delegación Norte del IMSS.

A los Doctores Emilio Castellanos Juárez (UIMEO) y Rafael S. Andrade Cruz (Hospital de Gineco-Pediatría 3A) por su valioso apoyo.

Con respeto y agradecimiento para Adriana Contreras Paredes, Rocío Susana Méndez Martínez, Blanca Elsi Cegueda Benítez y Lilia Patricia Sánchez Suárez.

A mis amigos; Marta, Jaqueline, Pedro, Graciela, Heriberto, Rubicelia, Rafael y Anita.

A mí querida familia: Juana, Salvador, Irma, Víctor y María Eugenia

José Manuel, Paulina, Daniela Adriana, Edna Mariana, Pablo y Cintia Elizabeth.

Lucio, Juan Carlos, Rafael, José Alejandro, Mario y Alberto.

En recuerdo de Natalia, Dolores, Antonia, Isabel, Paula, Mauricio, Carlos Rafael y José Adrián.

RESUMEN

La prueba de Papanicolaou es responsable de una reducción significativa de la morbilidad y la mortalidad por cáncer cervicouterino, aunque su sensibilidad y especificidad son relativamente bajas. Con la finalidad de incrementar la precisión del diagnóstico de cáncer cervicouterino por medio de estudios citológicos e histopatológicos, diversos marcadores complementarios han sido evaluados y algunos de ellos ya han sido incorporados a la clínica. p16^{INK4A} es considerado el marcador inmunocitoquímico de mayor certeza para el diagnóstico de cáncer cervicouterino. Por otro lado, con base en nuestra propia investigación y algunos reportes experimentales, nosotros consideramos que p14^{ARF} puede ser un marcador complementario más útil.

En la parte inicial de este trabajo realizamos un análisis sistemático por inmunocitoquímica, inmunofluorescencia y Western blot de 20 marcadores atribuidos a cáncer cervicouterino. La mayoría de los marcadores no discriminaron entre las líneas celulares de cáncer infectadas con el virus del papiloma humano y otras líneas celulares, solo p16^{INK4A} y p14^{ARF} mostraron ser altamente específicos para las líneas celulares de cáncer cervicouterino. Nuestros hallazgos sugieren que p16^{INK4A} y p14^{ARF} son dos marcadores que, evaluados conjuntamente con los estudios citológicos aumentan la precisión del diagnóstico de las lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas del cérvix uterino.

Debido a la importancia del p14^{ARF}, decidimos estudiar experimentalmente algunos de los mecanismos de control de su expresión y para ello tomamos como modelo la transfección con los oncogenes E6 y E7 provenientes del virus del papiloma humano tipo 18, el cual tiene tres variantes intra-tipo: Asiático-Amerindia, Europea y Africana. Cada una de ellas presenta diferencias significativas en la secuencia del gen E6 y por “alternative splicing” (corte y ensamble alternativo) producen ácidos ribonucleicos mensajeros para las proteínas E6 completa y trunca (E6*). El gen E7 muestra mínimas diferencias entre variantes.

Se sabe que E6 y E7 actúan como reguladores negativos de las proteínas supresoras de tumor p53 y Rb e indirectamente regulan la expresión de p14^{ARF}, por ello era probable que la expresión de p14^{ARF} presentara diferencias entre variantes, posibilidad que no había sido estudiada suficientemente. Con la finalidad de analizar la participación de E6 y E7 en la regulación de la expresión de p14^{ARF}, células de la línea MCF-7, derivadas de cáncer de mama y que carecen de secuencias de virus del papiloma humano fueron transfectadas con variantes de E6, E6* y E7. Se determinó por RT-PCR el patrón transcripcional de estos genes, confirmando así la transfección y co-transfección de estas células. En las células transfectadas con las variantes de E6 y E6* se observaron los transcritos E6 y E6* en diferentes proporciones. Con la variante Asiático-Amerindia la proporción fue E6>E6*, mientras que con Europea, Africana y E6* la proporción fue E6*>E6. La expresión de p14^{ARF} y p53 fueron evaluadas por inmunocitoquímica y Western blot y correlacionadas con el patrón transcripcional de los oncogenes virales.

El patrón E6>E6* se asoció con baja expresión de p53 y niveles altos de p14^{ARF}. El patrón E6*>E6 se asoció con niveles altos de p53 y expresión baja de p14^{ARF}. La expresión de p14^{ARF} después de la transfección con E7 fue alta, sin mostrar diferencias entre variantes. En conclusión, la relación E6/E6* difiere con cada variante y afecta la expresión de p14^{ARF}. Estos hallazgos podrían explicar algunas de las diferencias en carcinogenicidad de las variantes del virus del papiloma humano tipo 18.

ABSTRACT

Pap test is responsible for a significant reduction in morbidity and mortality attributed to cervical cancer, but its sensitivity and specificity is relatively low. In order to increase the accuracy of cytological examination, several complementary markers have been suggested and some of them have already been incorporated into the clinical practice. p16^{INK4A} is now considered the immunocytochemical marker of choice for cervical cancer. Based on previous reports and from our own results we propose that p14^{ARF} could be a complementary marker to improve the accuracy of cytological studies. In the first part of our experimental work, we conducted a systematic analysis of twenty markers attributed to cervical cancer by immunocytochemistry, immunofluorescence and Western blot analysis. Most of these markers did not distinguish between human papilloma virus infected cancer cell lines and other cancer cell lines. Only p16^{INK4A} and p14^{ARF} showed to be highly specific for cervical cancer, we found that p16^{INK4A} and p14^{ARF} are complementary markers and that they should be evaluated concurrently with the cytological assessment to increase the accuracy of diagnosis of cervical cancer. In the second part of our work we performed transfection with oncogenes E6 and E7 of human papilloma virus 18 as an experimental model. This virus has three variants: Asian-Amerindian, European and African. Each variant presents major differences in the E6 gene sequence. This gene, by "alternative splicing" generate two types of messenger ribonucleic acids codifying for complete and truncated E6 proteins (E6 and E6*, respectively). The E7 gene shows only minor differences between intra-type variants. Both oncoproteins, E6 and E7, act as negative regulators of tumor suppressor protein p53 and Rb and indirectly regulate the expression of p14^{ARF}, so it is likely that the expression of p14^{ARF} manifests differences between variants even when this possibility has not been sufficiently explored. In order to analyze the role of E6 and E7 in the regulation of p14^{ARF} expression, MCF-7 breast cancer-derived cells, totally devoid of HPV sequences, were transfected with E6, E6* and E7. The transcriptional pattern of

these genes was assessed by RT-PCR, so confirming the successful transfection of these cells with the genetic sequences. Both, E6 and E6* transcripts, albeit in different proportions were observed in cells transfected with anyone of the variants. With the Asian-Amerindian variant, the ratio was E6>E6*, whereas with the European, the African and with E6*, the ratio was E6*>E6. Expression of p53 and p14^{ARF} were assessed by Western blot and immunocytochemical methods, whose findings were correlated with the transcriptional pattern of viral oncogenes. The pattern E6>E6* was consistently associated with a lowered expression of p53 and high levels of p14^{ARF}. The pattern E6*>E6 was associated with high levels of p53 and a p14^{ARF} lowered expression. After transfection with E7, p14^{ARF} expression was high. In this respect, no differences between variants were observed. It can be concluded that expression of both, p14^{ARF} and p53, is affected by the E6/E6* ratio, consequently, it differs with each variant. These findings may explain some of the differences of pathogenicity observed among variants of human papillomavirus type 18.

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1. Procesos biológicos y proteínas celulares reguladas por la proteína E6 de los VPH-AR (Modificado de Tungteakkhun, 2008).	22
Figura 2. Representación esquemática de la secuencia de E6 del VPH-16 (Modificado de Heer, 2011).	24
Figura 3. Vías que son blanco de la proteína E7 de los VPH-AR (Modificado de Ganguly, 2009).	25
Figura 4. Ramas filogenéticas o variantes y algunos de los aislados de los tipos virales 16 y 18 (Tomado de Ong, 1993).	28
Figura 5. Mecanismos de transformación de las células epiteliales cervicales por el virus del papiloma humano de alto riesgo (Elaborado y modificado a partir de Kim, 2005 y zur Hausen, 2008).	35
Figura 6. Biomarcadores de neoplasia cervical alterados por E6 y E7 de VPH-AR (Modificado de Pinto, 2012).	40
Figura 7. Representación de invasión y metástasis (Tomado de Flores-Reséndiz, 2009).	41
Figura 8. Inmunocitoquímica de las proteínas supresoras de tumores en líneas celulares de cáncer humano.	49
Figura 9. Porcentaje de células positivas en núcleo (p16 ^{INK4A}) y nucléolo (p14 ^{ARF}) en líneas celulares de cáncer.	50
Figura 10. Inmunofluorescencia de doble tinción para p16 ^{INK4A} y p14 ^{ARF} .	51
Figura 11. Expresión de las proteínas supresoras de tumores en líneas celulares de cáncer humano analizados por Western blot.	52
Figura 12. Inmunodetección de p14 ^{ARF} y p16 ^{INK4A} en muestras citológicas e histológicas de CaCU invasor asociado a infección por VPH-16.	62
Figura 13. Patrón de transcripción de las variantes de E6 de VPH-18 transfectadas en células MCF-7.	72
Figura 14. Patrones de expresión de p53 y p14 ^{ARF} en células MCF-7 transfectadas con variantes E6 de VPH-18 por Western blot.	73
Figura 15. Inmunocitoquímica de E6, p53 y p14 ^{ARF} en células MCF-7 transfectadas con variantes de E6.	75
Figura 16. Patrones de transcripción por RT-PCR de E6, E6* y E7 posterior a la co-transfección con E7 (en células previamente transfectadas con las variantes de E6 y E6* del VPH-18).	77
Figura 17. Patrón de expresión de p14 ^{ARF} en las células co-transfectadas con E7 y previamente transfectadas con variantes de E6 del VPH-18 por Western blot	78

Tabla 1.	Comparación de las cuatro clasificaciones usadas para el informe del resultado de citología cervical (IARC, 2005).	14
Tabla 2.	Factores asociados con CaCU (Elaborado a partir de Burd, 2003 y Carter, 2011).	17
Tabla 3.	Genes virales de expresión temprana y tardía, proteínas que codifican, peso y función (Elaborado a partir de Zheng, 2006 y Maufort, 2010).	19
Tabla 4.	Biomarcadores evaluados y procesos celulares en los que participan.	40
Tabla 5.	Anticuerpos primarios utilizados en el estudio inmunocitoquímico en diferentes líneas celulares de cáncer.	45
Tabla 6.	Proteínas supresoras de tumor y proteínas virales.	50
Tabla 7.	Factor de transcripción E2F-1, proteínas de regulación del ciclo celular y de proliferación celular.	54
Tabla 8.	Metaloproteasas y Catepsinas.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Asiática-Americana
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
Af	Africana
Af-1 y 2	Africana- 1 y 2
Akt/PKB	Proteína quinasa serina/treonina que funciona como un regulador crítico de la supervivencia y proliferación celular, del inglés <i>AKT (also known as protein kinase B, PKB) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)</i> .
AR	Alto riesgo
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
As	Asiática
AsAi	Asiática-Amerindia
ASC-H	Células escamosas atípicas en las que no se puede descartar una lesión intraepitelial de alto grado, del inglés <i>Atypical squamous cells-cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion</i> .
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado, del inglés <i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i> .
ATPasa	Enzima que convierte el adenosín trifosfato en adenosín difosfato y un ión de fósforo libre
BCA	Ácido bisinconílico, del inglés Bisinchoninic acid
BR	Bajo riesgo
CaCU	Cáncer Cervicouterino
CIS	Carcinoma in situ
CMV	Promotor de Cito MegaloVirus
DAB	3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorado
DNasa	Endonucleasa que genera rupturas no específicas en el ADN para liberar di-, tri- y oligonucleótidos fosforilados con extremos terminales 5'-fosforilados y 3'-hidroxilados. Se utiliza principalmente en la degradación del ADN molde en las reacciones de transcripción y eliminación de contaminación de ADN genómico de muestras de ARN
E	Europea
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico, del inglés <i>Epidermal Growth Factor</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, del inglés Fluorescein isothiocyanate
GFP	Proteína Verde Fluorescente, del inglés Green Fluorescent Protein
hDlg	Proteína humana homóloga del supresor de tumores <i>Drosophila Dlg</i> , del inglés <i>human homologue of the Drosophila Dlg tumor suppressor protein</i>
HLA Clase I	Antígeno Leucocitario Humano Clase I, del inglés Human Leucocyte Antigen Class I
HRP	Peroxidasa de rábano picante, del inglés HorseRadish Peroxidase
ICQ	Inmunocitoquímica
IF	Inmunofluorescencia
IgG	Anticuerpo Inmunoglobulina G
IHQ	Inmunohistoquímica
LCR	Región Larga de Control, del inglés <i>Long Control Region</i>
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos, del inglés <i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MB	Membrana Basal
MEC	Matriz Extra Celular
MTHFR	Enzima metilentetrahidrofolato reductasa, del inglés Methylene tetrahydrofolate reductase enzyme
NA-1	Norteamericana-1
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical, grados I-III
nt	nucleótido
ORF	Marco de lectura abierto, del inglés Open Reading Frame
pb	Pares de bases
PBS	Solución Tampón de Fosfatos, del inglés Phosphate Buffered Saline
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas, del inglés Platelet-Derived Growth Factor
pH	Medida de la actividad del ión hidrógeno
PI3K	Proteína fosfatidilinositol 3-quinasa, del inglés <i>Phosphatidylinositol 3-kinases protein</i>
PTEN	Proteína homólogo de fosfatasa y tensina, del inglés <i>Phosphatase and tensin homolog protein</i>
RFP	Proteína Rojo Fluorescente, del inglés Red Fluorescent Protein
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral - alfa, del inglés <i>Tumor Necrosis Factor - alpha</i>
VPH	Virus del papiloma humano

CONTENIDO	PÁGINA
1. CÁNCER CERVICOUTERINO	13
1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER CERVICOUTERINO	14
1.2. EL CÁNCER CERVICOUTERINO Y EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	15
1.2.1. LAS ONCOPROTEÍNAS VIRALES E6, E6* Y E7	20
1.2.1.1. LA ONCOPROTEÍNA E6	21
1.2.1.2. LA ONCOPROTEÍNA E6*	23
1.2.1.3. LA ONCOPROTEÍNA E7	25
1.3. VARIANTES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPOS 16 Y 18	26
1.3.1. POTENCIAL ONCOGÉNICO DE LAS VARIANTES	29
1.3.2. SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LAS VARIANTES	31
1.4. MECANISMOS DE TRANSFORMACION CELULAR POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	33
1.5. TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO	36
1.6. BIOMARCADORES DEL CARCINOMA CERVICOUTERINO: p16 ^{INK4A} Y p14 ^{ARF}	37
1.6.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	42
1.6.2. OBJETIVO	42
1.6.3. MATERIAL Y MÉTODOS	43
1.6.3.1. CULTIVOS CELULARES	43
1.6.3.2. INMUNOCITOQUÍMICA	44
1.6.3.3. INMUNOFLORESCENCIA CON DOBLE TINCIÓN	45
1.6.3.4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT	46
1.6.4. RESULTADOS	48
1.6.4.1. EXPRESIÓN DE Rb, p16 ^{INK4A} , p53 Y p14 ^{ARF}	48
1.6.4.2. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES	53
1.6.4.3. EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN E2F Y DE LAS PROTEÍNAS DE REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR	53
1.6.4.4. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR	53
1.6.4.5. EXPRESIÓN DE METALOPROTEASAS Y CATEPSINAS	54
1.6.5. DISCUSIÓN	55
1.6.6. CONCLUSIÓN	61
1.6.7. PERSPECTIVAS: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE p16 ^{INK4A} Y p14 ^{ARF} EN CITOLOGÍAS Y CORTES HISTOLÓGICOS DE CÁNCER CERVICOUTERINO	61
1.7. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE P14 ^{ARF} EN CELULAS TRANSFECTADAS CON E7 Y VARIANTES DE E6 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 18	63
1.7.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	65
1.7.2. OBJETIVO	65
1.7.3. MATERIAL Y MÉTODOS	66
1.7.3.1. CULTIVOS CELULARES Y TRANSFECCIÓN DE LAS VARIANTES DE E6 Y E6*	66
1.7.3.2. CO-TRANSFECCIÓN CON EL GEN E7 DE VPH-18	67
1.7.3.3. EVALUACIÓN DEL PATRÓN TRANSCRIPCIONAL DE E6 Y E7 POR RT-PCR	67
1.7.3.4. EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE p53 Y 14 ^{ARF} POR WESTERN BLOT	68
1.7.3.5. IMUNOCITOQUÍMICA	70
1.7.4. RESULTADOS	71
1.7.4.1. LAS VARIANTES DE E6 DE VPH-18 POSEEN PATRONES TRANSCRIPCIONALES DIFERENTES DE E6 Y E6*	71
1.7.4.2. LAS VARIANTES DE E6 VPH-18 INDUCEN EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE P53 Y P14 ^{ARF}	72
1.7.4.3. LAS VARIANTES DE E6 DE VPH-18 INDUCEN EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE E6, p53 Y p14 ^{ARF}	73
1.7.4.4. LA TRANSFECCIÓN DE E7 MODIFICA AL PATRÓN DE TRANSCRIPCIÓN DE E6	76
1.7.4.5. EL GEN E7 DE VPH-18 INDUCE UNA ELEVADA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p14 ^{ARF}	77
1.7.5. DISCUSIÓN	78
1.7.6. CONCLUSIÓN	82
1.7.7. PERSPECTIVA DE ESTUDIO	83
2. BIBLIOGRAFÍA	84
3. ANEXOS	91

1. CÁNCER CERVICOUTERINO

El cáncer cervicouterino (CaCU) generalmente conlleva un lento transcurrir evolutivo que puede ir de 15 a 25 años, por lo que se han podido establecer los diferentes estadios de la enfermedad. La historia natural del CaCU se inicia con cambios intraepiteliales que pueden conducir al carcinoma invasor, estos cambios se caracterizan por el reemplazo progresivo de las células epiteliales por células inmaduras atípicas, comenzando por las células del estrato basal hasta el reemplazo total del epitelio del cérvix, denominándosele carcinoma *in situ* (CIS) cuando no hay invasión aparente del estroma subyacente. Histológicamente esta progresión ha sido descrita en términos de displasia (leve, moderada y severa). En general, las displasias se presentan en mujeres mayores de 20 años, el cáncer *in situ* se presenta entre los 30 y 39 años y el carcinoma invasor después de los 40 años, lo que confirma la progresión de la enfermedad en el tiempo. La mayoría de las displasias leves revierten espontáneamente en el curso de algunos años y solamente entre el 15 y 25% de las lesiones progresan. Por el contrario, las displasias moderadas, graves y los carcinomas *in situ* revierten en pocos casos, siendo su conducta más frecuente la persistencia o progresión (Woodman, 2007).

En 1988, se desarrolló el sistema Bethesda para informar los resultados de los extendidos de Papanicolaou con la finalidad de dar a conocer la interpretación citológica al ginecólogo de un modo claro. Previo a este sistema, los laboratorios generalmente utilizaban el sistema numérico de clases de Papanicolaou o el término de displasia, en la práctica clínica ambos métodos carecen de reproducibilidad entre observadores. En el sistema Bethesda la interpretación de los resultados de las citologías se divide en dos grandes grupos: Negativa, cuando hay células epiteliales sin atipia y Positiva cuando hay células

epiteliales con atipia. Las anomalías de las células epiteliales escamosas se subdividen en cuatro categorías. La primera categoría corresponde a células escamosas atípicas con cambios sugestivos, pero insuficientes para hacer un diagnóstico de Lesión Escamosa Intraepitelial e incluye a los ASC-US (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*) y ASC-H (*Atypical squamous cells-cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion*). La segunda categoría son las lesiones intraepiteliales de bajo grado que incluyen la presencia de koilocitos y la displasia leve o NIC I. La tercera categoría son las lesiones intraepiteliales de alto grado y abarcan la displasia moderada (NIC II), la displasia severa y el carcinoma *in situ* (NIC III). El carcinoma de células escamosas corresponde a la cuarta categoría (Tabla 1). En categorías separadas se incluyen las anomalías epiteliales glandulares (Solomon, 2005).

Tabla 1. Comparación de las cuatro clasificaciones usadas para el informe del resultado de citología cervical (IARC, 2005).

Sistema de clasificación Papanicolaou	Clase I	Clase II	Clase III		Clase IV	Clase V
Organización mundial de la salud OMS			Displasias Leve Moderada Severa		Carcinoma in situ	Carcinoma microinvasor e invasor
NIC (Richart)			NIC I	NIC 2	NIC 3	Carcinoma invasor
Sistema Bethesda	Dentro de límites normales	Cambios celulares ASC-US ASC-H	Lesión intra epitelial escamosa de bajo grado	Lesión intra epitelial escamosa de alto grado		Carcinoma invasor
Abreviaturas: NIC, Neoplasia intraepitelial cervical; ASCUS, Células escamosas atípicas de significado indeterminado.						

1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER CERVICOUTERINO

En la década anterior, a nivel mundial el CaCU fue la segunda causa más común de muerte en mujeres, en la actualidad ocupa el tercer lugar en incidencia y la cuarta posición como

causa de muerte, al 2008 se contabilizaron 529,800 nuevos casos de CaCU y 275,100 defunciones. Más del 85% del registro de casos y muertes por esta patología ocurre en los países en desarrollo, en África se han registrado 53,000 defunciones, en América Latina y el Caribe 31,400 y 159,800 en Asia (Ferlay, 2010; Jemal, 2011).

En México, a partir del año 2006 el número de defunciones por cáncer de la mama fue superior al número de defunciones por CaCU, con lo que se convirtió en la segunda causa de muerte en mujeres en el grupo de edad de 30 a 54 años (Mohar, 2009). Para el 2008 el número de defunciones por CaCU fue de 4,031 con una tasa de 7.4 por 100,000 mujeres (SINAIS.SSA, 2011). El Programa Nacional de Salud 2007-2012 con miras al año 2030, en la meta 1.6 señala “Disminuir en 27% la tasa de mortalidad por CaCU por 100,000 mujeres de 25 años y más” (Programa Nacional de Salud, 2007-2012). En resumen, el CaCU continúa siendo tema prioritario de salud en nuestro país y el mundo.

1.2. EL CÁNCER CERVICOUTERINO Y EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El científico alemán Harald zur Hausen descubrió el papel importante del virus del papiloma humano (VPH) en la etiología del CaCU, razón por la cual obtuvo el Premio Nobel de Medicina en el 2008. Actualmente se han descrito cerca de 150 tipos de VPH, de los cuales aproximadamente 40 infectan el epitelio escamoso del tracto ano-genital, separándose en dos categorías, virus de bajo riesgo (BR), tipos: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81, y virus de alto riesgo (AR), tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59. Los tipos: 26, 66, 68- 73 y 82 también se han asociado con CaCU en algunos estudios de casos y controles, sin embargo la prevalencia de éstos en los casos es muy baja. Por otro lado, los virus de BR están asociados con enfermedades benignas como condilomas

acuminados o verrugas genitales, mientras que los virus de AR son causantes de displasias severas y CaCU (Bosch, 2011).

El término CaCU incluye las neoplasias malignas de origen epitelial que se desarrollan en la unión del epitelio cilíndrico con el epitelio escamoso o zona de unión escamo-columnar (Alonso, 2000). Recientemente se ha reportado que una discreta población celular localizada en la zona de unión está implicada en la patogénesis del CaCU asociado a la infección por VPH-AR, esta población celular es morfológicamente distinta, con un perfil de expresión génica e inmunofenotipo definido (Herfs, 2012). En líneas celulares derivadas de CaCU con VPH tipos 16 (SiHa, CaSki) y 18 (HeLa y C4-I), también se ha reportado que las células iniciadoras del cáncer expresan marcadores característicos de células “stem” (López, 2012).

Histológicamente, dos son los carcinomas más frecuentes; el carcinoma epidermoide (cerca del 85% de todos los casos) y el adenocarcinoma (con 10-12% de todos los casos). Otros tipos de carcinoma, como el carcinoma adenoescamoso, carcinoma adenoideo quístico y carcinoma neuroendocrino constituyen el restante 3-5% de casos (Tavassoli, 2003). Dentro de la etiología multifactorial que caracteriza el desarrollo del CaCU se destaca la participación primordial que tiene la infección persistente con genotipos de AR, principalmente VPH-16 y VPH-18 (Walboomers, 1999) demostrada por numerosos estudios epidemiológicos multicéntricos (Bosch, 2011). No obstante, no todas las infecciones conducen al desarrollo del fenotipo maligno y en la mayoría de los casos se resuelven espontáneamente. Solamente una pequeña fracción, que puede ir del 1 al 2% progresa a CaCU (Alonso, 2000). El hecho de que sólo una minoría de infecciones

persistentes por VPH progrese a cáncer señala la existencia de co-factores que deben estar presentes para que se dé la transformación (Tabla 2) (Carter, 2011).

En el 2006 la U.S. Food and Drug Administration (Schiffman, 2007) aprobó dos vacunas profilácticas contra el VPH para su aplicación a la población que no haya iniciado actividad sexual.

Tabla 2. Factores asociados con CaCU	
Del hospedero	Virales
Genéticos*	Genotipo
Inmunológicos	Variantes intra-tipo
Historia personal**	Carga viral
Co infecciones	Integración viral
Edad	
*Fenotipo HLA's, polimorfismo de p53 y MTHFR. **Paridad, hábito de fumar, uso de anticonceptivos orales, terapia de reemplazo hormonal, actividad sexual, dieta. (Elaborado a partir de Burd, 2003 y Carter, 2011)	

La partícula viral del VPH tiene un diámetro de 55 nm y una estructura icosaédrica compuesta por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) sin envoltura lipídica. Su genoma está constituido por ADN circular de doble cadena con una longitud aproximada de 8.000 pares de bases, y está dividido en una región codificante y una región no codificante (Muñoz, 2006; Zheng, 2006).

La región codificante, que puede comprender hasta diez marcos de lectura, se localiza en una de las cadenas de ADN, los marcos de lectura de esta región transcriben ARN mensajeros policistrónicos. Se divide en una región de expresión temprana (aproximadamente 50% del genoma) y una región de expresión tardía (40% del genoma viral). Los genes de expresión temprana que están relacionados con la modulación de los procesos de replicación y transcripción viral son E1 y E2. Es así como el gen E1 está asociado con el proceso de iniciación y elongación de la replicación viral, E2 con la

regulación del promotor viral, el inicio de la replicación y el mantenimiento del estado episomal. E4 se encuentra en esta región, aún cuando se expresa de manera tardía, participa en la maduración y liberación de partículas virales mediante la lisis de queratinas. Los genes de la región de expresión temprana que codifican para las proteínas implicadas en la inmortalización y transformación celular, son: E5, E6 y E7. E5 interactúa con el EGF (factor de crecimiento epidérmico), que facilita el proceso de transformación mediado por E6 y E7, estos últimos principalmente participan en la inactivación de las proteínas supresoras de tumores p53 y pRB respectivamente. En el caso de los VPH-AR los genes E6 y E7 se transcriben como transcritos lineares bicistrónicos y transcritos policistrónicos procesados, en el caso del VPH-16 por “alternative splicing” se forman cuatro transcritos a partir de E6, denominados E6* I-IV, mientras que para el VPH-18 se forman el transcrito E6 completo y E6* truncado, que codifican para las proteínas E6, E6* y E7.

La región de expresión tardía contiene a los genes L1 y L2 que codifican para las dos proteínas estructurales de la cápside viral. La proteína L1 constituye el componente principal de ésta y presenta una secuencia altamente conservada entre los VPHs. La proteína L2 es un componente adicional de la estructura de la cápside y posee una estructura menos conservada entre estos virus (Zheng, 2006; Maufort, 2010).

La región larga de control, del inglés Long Control Region (LCR), tiene el más alto grado de variación en el genoma viral. No tiene marcos de lectura, por lo que no codifica para proteínas, es de aproximadamente 400 a 1,000 pb (10% del genoma viral) y contiene los elementos promotores en *cis*-necesarios para la regulación del inicio de la replicación y

expresión génica. En los VPH oncogénicos los transcritos se inician a partir de dos promotores principales, uno de ellos se encuentra localizado arriba del marco de lectura de E6 y activa la expresión de los genes tempranos antes de que inicie la replicación productiva. En los VPHs 16 y 31 es el promotor P97 y en el VPH-18 es el promotor P105. El otro promotor, denominado tardío, se activa cuando se inicia la replicación productiva y dirige la expresión de diferentes inicios de la transcripción localizados alrededor de la posición 742 (Zheng, 2006; Maufort, 2010) (Tabla 3).

Tabla 3. Genes virales de expresión temprana y tardía, proteínas que codifican, peso y función (Elaborado a partir de Zheng, 2006 y Maufort, 2010).

REGIÓN	EXPRESIÓN	GENES	PROTEÍNAS	(Kd)	FUNCIÓN
CODIFICANTE	TEMPRANA	E1	E1	38-65	Regulación de la función episomal (ATPasa, helicasa)
		E2	E2	48	Regulación de la transcripción de E6 y E7
		E4	E4	10-44	Liberación de las partículas virales, rompe estructuras de citoqueratina
		E5	E5	14	Regulación de la proliferación celular. Acción con receptores de crecimiento (EGF/PDGF)
		E6	E6	16-18	Multifuncionalidad en la transformación e inmortalización celular. Degrada p53.
		E7	E7	~ 10	Multifuncionalidad en la transformación e inmortalización celular. Bloquea la división celular normal al inactivar pRb
		TARDÍA	L1	L1	57
	L2		L2	43-53	Componente menor de la cápside viral
NO CODIFICANTE	CONTROL	LCR			Ubicación del origen de replicación viral, promotor e intensificador de la transcripción de E6 y E7

Los VPHs son estrictamente epiteliotrópicos y su ciclo está estrechamente relacionado con la diferenciación de las células escamosas epiteliales y la evasión del sistema inmune del huésped. Durante una relación sexual micro-abrasiones dentro del epitelio escamoso permiten que los VPHs sean depositados y se unan a las células del estrato basal. Los virus experimentan un cambio en su conformación lo que permite que entren a las células *vía* endocitosis, proceso que toma entre dos y cuatro horas, después de que esto ocurre, la

proteína que los envuelve se descompone y el ADN viral es encaminado al núcleo donde queda en forma episomal y separado del ADN del huésped. Lo anteriormente descrito se asocia usualmente con una baja carga viral y ausencia de anormalidades citológicas (Schiller, 2010). Las proteínas tardías, L1 y L2, que conforman la cápside viral, son producidas para ensamblar a los viriones. El ensamble de los virus ocurre en las células del epitelio escamoso en maduración y la liberación de éstos en las células escamosas superficiales diferenciadas. En el caso de que se dé lugar a la transformación maligna, los productos proteicos de la expresión de los genes tempranos E6 y E7 participan en dicho proceso caracterizado por la persistencia de la infección, la integración del genoma viral y la transformación celular. La integración del ADN del VPH en el ADN de la célula huésped es mediante la interrupción del gen E2, permitiendo que el genoma circular se abra para convertirse en lineal, en consecuencia ocurre el cese de la síntesis viral y la desregulación de la expresión de E6 y E7 (Carter, 2011).

1.2.1. LAS ONCOPROTEÍNAS VIRALES E6, E6* Y E7

Las propiedades transformantes de los VPHs de AR residen principalmente en los genes E6 y E7 los cuales se expresan constitutivamente en las neoplasias malignas cervicales y en las líneas celulares derivadas de CaCU positivas a VPH (zur Hausen, 1995), E6 y E7 son por tanto dos factores carcinogénicos directos para el desarrollo de lesiones precursoras y el CaCU (Ganguly, 2009). Se han descrito dificultades en la detección de los productos proteicos de los genes E6 y E7 (Wise-Draper, 2008), esto es verdad sobre todo en lo que se refiere a las formas truncas de E6, denominadas E6* (Schneider-Gädicke, 1988; Roggenbuck, 1991; Vaeteewoottacharn, 2005; Heer, 2011). Una de las explicaciones es la

probable inestabilidad, inhibición de la síntesis y degradación de estas (Vaeteewoottacharn, 2005; Wise-Draper, 2008), por lo que los estudios se han enfocado principalmente a la detección de los ARN mensajeros de E6, E6* y E7 (Pim, 2009; Heer, 2011; Hwang, 2012).

1.2.1.1. LA ONCOPROTEÍNA E6

La oncoproteína E6 consta de aproximadamente 160 aminoácidos (Münguer, 2002) y posee un peso aproximado de 18.9 kDa (Schneider-Gädicke, 1988). Contiene en su estructura dos dominios denominados dedos de zinc, altamente conservados y caracterizados por la secuencia Cys-X-X-Cys cuya integridad es esencial para su actividad (Mantovani, 2001). Se ha visto que la proteína E6 de los VPH-AR es suficiente para la inducción y mantenimiento de la transformación celular (Hawley-Nelson, 1989; Duensing, 2002; Münger, 2004). Su blanco más estudiado es la proteína p53 (Moody, 2010), se sabe que E6 se une a p53 y causa su degradación vía proteosoma (Scheffner, 1990). La degradación de p53 ocurre a través de un complejo formado por E6, la proteína celular asociada a E6 (E6AP) y p53 (Thomas, 1999; Zanier, 2005).

E6AP (ubiquitin ligasa tipo E3) ubiquitina a p53 y lo “marca” para su degradación por el proteosoma. En ausencia de E6AP, E6 también puede degradar a p53 (Massimi, 2008). Se ha demostrado en queratinocitos humanos que la proteína E6 de los VPH de AR evita la apoptosis por un mecanismo independiente de p53 que involucra la inhibición de la expresión del gen Bax y la degradación de la proteína Bax. La inhibición de la proteína pro-apoptótica Bax tiene como consecuencia la inhibición de la apoptosis y por lo tanto la acumulación de mutaciones en el ADN de las células infectadas (Magal, 2005). Además de

p53 y BAX, la proteína E6 ejerce su actividad transformante mediante su interacción con una gran variedad de proteínas celulares que regulan procesos biológicos como apoptosis, proliferación celular, estabilidad cromosómica, transcripción de genes (oncogenes y genes supresores de tumor), diferenciación celular y respuesta inmunológica (Tungteakkhun, 2008) (Figura 1). Se sabe que la proteína E6 de los VPH de BR aún cuando se unen a p53, con baja afinidad, no lo degradan (Slebos, 1995). Además no forman el complejo E6-E6AP-p53 (Zanier, 2005).

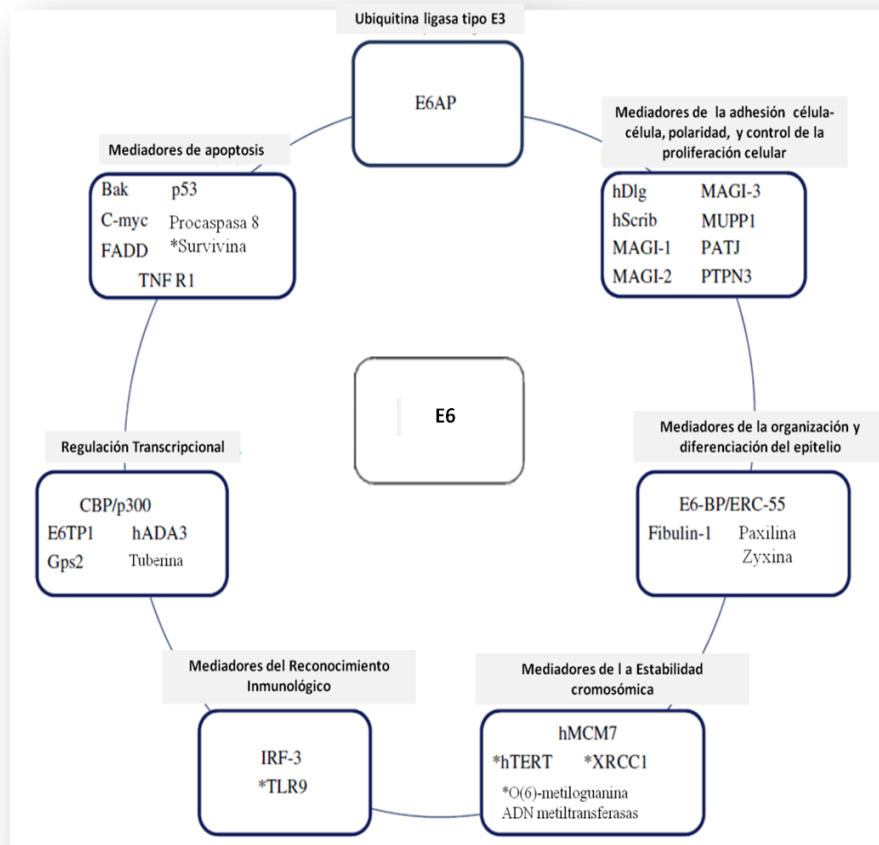


Figura 1. Procesos biológicos y proteínas celulares reguladas por la proteína E6 de los VPH-AR. El asterisco (*) indica las proteínas donde la influencia es a nivel de transcripción, las proteínas sin (*) son aquellas en las que su influencia es a nivel de proteína (Modificado de Tungteakkhun, 2008).

1.2.1.2. LA ONCOPROTEÍNA E6*

Una característica común de los transcritos de ARN mensajeros de E6 de los VPH-AR, que los diferencia de los de VPH-BR, es el corte y ensamble alternativo (“alternative splicing”) que lleva a la remoción de un pequeño intrón dentro del marco de lectura de E6, que tiene como resultado la generación de proteínas truncas en el extremo del carboxilo terminal a las que se les ha denominado E6* (Pim, 2009) (Figura 2). Esta diferencia entre los VPH de AR y los de BR se explica, entre otras razones, porque estos últimos carecen de los dinucleótidos **G-T** que corresponden a la secuencia consenso de corte y ensamble alternativo presentes en los tipos de alto riesgo (Tipos 16, 18, 31 y 33) (Schneider-Gädicke, 1988). El VPH-16 posee patrones de corte y ensamble alternos que permiten la expresión de hasta cuatro especies de transcritos alternos (Stacey, 1995; Pim, 2009). El VPH-18 transcribe una sola especie de ARN mensajero alternativo que da origen a la proteína E6* (Schneider-Gädicke, 1986; Inagaki, 1988; Schneider-Gädicke, 1988; Pim, 2009). Los ARN mensajeros de E6* del VPH- 16 y 18 se encuentran en niveles altos, si se comparan con los ARN mensajeros de E6 completo, lo cual ha sido demostrado en células transformadas, animales transgénicos, líneas celulares de cáncer cervical y muestras clínicas (Schneider-Gädicke, 1986; Schneider-Gädicke, 1988; Cornelissen, 1990; Griep, 1993).

Heer y colaboradores (2011) argumentan que dado que el ARN mensajero de E6* es abundante, podría esperarse que se produjeran cantidades significativas de proteínas E6*. Sus resultados mostraron que aún cuando las proteínas E6* se produce en niveles altos, estas son inestables debido a que tienden a oligomerizarse en conformaciones α -hélice y láminas β , dependiendo del pH intracelular, la disponibilidad del cinc (por el que tienen

alta afinidad) y por reacciones de oxido-reducción que pueden favorecer la formación de puentes disulfuro.

No obstante lo anterior, se sabe que la proteína E6* tiene un peso aproximado de 6.5kDa (Schneider-Gädicke, 1988) y varios de sus efectos han sido estudiados, por ejemplo, la proteína E6*I del VPH-16 tiene la capacidad de transactivar el promotor del adenovirus E2 así como el promotor P97 de VPH-16 (Shirasawa, 1994), además regula negativamente la función de la proteína E6 (Sedman, 1991). También se ha estudiado la capacidad de E6* del VPH-18 para unirse a las proteínas E6, E6AP y p53, determinándose que E6* se une con mayor afinidad a E6, después a E6AP y ligeramente a p53. Además la unión de E6* al complejo E6-E6AP inhibe la degradación de p53 (Pim, 1997). La unión de E6*I del VPH-16 a p53 también ha sido descrita por del Moral-Hernández y colaboradores (2010).

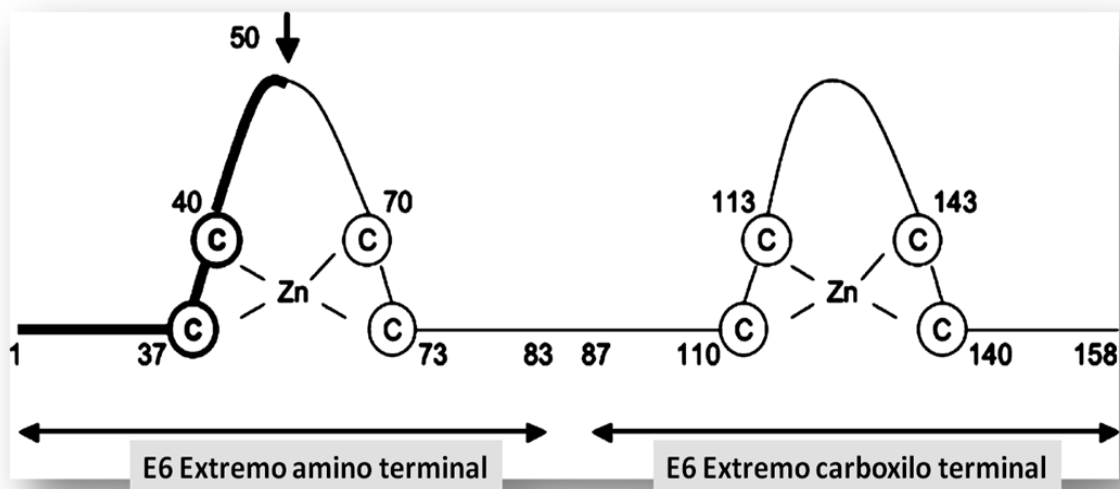


Figura 2. Representación esquemática de la secuencia de E6 del VPH-16. E6* comprende los residuos 1-50, destacados por la línea gruesa en negro. La flecha negra indica el sitio donador presente solamente en los E6 de los VPH-AR. Se muestran también las posiciones de los amino ácidos cisteína (las C dentro de círculos), que participan en la unión con el cinc (Zn). El polipéptido E6* conserva en el extremo amino terminal solamente la mitad de un dominio de unión al cinc (Cis37 y Cis40) (Modificado de Heer, 2011).

1.2.1.3. LA ONCOPROTEÍNA E7

La oncoproteína E7 tiene aproximadamente 100 aminoácidos y está formada por tres dominios altamente conservados denominados CR1, CR2 y CR3. Estos dominios son críticos para las actividades transformantes ya que es a través de éstos que interactúan con el gen supresor de tumores retinoblastoma pRb, además de diversas proteínas celulares (Ganguly, 2009) (Figura3). En las células que sobre-expresan a la proteína E7

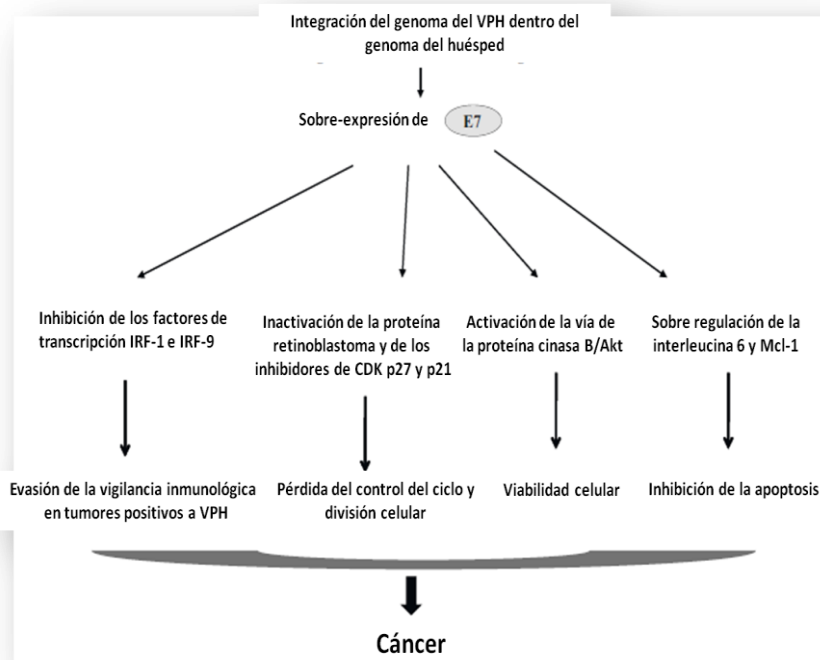


Figura 3. Vías que son blanco de la proteína E7 de los VPH-AR. La integración del ADN del VPH al ADN de la célula huésped tiene como consecuencia la sobreexpresión de la proteína E7, sus efectos en diferentes vías celulares resultan en cáncer (Modificado de Ganguly, 2009).

se forma un complejo con la forma hipofosforilada de pRb a través del dominio LXCXE de E7 y del reclutamiento de la enzima proteasa de cisteína calpaína que inducen su degradación por la vía del proteasoma. La inactivación de pRb provoca la activación constitutiva del factor de transcripción E2F, en consecuencia ocurre la activación de genes involucrados en la síntesis de ADN durante la fase S del ciclo celular (Wise-Draper, 2008).

Hasta el momento no se ha descrito que el gen E7 experimente “alternative splicing”, como en el caso de E6 (Valdovinos-Torres, 2008; del Moral-Hernández, 2010). De la misma manera se ha demostrado que el transcrito de ARN mensajero de E7 se produce de forma eficiente a partir de los transcritos de E6 con corte y ensamble alternativo o sin él (Pim, 2009) a diferencia de lo reportado por del Moral-Hernández y colaboradores (2010) que indican que E7 se transcribe con mayor eficiencia a partir de los transcritos ensamblados.

1.3. VARIANTES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPOS 16 Y 18

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae* compuesta por 16 géneros, los virus pertenecientes al género *alpha papillomavirus* se caracterizan por ser causantes de lesiones mucosas y cutáneas en humanos y primates. De este género, cinco especies afectan al tracto genital: *alfa 5* (VPH tipos 26, 51, 69 y 82), *alfa 6* (VPH tipos 53, 30, 56), *alfa 7* (HPV tipos 18, 39, 45, 59, 68, 70), *alfa 9* (VPH tipos 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67) y *alfa 10* (VPH tipos 6, 11, 13, 44, 74) (de Villiers, 2004; Bernard, 2005; Muñoz, 2006; Carter, 2011). La comparación de la secuencia de los marcos de lectura del gen L1 llevo al establecimiento de la clasificación taxonómica actual: 1) Los antes denominados “supergrupos” o “ramas principales”, ahora se denominan como “géneros” que comparten entre ellos, menos del 60% de homología en el marco abierto de lectura del gen L1. Si se trata de secuencias de genomas completos la homología puede ser de más del 23% pero menos del 43%. El término de “especie” (antes denominados “grupos”, “subgrupos” o “ramas menores”) se usa cuando dentro de un género comparten del 60% al 70% de homología en los nucleótidos. El “tipo” dentro de una especie, queda definido

cuando la secuencia de los nucleótidos del gen L1 de un “nuevo VPH” difiere en al menos 10% de la secuencia del gen L1 de un VPH conocido (de Villiers, 2004; Bernard, 2005).

Debido a que molecularmente el gen L1 es una de las regiones más conservadas dentro del genoma viral, la clasificación taxonómica de los diferentes tipos se ha realizado por comparación de la secuencia de nucleótidos de este marco abierto de lectura, aunque también se han utilizado para ello las secuencias de los nucleótidos de los genes E6 y E7. Un nuevo tipo viral se define cuando se identifica un nivel de variación mayor al 10% en la secuencia de L1 respecto a la secuencia de los tipos previamente clasificados, un subtipo entre el 2% y el 10% y una variante menos del 2% en las regiones codificantes y 5% en las regiones no-codificantes de las secuencias de un tipo en particular. La ocurrencia de variantes naturales intra-tipo es definida mediante el análisis de las secuencias de un fragmento de la región larga de control y/o de los marcos de lectura para E6, E7, E2, E5, L2 y L1 (Stöppler, 1996; Lizano, 2009a).

En el mundo existe una gran variación en la prevalencia de los tipos de VPH, no obstante los tipos 16 y 18 son los más prevalentes en las lesiones cervicales y son causa del 60% al 80% de todos los cánceres (Carter, 2011). Los primeros trabajos de variabilidad genética se iniciaron con el VPH-16, estos estudios se basaron en la comparación de las secuencias de los nucleótidos de distintos aislados con el “virus de referencia o prototipo” que fue el primer VPH-16 descrito, de esta manera Ho y colaboradores (1993) definieron el primer árbol filogenético basado en un fragmento de la LCR a partir de aislados de VPH-16 obtenidos de muestras de cáncer de cérvix provenientes de los distintos continentes. Este árbol reveló cinco ramas filogenéticas o variantes: Africanas (Af-1 y Af-2), Asiática-

Americana (AA), Asiática (As) y Europea (E), quedando el clon referencial dentro de la rama E. Se han propuesto ramas filogenéticas menores como la Norteamericana-1 (NA-1) (Yamada, 1997). Estudios similares fueron realizados para VPH-18 obteniéndose tres variantes: Africana (Af), Asiático-Amerindia (AsAi) y Europea (E), siendo el clon de referencia AsAi (Ong, 1993) (Figura 4). Posteriormente se llevaron a cabo otras investigaciones en las que se concluyó que las diferencias en la secuencia de los nucleótidos en estos genes sugieren un vínculo con la distribución etno-geográfica de los grupos humanos, así como un potencial oncogénico relacionado con las variantes de los VPH estudiados. Esta diversidad refleja una evolución de aproximadamente 200,000 años a partir de un genoma precursor posiblemente originado en África (Lizano, 2009a; Burk, 2009).

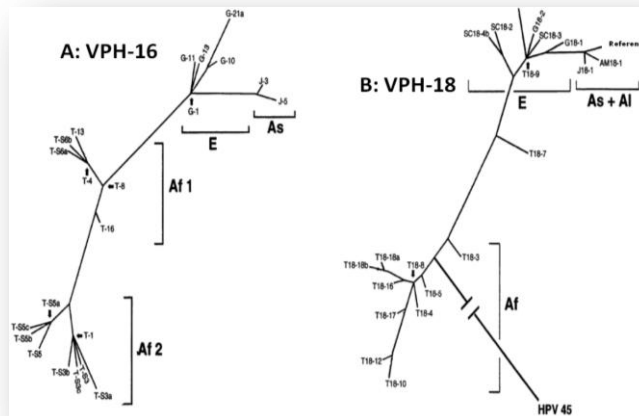


Figura 4. Ramas filogenéticas o variantes y algunos de los aislados de los tipos virales 16 y 18. Las muestras fueron obtenidas de pacientes de cohortes representativas de África (T: Tanzania), Europa (G: Alemania y SC: Escocia) y Asia oriental (J: Japón). Los corchetes incluyen los aislados con mayor ocurrencia en África (Af), Europa (E), Asia Oriental (As) y América (Ai). La construcción se determinó a través de la comparación de las secuencias a partir de un fragmento de 321 pb de la LCR. El aislado de referencia del VPH-16 pertenece a la rama europea representado como el aislado G-11. Para el VPH-18 el aislado de referencia se localiza en la rama Asiático-Amerindia (AsAi), por encontrarse en muestras de Asia y Sur de América (Tomado de Ong, 1993).

1.3.1. POTENCIAL ONCOGÉNICO DE LAS VARIANTES

Cada uno de los aislados de ADN obtenidos en las muestras de pacientes de diferentes regiones del mundo que difieren del prototipo en al menos un nucleótido de un tipo viral específico se les ha denominado variantes. De los estudios de las variantes se pueden obtener dos conclusiones importantes; existe un número definido de variantes por tipo viral y las variantes han mostrado máxima divergencia cuando han sido identificadas en muestras de grupos étnicos que por largo tiempo no han tenido contacto con otros grupos étnicos (Bernard, 2005).

Así mismo, existen datos moleculares y epidemiológicos que sugieren que las variantes de un tipo viral son biológicamente distintas y pueden conferir riesgo patogénico diferencial. Los estudios epidemiológicos se han enfocado en las variantes de los tipos virales 16 y 18, por ser los de mayor frecuencia en el CaCU (Yamada, 1997).

Un meta-análisis de la prevalencia de VPH cervical en un millón de mujeres con citología normal en los 5 continentes, describe que en todas las regiones estudiadas se identificaron dos picos de prevalencia del VPH, un pico en mujeres de <25 años, declinando posteriormente. Un segundo pico se observó claramente en América Central y América del Sur en mujeres de > de 45 años y >55 años en África Occidental, y un pico menos pronunciado en el Sur de Asia, Sur de Europa y África del Sur. Estos picos de prevalencia pueden ser multifactoriales como resultado de la interrelación del comportamiento sexual, estado inmunológico del huésped, estatus hormonal y etnicidad, así como de las características del VPH, tales como, tipos y variantes (Bruni, 2010).

Se sabe que en el VPH-16 las variantes no europeas tienen un mayor riesgo de persistencia y progresión de infección cervical, comparado con las variantes europeas (Xi,

1997; Berumen, 2001; Wang, 2003; Tornesello, 2011). Con este mismo tipo viral, un estudio en México mostró evidencias clínicas y epidemiológicas que sugieren que la variante AA, puede ser más oncogénica que la variante europea, ya que se encontró con mayor frecuencia (que la variante europea) en pacientes con cáncer y en las mujeres jóvenes con tumores más agresivos, en los controles se observó una baja frecuencia de la variante AA (Berumen, 2001). Se ha determinado que la variante AA del VPH-16 confiere un riesgo para cáncer cervical 9 veces mayor que el de la variante europea. En conjunto con otros aislados de la variante no europea, el riesgo es 4.5 veces mayor para el desarrollo de una neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (Xi, 1997). No obstante lo antes dicho, en otro trabajo donde se relaciona el tipo de variante con el riesgo de progresión a cáncer, los autores encontraron que la variante no europea mostró ser menos agresiva que la variante europea (Zuna, 2011).

El estudio de la distribución de las variantes del VPH-18 en diferentes tipos histológicos de cáncer cervical, en lesiones pre-malignas y en epitelio normal cervical, concluyó que las variantes de este tipo de VPH tienen un comportamiento distinto, en particular, la variante Af del VPH-18 se encontró exclusivamente en carcinoma epidermoide y en una proporción mayor de lesiones pre-malignas, mientras que las variantes europeas y AsAi se encontraron en todos los tipos histológicos incluyendo aquellos con un peor pronóstico relativo, como adenocarcinoma y carcinoma de células pequeñas (Lizano, 1997; Burk, 2003; De Boer, 2005; Lizano 2006).

El reconocimiento de la participación que algunos tipos y variantes virales tienen en el desarrollo del CaCU, es necesario para la prevención e implementación de estrategias de

salud pública para su control. Patología que continúa siendo una importante causa de muerte en muchas naciones en vías de desarrollo (Lizano, 2009a).

1.3.2. SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LAS VARIANTES

Varios trabajos se han enfocado en determinar las consecuencias de la variación intratipo en las propiedades biológicas y bioquímicas de las proteínas E6 y E7. La proteína E6 ha sido ampliamente estudiada debido a que interactúa con una variedad de proteínas celulares que participan en diferentes vías de señalización cuya desregulación puede llevar a la transformación celular. Estudios previos han demostrado que cambios en los aminoácidos de la proteína E6 del VPH-16 pueden anular la diferenciación de los queratinocitos, dependiente de calcio y suero. Específicamente, la proteína E6 de AA-a indujo consistentemente una proporción de colonias resistentes a la diferenciación, aún en presencia de calcio y suero en cultivos de queratinocitos de prepucio de humano (Stöppler, 1996). También se ha visto que las variantes de E6 de VPH-16 pueden regular diferencialmente la tumorigenesis por la vía de señalización de Notch y Ras (Chakrabarti, 2004). Estos datos sugieren que el posible potencial oncogénico incrementado de las variantes AA podría ser atribuido a diferencias en las funciones biológicas de la proteína E6.

Otros estudios sugieren que la relación de los niveles de transcritos E6:E6* de las variantes AsAi, E y Af del VPH-18 tienen como resultado diferencias en la activación de vías de señalización como Akt/PKB y MAPKs, que participan en la sobrevivencia y proliferación celular. Así mismo, la degradación de hDIg es diferente, afectando los niveles de PTEN activado y PKB. En otras palabras, en las variantes AsAi y E, con una relación de transcritos

E6* > E6 los niveles de hDlg, PTEN y pPKB fueron menores, en comparación con la variante Af. Las variantes AsAi y E de E6 de VPH-18 también son capaces de inducir la sobreexpresión de la proteína PI3K fosforilada, correlacionando fuertemente con la activación de las MAPKs y la proliferación celular, a diferencia de la variante Af (Contreras-Paredes, 2009). También se sabe que el diferente patrón de “splicing” de E6 entre las variantes de VPH-18 afecta los niveles de p53 y otras proteínas celulares reguladas por p53, como Bax (De la Cruz-Hernández, 2005). Diferencias que pueden explicar el potencial oncogénico de las variantes en el CaCU.

La oncogenicidad de las variantes de los VPH-16 y VPH-18 puede resultar no solo del incremento en la actividad neoplásica de los oncogenes E6/E7 y de la relación E6:E6*, sino también de una eficiente replicación del virus o de diferencias en la expresión de los oncogenes virales. Esto último ha sido explorado en varios trabajos en los que se comparó la actividad del promotor de las variantes del VPH-16, encontrando que la actividad del promotor en las variantes NA1 y AA-c es tres veces superior que la actividad del promotor de la clona de referencia (E). En el caso de la variante AA-c, este incremento se atribuye a cambios en los nucleótidos en el extremo 3' de la LCR, por lo que se ha propuesto que pequeñas diferencias en las secuencias de la LCR entre las variantes del VPH-16, pueden tener efectos dramáticos en su capacidad de respuesta a los distintos factores de transcripción y por lo tanto, en los niveles de expresión de E6/E7. Por lo que la progresión del CaCU secundario a infección por VPH-16 involucra tanto los niveles de factores de transcripción celulares, como los de la variante viral (Veress, 1999; Kämmer, 2000; Ndisang, 2006). Respecto a diferencias en la tasa de replicación viral, también se ha propuesto que los cambios en la secuencia de los nucleótidos de la LCR del VPH son los

responsables. Se ha visto una mayor replicación viral en la variante AA-c del VPH-16 comparada con la de las variantes E y Af, atribuida a una eficiente expresión de los factores de replicación E1 y E2 (Hubert, 2005). Los datos presentados podrían explicar el aumento en el riesgo de CaCU observado en aquellas mujeres infectadas con esta variante. Con este mismo enfoque se han estudiado las diferencias en la actividad transcripcional del promotor P105 entre variantes del VPH-18. Las variantes AsAi demostraron tener una mayor actividad transcripcional que las variantes E y una variante Af, la cual tuvo la menor actividad (Sichero, 2005; López-Saavedra, 2009), lo que podría correlacionar la menor oncogenicidad de esta variante. Se han encontrado diferencias no significativas en la actividad transactivadora de E2 entre las variantes de VPH-16 y VPH-18, aún cuando E2 es un elemento regulador crítico en el ciclo de los VPH. Al parecer las diferencias o sustituciones en los aminoácidos de las proteínas E2 de las variantes virales carece de significado funcional (López-Saavedra, 2009).

1.4. MECANISMOS DE TRANSFORMACION CELULAR POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Según zur Hausen, el proceso de carcinogénesis cervical, desde la infección por VPH-AR hasta la integración de éste en el genoma del huésped y el desarrollo de lesiones premalignas y malignas, se caracteriza por modificaciones en la expresión de genes virales, principalmente E6/E7 y genes celulares que participan en diferentes vías de señalización dentro de las células infectadas y en proliferación (Figura 5A) (zur Hausen, 2008; Carter, 2011). Como el ciclo del VPH se lleva a cabo dentro de las células epiteliales escamosas se mantiene "*oculto*" de la respuesta inmune del huésped. A diferencia de otras infecciones,

el VPH no provoca respuesta inmune sistémica y no pasa por una fase de viremia. Las células epiteliales infectadas experimentan “*muerte celular no-lítica*” y aunque no son destruidas, son capaces de liberar los viriones de nueva síntesis. No se produce una reacción inflamatoria local pues se bloquea la liberación de citocinas que normalmente se producen en respuesta a un invasor. Se trastorna además la función de las células dendríticas (Figura 5B). En el caso de que una respuesta inmune sea generada tras la infección natural, hay liberación de anticuerpos anti-L1 neutralizantes en la membrana basal que evitan la unión del virus a las células basales (Stanley, 2007; Carter, 2011).

El escape del control celular, que representa la segunda vía de señalización, constituye otra etapa más avanzada en la transformación maligna del epitelio cervical y se caracteriza por la inactivación de p53 y Rb por las proteínas E6 y E7 del VPH, lo que se traduce en pérdida de control sobre las fases G1/S y G2/M del ciclo celular, aumento de la proliferación celular, aneuploidía y sobreexpresión de los supresores de tumor p16^{INK4} y p14^{ARF} (Kim, 2005). El efecto inhibitorio de p16^{INK4A} sobre la proliferación celular puede ser parcialmente anulado por E6 (Shai, 2007). E7 inactiva y posteriormente degrada a pRB, provocando la liberación del factor de transcripción E2F-1, que induce sobre-expresión de p16^{INK4A}, p14^{ARF} y otras proteínas. A su vez, p14^{ARF}, al secuestrar a E7 en el nucléolo, interfiere negativamente con su acción (Pan, 2003). Finalmente, la elevada expresión y la acción sinérgica de los genes virales E6/E7 sobrepasa la acción supresora de tumor de p16^{INK4A} y p14^{ARF}, lo que clínicamente correspondería al desarrollo de la lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (Figura 5C) (zur Hausen, 2008). En las células en proliferación e infectadas con VPH existen mecanismos de control que resultan en la inhibición de la transcripción viral, debido a la producción local de citocinas específicas,

principalmente el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$) proveniente de macrófagos activados. Este mecanismo suprime la mayoría de los transcritos virales. En etapas tardías de la progresión, la pérdida de este control se acompaña por una elevada expresión de las proteínas virales (Figura 5D) (Soto, 1999; Soto, 2000). Clínicamente esto correspondería al desarrollo de lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y al carcinoma in situ con o sin modificaciones genómicas asociadas al carcinoma invasor y a las metástasis (zur Hausen, 2008).

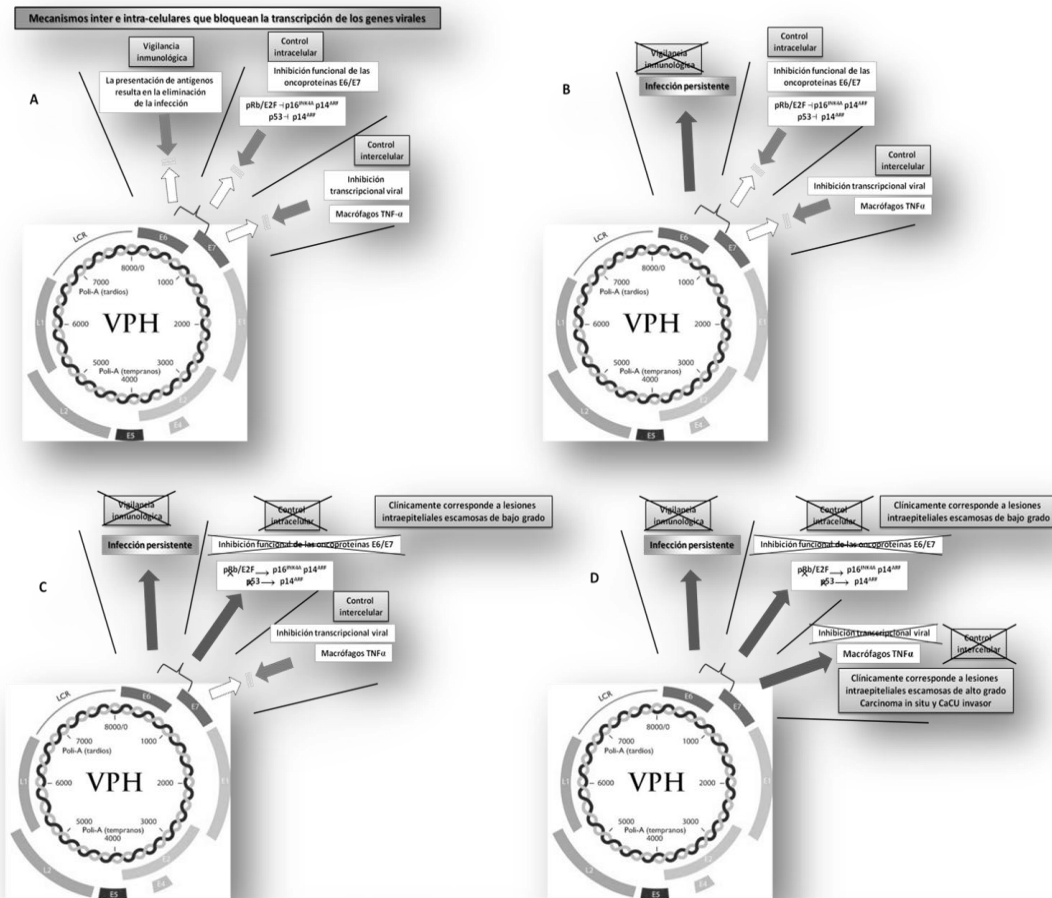


Figura 5. Mecanismos de transformación de las células epiteliales cervicales por el virus del papiloma humano de alto riesgo. Esquema de los mecanismos que controlan el bloqueo de la transcripción del ARN viral y la función de las oncoproteínas virales E6 y E7 (A). La persistencia del ADN viral ocurre posterior a eventos que probablemente provocan mutaciones dentro de la vía HLA Clase I (B). La interferencia con las vías de control intra-celular que bloquean la función de las oncoproteínas virales, favorece el desarrollo de lesiones tempranas, que clínicamente puede corresponder a lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (C). La eventual desaparición de un control transcripcional paracrino de los transcritos del VPH se correlaciona con la expresión de las oncoproteínas E6/E7 y, clínicamente podría corresponder al desarrollo de lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (D). Además eventos moleculares son probablemente requeridos en lesiones con un crecimiento invasor (Elaborado y modificado a partir de Kim, 2005 y zur Hausen, 2008).

1.5. TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO

Desde el descubrimiento de la asociación causal entre la infección por VPH-AR y el CaCU, se han desarrollado pruebas moleculares para identificar la presencia de estos virus en el epitelio cervical. Algunas de estas pruebas se basan en la detección de ácidos nucleicos virales (Bosch, 1995; Cox, 2009). De dichas pruebas, las que detectan el ADN del VPH no distinguen entre una infección transitoria y una infección persistente, por lo que carecen de utilidad para evaluar el comportamiento biológico de las lesiones y predecir su posible curso clínico (Pinto, 2012). Por otro lado, la detección de los ARN mensajeros de E6 y E7 resulta ser un buen indicador de la persistencia de la infección por VPH-AR, además de aumentar la especificidad para la detección de lesiones de alto grado, en comparación con la pruebas moleculares que detectan ADN viral (Kottaridi, 2011). No obstante, los requerimientos logísticos son muy exigentes y precisos (se necesita de material fresco con ARN bien conservado) (Wentzensen, 2007). En conclusión, por el momento, las pruebas genómicas para la detección de VPH-AR no pueden ser aplicadas a la población general, por ser complicadas, costosas y porque no pueden correlacionarse adecuadamente con los datos citológicos o histopatológicos (Hwang, 2012).

Existen pocos reportes sobre la detección de proteínas de VPH-AR por técnicas inmunológicas (Western blot, inmunohistoquímica, etc.) tanto en tejidos neoplásicos como en líneas celulares de CaCU. Como se ha mencionado, la integración del genoma del VPH-AR al de las células epiteliales tiene como consecuencia la pérdida de una parte del genoma viral, conservándose únicamente las secuencias genómicas que codifican para las proteínas E6 y E7 (Doorbar, 2006) y en teoría, sólo estas proteínas podrían ser detectadas,

aunque existen reportes sobre la detección de otros componentes proteínicos de VPH-AR como L1 (Xiao, 2010). Otra limitante para la detección de proteínas virales consiste en la formación de ARNm quiméricos (ARNm viral-celular) que incluyen secuencias virales y celulares y que pueden ser aún más abundantes que los ARNm virales no quiméricos (Vinther, 2005), por ello la proteína quimérica expresada contendría fragmentos peptídicos similares a los de la célula huésped, dificultando su identificación. Otra de las posibles razones que explican la dificultad en la identificación de proteínas virales es la gran variabilidad en los transcritos de los genes codificantes, como resultado del corte y ensamble alternativo que se observa en el gen E6 de los VPH-AR (Schneider-Gädicke, 1988). Otras posibles causas son: su inestabilidad molecular, la inhibición de su síntesis y su rápida degradación por mecanismos celulares de defensa (Roggenbuck, 1991, Vaeteewoottacharn, 2005; Wise-Draper, 2008). Por el contrario, en líneas celulares transfectadas ha sido posible detectar a las proteínas virales E6 y E7 por técnicas inmunológicas (inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia y Western blot) (Hawley-Nelson, 1989; Wu, 1997; Fiedler, 2006).

1.6. BIOMARCADORES DEL CARCINOMA CERVICOUTERINO: p16^{INK4A} Y p14^{ARF}

La citología exfoliativa con técnica de Papanicolaou es un instrumento útil para la detección temprana del CaCU (ACOG, 2009), aunque la sensibilidad (58%) y la especificidad (69%) de esta prueba son bajas (Fahey, 1995) debido a que el diagnóstico depende de la identificación de células con fenotipo maligno o pre-maligno, con base en criterios morfológicos, lo cual es influenciado por el nivel del entrenamiento y la pericia de

citólogos y patólogos involucrados en la interpretación de las muestras citológicas. Por lo anterior, este método adolece de un importante componente subjetivo (ACOG, 2009). Para superar dicha limitación existe un gran interés a nivel mundial por encontrar estrategias para reducir la proporción de resultados falsos negativos y falsos positivos. Con la finalidad de basar los estudios citológicos e histológicos en datos objetivos se han evaluado múltiples biomarcadores, por ejemplo; expresión de la proteína L1 de la cápside del VPH, expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), actividad de la telomerasa. La expresión combinada de p16^{INK4A} y Ki-67 o la detección de la expresión de proteínas del mantenimiento de los minicromosomas (MCMs) en combinación con la expresión de la Topoisomerasa 2 α (denominado prueba ProExC), así como la expresión de proteasas (Metaloproteasas y Catepsinas) como posibles marcadores de CaCU (Syrjänen, 2005; Malinowski, 2007; Hwang, 2012; Pinto, 2012).

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica muy conveniente para la detección de moléculas que pudieran asociarse al fenotipo maligno en CaCU, por ser económica, sensible y proporcionar información sobre la localización tisular y celular del marcador en estudio, así como sobre los cambios morfológicos de las células (Malinowski, 2007; Pinto, 2012). El entendimiento del ciclo del VPH y su asociación con los eventos moleculares en la carcinogénesis del cérvix uterino ha guiado los esfuerzos de los investigadores para la identificación de moléculas en esta neoplasia. Un marcador molecular ideal sería aquel que además de evidenciar la presencia de VPH-AR, refleje las modificaciones celulares asociadas al proceso de carcinogénesis: Alteraciones en la traducción y transmisión de señales, desregulación del ciclo celular, inhibición de la apoptosis, activación de la replicación del ADN, así como las interacciones entre la matriz extracelular y las células

neoplásicas en los procesos de angiogénesis, invasión y metástasis (Syrjänen, 2005, Malinowski, 2007; Pinto, 2012). La naturaleza compleja del CaCU plantea la necesidad de utilizar un panel de biomarcadores para la adecuada caracterización de las neoplasias malignas y lesiones precursoras (Malinowski, 2007).

En lo que se refiere al abordaje clínico, la detección de la presencia de algunos marcadores inmunohistoquímicos y la detección del VPH-AR por técnicas moleculares podrían ayudarnos a distinguir las lesiones que ameritan un tratamiento agresivo de aquellas que probablemente evolucionarán de manera favorable con un tratamiento conservador o que revertirán sin tratamiento (Wentzensen, 2007; Hwang, 2012).

En general los estudios de biomarcadores no son concluyentes y aún no existe un consenso acerca de cuál o cuáles serían los más útiles en la evaluación citológica del CaCU y lesiones precursoras. Uno de los atributos del marcador ideal es que proporcione la mayor cantidad posible de información, tenga la mayor sensibilidad y especificidad posibles, así como valor predictivo alto.

En la Tabla 4 se describen los biomarcadores evaluados en este trabajo: Las proteínas virales E6 y E7 que se sabe inducen la inmortalización y la transformación maligna de las células infectadas por VPH-AR. Las proteínas supresoras de tumor p53 y Rb que son los blancos sobre los que actúan E6 y E7, induciendo su degradación y en consecuencia la pérdida del control celular en las fases G1/S y G2/M del ciclo celular. La inactivación de pRb tiene como consecuencia la liberación de E2F-1 entre otros miembros de esta familia de factores de transcripción, lo que se refleja en el aumento de la expresión de genes involucrados en el ciclo celular y la proliferación: p14^{ARF}, p16^{INK4A}, PCNA, Ki-67 y ciclinas (A,

B1 y E) (Figura 6), moléculas que en otros trabajos ya han sido estudiadas con resultados no concluyentes y controversiales en lo que respecta a su utilidad clínica.

Tabla 4. Biomarcadores evaluados y procesos celulares en los que participan	
E6 y E7 del VPH tipos 16 y 18	Transformación maligna de células epiteliales
p53 y pRb	Control del ciclo celular
p16 ^{INK4A} y p14 ^{ARF}	Supresores de tumores
E2F-1, Ciclina A, Ciclina B1 y Ciclina E	Factor de transcripción y reguladores del ciclo celular
PCNA y Ki-67	Síntesis de ADN y proliferación celular
Proteasas: MMP-2, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, Catepsina B, Catepsina D y Catepsina F	Angiogénesis, invasión y metástasis

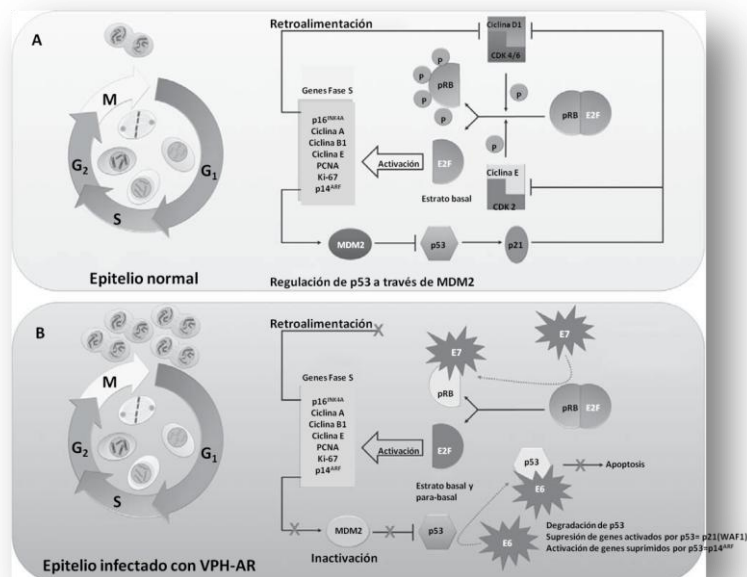


Figura 6. Biomarcadores de neoplasia cervical alterados por E6 y E7 de VPH-AR. A) Epitelio normal: Los factores de crecimiento externo activan el complejo ciclinaD1/CDK 4/6, que en su momento fosforilan a pRb. El factor de transcripción E2F es liberado y activa genes de progresión de la fase S. Entre esos genes se encuentran p16^{INK4A}, p14^{ARF}, ciclinas A, B1 y E, PCNA y Ki-67. Un mecanismo de retroalimentación es inducido por p16^{INK4A} que inactiva al complejo de ciclina D1/CDK4/6 que posteriormente inactiva a E2F. Los niveles de p53 son controlados por MDM2. Los niveles de p14^{ARF} son controlados por p53 que a su vez activa a p21. B) Epitelio infectado por VPH-AR: En las células basales y para-basales la oncoproteína E7 se une e inactiva a pRb, liberando al factor de transcripción E2F. E2F activa genes de la fase S. El mecanismo de retroalimentación de p16^{INK4A} se interrumpe y la proteína se acumula debido a una prolongada estimulación de E2F que también estimula al resto de las proteínas. La sobre expresión de p14^{ARF} da como resultado la inactivación de MDM2, el cual ya no puede regular los niveles de p53. La oncoproteína E6 se une a p53 y lo marca para su degradación lo que da como resultado la supresión de genes activados por p53 (p21) y la activación de genes reprimidos por p53 como p14^{ARF} (Modificado de Pinto, 2012).

La transformación neoplásica del epitelio cervical induce cambios en la interacción de las células con su entorno. Las metaloproteasas de matriz (2, 9, 10, 11 y 12) y las catepsinas (B, D y F) son algunas de las enzimas que frecuentemente han sido mencionadas como de gran importancia en procesos relevantes para el progreso del CaCU: Angiogénesis, invasión y metástasis y en lesiones precancerosas, pero los resultados son inconsistentes (Figura 7).

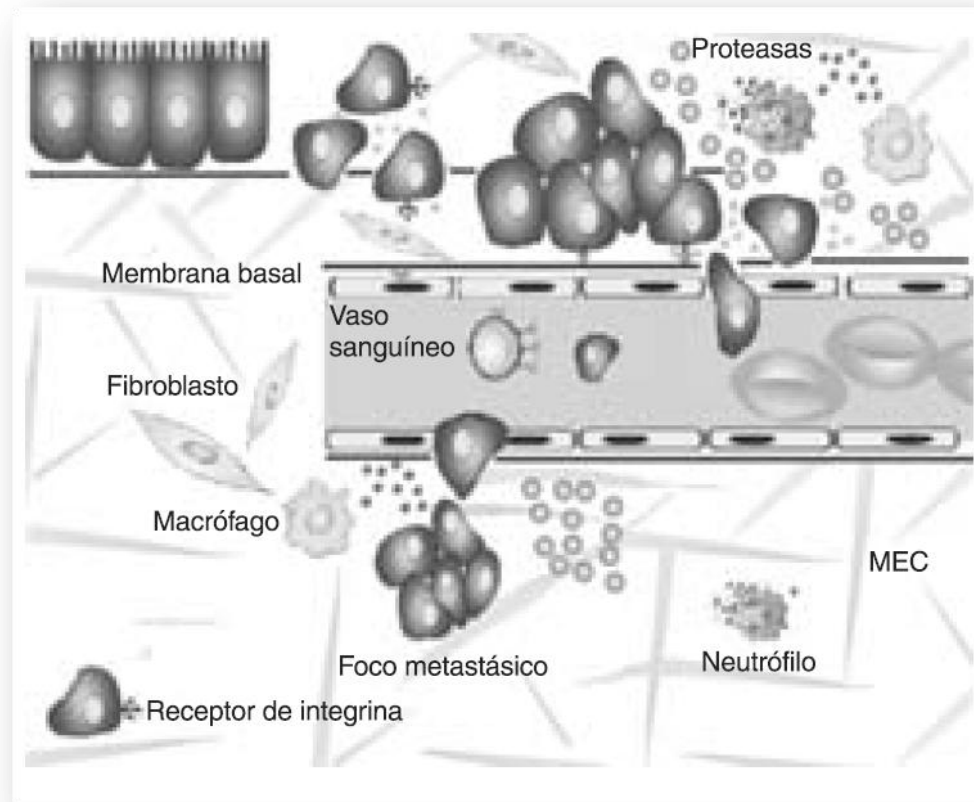


Figura 7. Representación de invasión y metástasis. En la invasión, las células de cáncer migran a tejidos adyacentes a través de la matriz extra celular (MEC) y la membrana basal (MB), proceso favorecido por la acción de las proteasas. Mientras que las metástasis se establecen en órganos distantes. Dentro de los vasos sanguíneos, la mayoría de las células mueren, otras quedan atrapadas en la red capilar de los órganos, principalmente por su tamaño y se enfrentan a diversas fuerzas obstáculos como: factores reológicos, morfológicos, deformación mecánica, ataque inmunológico, etc. En consecuencia se activan mecanismos de supervivencia, muchos de los cuales involucran la expresión y activación de proteasas y finalmente, pocas, llegan a su destino final. El proceso invasión y metástasis ha sido considerado como un fenómeno ineficiente (Tomado de Flores-Reséndiz, 2009).

1.6.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La citología exfoliativa se basa en criterios subjetivos, por lo que se requiere de estrategias que permitan emitir un resultado citológico o histológico objetivo. Aunque existen pruebas moleculares para la detección de VPH, son costosas, complejas y no proporcionan datos sobre la progresión del CaCU y lesiones precursoras, es por ello necesario encontrar biomarcadores menos costosos y de tecnología eficiente con utilidad clínica que permitan establecer diagnósticos más precisos, con implicaciones en el pronóstico y la terapéutica.

1.6.2. OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL:

Hacer un análisis comparativo y sistemático de la expresión de veinte biomarcadores de cáncer por técnicas inmunológicas en líneas celulares de CaCU. Determinar cuáles marcadores moleculares presentan marcaje diferencial entre líneas celulares derivadas de CaCU respecto a otros cánceres.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Definir el patrón de expresión de las proteínas; Rb, p53, p16^{INK4a} y p14^{ARF}, E2F-1, Ciclinas A, B1 y E, MMP-2, 9, 10, 11 y 12, Catepsinas B, D y F, PCNA y Ki-67 y su relación con la expresión de las proteínas virales E6 y E7 de VPH tipos 16 y 18 en líneas celulares de CaCU con y sin VPH-AR.

Evaluación del patrón de expresión de los biomarcadores mencionados por técnicas de inmunocitoquímica (ICQ), inmunofluorescencia (IF) y Western blot.

1.6.3. MATERIAL Y MÉTODOS

1.6.3.1. CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix analizadas en este estudio fueron, HeLa (adenocarcinoma con VPH tipo 18 Human CCL-2,2), SiHa (cáncer epidermoide con VPH tipo 16 Human HTB-35), CaSki (cáncer epidermoide con VPH tipo 16 Human GRL-1550), C-33A (cáncer epidermoide negativo a ADN y ARN de VPH, con una mutación puntual en el codón 273 del gen p53, resultando la substitución Arg>Cys Human HTB-31). Dos líneas celulares derivadas de otros tipos de cáncer y negativas a DNA y RNA de VPH: MCF-7 (cáncer de mama Human HTB-22) y SW480 (adenocarcinoma colorectal con mutación en el codón 273 G>A del gen p53 resultando en una substitución de Arg>His, y una mutación en el codón 309 C>T resultando en la substitución de Pro>Ser CCL-228).

Todas las células se crecieron en una atmosfera húmeda a 37 °C al 5% de CO₂ en medio de cultivo Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM/F12; Gibco BRL, Gaithersburg, MD) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, Gibco BRL, Gaithersburg, MD).

Para el estudio de ICQ la células se crecieron en laminillas de 4 pozos B&D Falcon (Becton&Dickinson Falcon, USA) con una densidad inicial de 250,000 células/500 µl de medio de cultivo por pozo. Para la obtención de extractos totales de proteína, las células fueron cultivadas en cajas de cultivo de 25 cm² con una densidad inicial de 1X10⁶ células/10 ml de medio de cultivo.

1.6.3.2. INMUNOCITOQUÍMICA

Una vez que las líneas celulares cultivadas en las laminillas de 4 pozos alcanzaron el 80% de confluencia se retiró el medio de cultivo y se lavaron 3 veces con PBS pH 7.4, posteriormente las células se fijaron con formaldehído 10% PBS pH 7.4 durante 48 horas. Pasado este tiempo se lavaron dos veces con PBS pH 7.4. La recuperación de los determinantes antigénicos se hizo con el buffer Target Retrieval Solution High pH (DAKO) en una olla de presión (122-125 °C a 15-24 psi) por 20 minutos. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada incubando las células en H₂O₂ 3%. El bloqueo de las proteínas inespecíficas se realizó con una solución bloqueadora de proteínas libre de suero (DAKO, Dinamarca) durante media hora. Los anticuerpos primarios se incubaron toda la noche a 4 °C (Tabla 5). Utilizando el sistema Dako LSAB+System HRP (DAKO). El revelado se llevó a cabo mediante una solución de 3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorado (DAB) (DAKO). Contra tinción con azul de metileno 0.2%. En cada corrida se incluyó un control negativo sin anticuerpo. Se realizaron observaciones microscópicas y análisis de imágenes. Se evaluó la localización intracelular (nuclear, nucleolar o citoplásmico), el número de células (expresado en porcentaje) e intensidad de la reacción débil (+), intermedia (++), intensa (+++) en cinco ocasiones por línea celular, en diez campos a 400 aumentos.

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados en el estudio inmunocitoquímico en diferentes líneas celulares de cáncer

Anticuerpo primario	Dilución	Tipo	Origen
Anti-HPV-E6 16/18 C1P5	1/100	Ratón monoclonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-HPV18-E6 N-17	1/100	Cabra policlonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-HPV16- E7 N-21	1/100	Cabra policlonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-HPV18-E7 N-19	1/100	Cabra policlonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-Rb C-15	1/200	Conejo policlonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-p53 DO-1	1/200	Ratón monoclonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-p16 ^{INK4A} E6H4	1/200	Ratón monoclonal	DAKO, Dinamarca
Anti-p14 ^{ARF} C-18	1/200	Cabra policlonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-E2F-1 C-20	1/200	Conejo policlonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-Ciclina A H-432	1/200	Conejo policlonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-Ciclina E H-145	1/200	Conejo policlonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-Ciclina B1 H-433	1/200	Conejo policlonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-PCNA FL-261	1/200	Conejo policlonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-Ki-67 Ki-S5	1/200	Ratón monoclonal	DAKO, Dinamarca
Anti-MMP-2 K-20	1/200	Cabra policlonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-MMP-9 H-129	1/200	Conejo policlonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-MMP-10 117239	1/200	Ratón monoclonal	R&D, Minneapolis, MN.
Anti-MMP-11 SL3.05	1/200	Ratón monoclonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-MMP-12 4D2	1/200	Ratón monoclonal	R&D, Minneapolis, MN.
Anti-Catepsina B N-19	1/200	Cabra policlonal	Sta. Cruz, Cal.
Anti-Catepsina D Code A0561	1/200	Conejo policlonal	DAKO, Dinamarca
Anti-Catepsina F 237208	1/200	Ratón monoclonal	R&D, Minneapolis, MN

1.6.3.3. INMUNOFLUORESCENCIA CON DOBLE TINCIÓN

Para la IF de doble tinción las células derivadas de cáncer fueron cultivadas en laminillas de 4 pozos, éstas se lavaron dos veces con PBS pH 7.4 y se fijaron con para formaldehído por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron las laminillas con PBS pH 7.4, y las células se permeabilizaron con Tritón X-100 0.2% a 4 °C durante 20 minutos. La recuperación de los determinantes antigénicos se hizo con el buffer Target Retrieval Solution High pH (DAKO) en una olla de presión (122-125 °C a 15-24 psi) por 20 minutos. El bloqueo de las proteínas inespecíficas se realizó con una solución bloqueadora de proteínas libre de suero (DAKO) por 20 minutos. Posteriormente todas las células fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-p16^{INK4A} (Tabla 5) en una dilución 1:100 por 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar las laminillas con PBS, en oscuridad se

incubó durante 1 hora el anticuerpo secundario cabra anti-ratón IgG conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una dilución 1:100 (Sta. Cruz, Cal.), nuevamente se lavó con PBS. Para la doble inmunotinción, las laminillas fueron incubadas con p14^{ARF} (Tabla 5) a una dilución 1:100 por 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron con PBS. Después fueron incubadas por 1 hora con el anticuerpo secundario conejo anti-cabra IgG conjugado con rojo Texas a una dilución de 1:50. Las laminillas se lavaron y se montaron en glicerol (90%), DABCO (diazabicyclo [2.2.2] octano). La microscopia de IF se realizó en un microscopio confocal invertido Zeiss LSM 710 equipado con un laser de escaneo criptón-argón (longitud de onda 488/568 nm). Las imágenes obtenidas de ambos canales (FITC y rojo Texas fueron registradas simultáneamente a idénticas aperturas, en tres ocasiones por línea celular, en 5 campos. La imagen derivada de FITC fue observada como verde fluorescente, mientras que la imagen derivada del rojo Texas fue observada como rojo fluorescente.

1.6.3.4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT

Una vez que las líneas celulares en estudio alcanzaron un 80% de confluencia, se realizó la extracción de proteínas totales en condiciones de frío de la manera siguiente: La monocapa celular se lavó dos veces con PBS pH 7.4, a la que posteriormente se adicionaron 200 µl de buffer de lisis RIPA (3mM tris pH 8, 50 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1% de aprotinina 1mM PMSF) en hielo por 30 minutos. Con un gendarme se raspó la superficie de la caja y se recuperó el lisado celular que también se sónico 5 veces durante un minuto, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos a 4 °C, se colectó el sobrenadante y la cuantificación de las proteínas totales se realizó mediante el método

del Acido Bisinconfílico (BCA) (Pierce, Rockford, IL). Por carril y línea celular 50 μg / 26 μl de extracto total de proteínas fueron calentados a 95 °C durante 5 minutos e inmediatamente puestos en hielo y sujetos a electroforesis SDS-Page (en geles en un intervalo de 7.5% a 15% dependiendo de la proteína) y transferidos en una cámara húmeda fía (180 minutos a 200 mA) a una membrana de nylon-nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Posteriormente las membranas fueron tratadas con una solución bloqueadora de sitios no específicos (PBS pH 7.4, leche en polvo sin grasa 5% y Tween 20 0.1%) por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron los anticuerpos primarios anti-Rb, anti-p16^{INK4A}, anti-p53 y anti p-14^{ARF} a 4 °C (Tabla 5) toda la noche en un rango de diluciones de 1:1000 a 1:10,000. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 20 0.1%) 5 veces por 10 min. Para la detección del complejo proteína-anticuerpo primario las membranas se incubaron (60 minutos a temperatura ambiente) con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con HRP. Después de esta segunda incubación las membranas finalmente fueron lavadas a temperatura ambiente 5 veces con PBS-Tween 20 0.1% por 5 minutos. El revelado de las membranas se hizo por el método de quimioluminiscencia incubándolas primero con luminol por 1 minuto (ECL + Amersham) y después exponiéndolas a una placa de rayos X (Hyperfilm ECL, Amersham) para registrar la reacción de oxido reducción.

1.6.4. RESULTADOS

1.6.4.1. EXPRESIÓN DE Rb, p16^{INK4A}, p53 Y p14^{ARF}

En las líneas celulares de cáncer cervical transformadas por VPH-AR y en la línea celular MCF-7, p53 mostró una reacción positiva débil en el núcleo y el citoplasma de las células ($\leq 4\%$) (Figura 8S, T, U e Y; Tabla 6). En contraste, las líneas celulares C-33A y SW480 mostraron una intensa inmunoreacción en el núcleo y el citoplasma de la mayoría de las células ($> 90\%$) (Figura 8X y Z; Tabla 6). La inmunoreacción de Rb fue positiva débil en el núcleo y el citoplasma en todas las líneas celulares, aunque fue ligeramente mayor en C-33A y MCF-7 (Figura 8M, N, O, P, Q y R; Tabla 6).

La inmunoreacción de p16^{INK4A} fue positiva e intensa en el núcleo y el citoplasma en todas las líneas celulares derivadas de CaCU transformadas por VPH-AR ($> 80\%$) (Figura 8A, B y C; Tabla 6). En la línea celular C-33A, p16^{INK4A} presentó una intensidad variable en su reacción, restringida al citoplasma de la mayoría de las células ($> 80\%$) (Figura 8D; Tabla 6). En las líneas celulares MCF-7 y SW480 no se observó expresión de p16^{INK4A} (Figura 8E y F; Figura 9; Tabla 6). La inmunoreacción de p14^{ARF} fue positiva e intensa, consistentemente en el nucléolo de las células derivadas de CaCU ($\pm 95\%$) incluyendo a la línea celular C-33A (Figura 8G, H, I y J; Tabla 6), mientras que en la línea MCF-7 estuvo ausente y escasamente presente en algunas células de SW480 (Figura 8K y L; Tabla 6). La intensa expresión de p14^{ARF} en la línea C-33A, la cual carece de VPH-AR podría ser debida tanto a las mutaciones del gen p53 en los codones 273 y 245, como a la unión por corte y ensamble alternativo en el exón 20 del gen Rb, que da como resultado la pérdida de ese marco de lectura (Scheffner, 1991).

El porcentaje de células con expresión nuclear/nucleolar de p16^{INK4A} y p14^{ARF} está representado en la Figura 9.

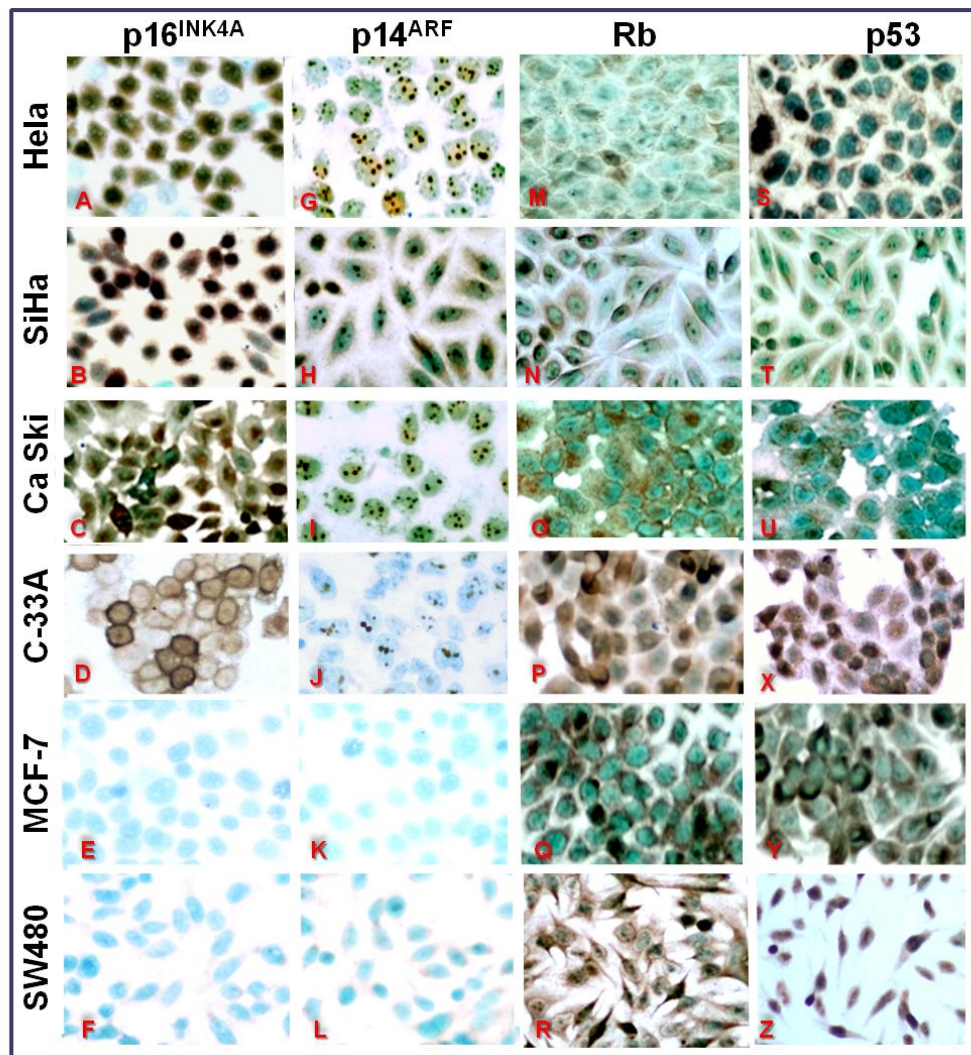


Figura 8. Inmunocitoquímico de las proteínas supresoras de tumores en líneas celulares de cáncer humano. p16^{INK4A} se sobre-expresó en los núcleos y el citoplasma de las líneas celulares transformadas por VPH-AR (A, B y C). En la línea celular C-33A negativa a VPH la expresión de p16^{INK4A} se limitó al citoplasma (D). La expresión de p14^{ARF} se detectó en los nucléolos de las líneas celulares de cáncer de cuello uterino positivas y negativas a VPH (G, H, I y J). Ambos marcadores no fueron expresados en líneas celulares de otros tipos de cáncer (MCF-7 y SW480) (E, F, K y L). La expresión de Rb fue de leve a moderada en núcleos y citoplasma de todas las líneas celulares (M, N, O, P, Q y R). p53 mostró un patrón de expresión similar (S, T, U e Y) con aumento de la expresión e intensidad en las líneas celulares C-33A y SW480 (X y Z) (400x).

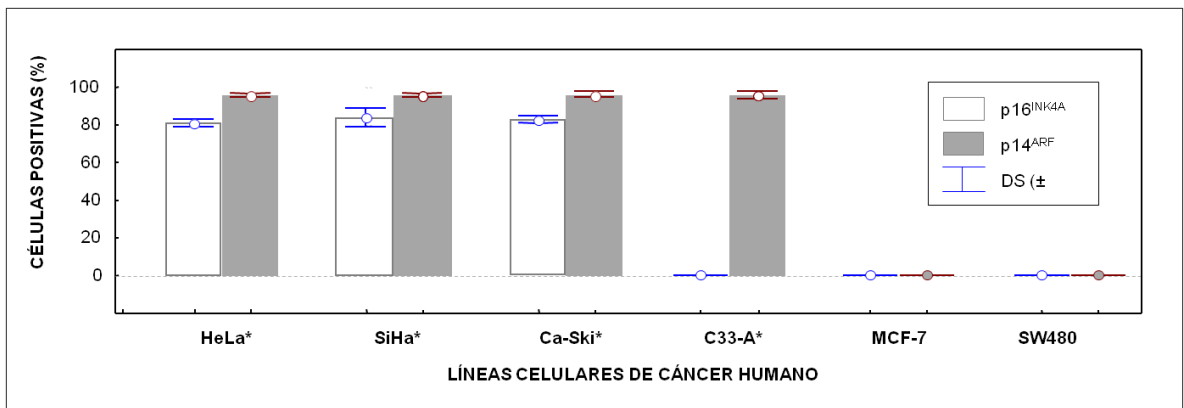


Figura 9. Porcentaje de células positivas en núcleo (p16^{INK4A}) y nucléolo (p14^{ARF}) en líneas celulares de cáncer. p14^{ARF} mostró un mayor porcentaje de positividad que p16^{INK4A} en todas las células derivadas de cáncer de cuello uterino. * p <0,05, Mann-Whitney.

Tabla 6. Proteínas supresoras de tumor y proteínas virales

	HeLa	SiHa	Ca Ski	C-33A	MCF-7	SW480
p53	N++ (2.4)	N++ (2.6)	N++ (2.6)	N+++ (92.2)	N++ (3.2)	N+++ (91.2)
Rb	N+ (2.6)	N+ (2.8)	N+ (2.8)	N+ (9.0)	N+ (5.2)	N+ (4.2)
p16 ^{INK4A}	N&C+++ (81.2)	N&C+++ (83.8)	N&C+++ (83.2)	C++ (85.4)	ND	ND
p14 ^{ARF}	NI+++ (96.0)	NI+++ (95.8)	NI+++ (96.4)	NI+++ (96.4)	ND	ND
E6	N&C++ (82.6)	N&C++ (81.8)	N&C++ (81.8)	ND	ND	ND
E7	N&C++ (84.2)	N&C++ (84.8)	N&C++ (86.2)	ND	ND	ND

Expresión de p53, Rb, p16^{INK4A}, p14^{ARF}, E6 y E7, en líneas celulares de cáncer
 ND: No detectado; N: núcleo; NI: nucléolo; C: citoplasma
 Los numerous entre paréntesis () indica porcentaje de células positivas en 10 campos.
 Intensidad de reacción: baja +, intermedia ++, alta +++.

La IF de doble tinción para p16^{INK4A} y p14^{ARF} demostró claramente la co-expresión de estas proteínas en el núcleo de las líneas celulares derivadas de CaCU transformadas por VPH-AR. En el caso de la línea celular C-33A, p16^{INK4A} estuvo ausente del núcleo observándose únicamente en citoplasma, mientras que p14^{ARF} se observó en nucléolo al igual que en las líneas derivadas de CaCU con VPH-AR. Es claro que solamente p16^{INK4A} y p14^{ARF} fueron marcadores diferenciales de células derivadas de CaCU transformadas por VPH-AR que consistentemente se co-expresan en el núcleo de esas células. La Figura 10 muestra una imagen representativa de este patrón de co-expresión descrito en células SiHa y C-33A.

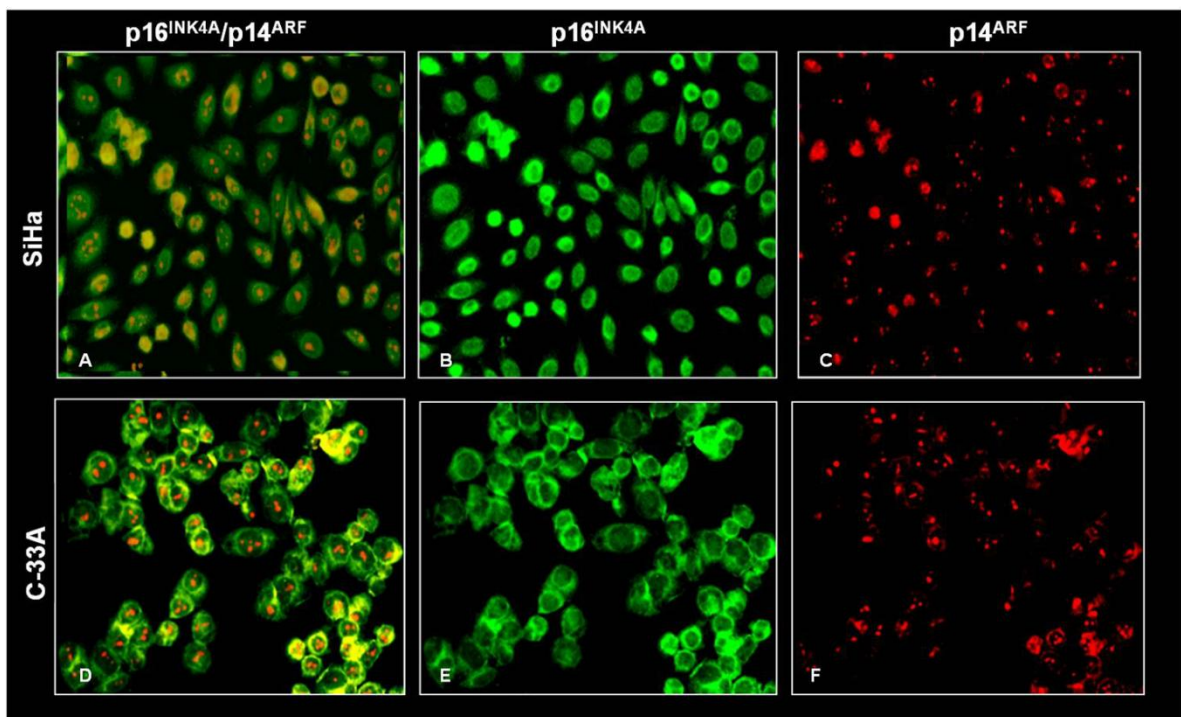


Figura 10. Inmunofluorescencia de doble tinción para p16^{INK4A} y p14^{ARF}. p16^{INK4A} y p14^{ARF} co-expresan en las células SiHa (VPH-16) (A). p16^{INK4A} fue predominantemente nuclear (B), mientras que p14^{ARF} se encuentra exclusivamente en nucléolos (C). Co-expresión de p16^{INK4A} y p14^{ARF} en células C-33A (D), p16^{INK4A} estuvo presente en el citoplasma, pero totalmente ausente de los núcleos (E), mientras que p14^{ARF} se observó exclusivamente en los nucléolos (F).

El análisis semicuantitativo por Western blot de los niveles de expresión de las proteínas Rb, p16^{INK4A}, p53 y p14^{ARF} demostró bajos niveles de expresión de las proteínas Rb y p53 en las líneas celulares derivadas de CaCU con VPH-AR, mientras que la línea C-33A mostró bajos niveles de expresión de Rb, pero altos niveles de p53. La línea celular MCF-7 también mostró bajos niveles de expresión de estas proteínas. En la línea SW480 se observaron bajos niveles de expresión de Rb, pero altos de p53. En relación a los niveles de expresión de p16^{INK4A} y p14^{ARF} en los extractos totales de proteína, que incluye al núcleo y al citoplasma, fueron altos en todas las líneas celulares derivadas de CaCU, incluyendo a C-33A, mientras que las células cancerosas que no provienen del cérvix uterino no mostraron la expresión de estas proteínas (Figura 11).

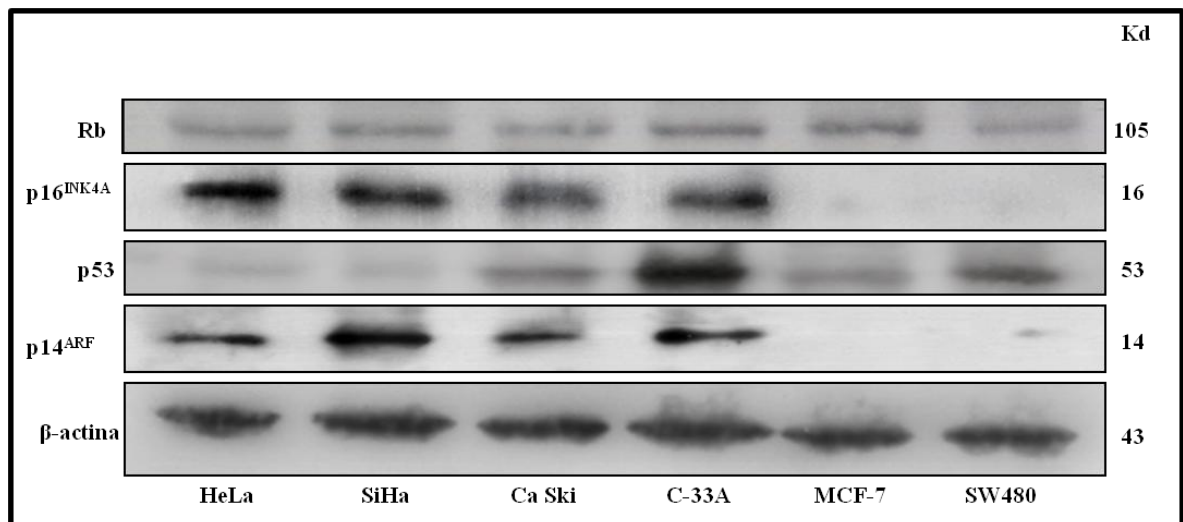


Figura 11. Expresión de las proteínas supresoras de tumores en líneas celulares de cáncer humano analizados por Western blot. Las proteínas supresoras de tumor se visualizaron utilizando anticuerpos específicos (que se resumen en la Tabla 5). p16^{INK4A} y p14^{ARF} estuvieron presentes en todas las células de cáncer de cuello uterino y ausentes en las líneas celulares de cáncer diferente al de cuello uterino. La expresión de Rb y p53 fue de leve a moderada en todas las líneas celulares, mostrando mayores niveles de p53 en las líneas celulares C-33A y SW480. β-actina se utilizó como control interno de carga.

1.6.4.2. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES

Las proteínas virales E6 y E7 del VPH tipos 16 y 18 mostraron inmunoreacción positiva moderada principalmente en citoplasma de > del 80% de las células de cáncer con VPH-AR, es decir en las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki. En las líneas celulares C-33A, SW480 y MCF-7 sin VPH-AR no se observó reacción alguna (Tabla 6).

1.6.4.3. EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN E2F Y DE LAS PROTEÍNAS DE REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

La expresión de E2F-1 fue intensa en el núcleo y citoplasma en > del 85% de las células de todas las líneas celulares, al igual que para las ciclinas, aunque en porcentajes diferentes (> 35% para las ciclinas A y B1; > 85% para la ciclina E) (Tabla 7).

1.6.4.4. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

La expresión de ambas proteínas de proliferación celular; PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) y Ki-67 fue intensa en el núcleo y nucléolo, respectivamente, en todas las líneas celulares en > 90% de las células (Tabla 7).

Tabla 7. Factor de transcripción E2F-1 , proteínas de regulación del ciclo celular y de proliferación celular

	HeLa	SiHa	Ca Ski	C-33A	MCF-7	SW480
E2F-1	N&C+++ (88.4)	N&C+++ (86.4)	N&C+++ (89.8)	N&C+++ (87.4)	N&C+++ (88.4)	N&C+++ (86.4)
Ciclina A	N&C+++ (35.4)	N&C+++ (36.2)	N&C+++ (35.8)	N&C+++ (35.6)	N&C+++ (37.6)	N&C+++ (36.0)
Ciclina B1	N&C+++ (38.0)	N&C+++ (37.0)	N&C+++ (38.4)	N&C+++ (36.6)	N&C+++ (38.2)	N&C+++ (37.6)
Ciclina E	N&C+++ (89.4)	N&C+++ (89.2)	N&C+++ (89.4)	N&C+++ (87.0)	N&C+++ (86.4)	N&C+++ (85.2)
PCNA	N+++ (96.0)	N+++ (95.6)	N+++ (95.8)	N+++ (94.8)	N+++ (95.4)	N+++ (95.4)
Ki-67	NI+++ (90.4)	NI+++ (93.2)	NI+++ (95.0)	NI+++ (93.8)	NI+++ (93.6)	NI+++ (94.6)

Expresión del factor de transcripción E2F-1, proteínas de regulación del ciclo celular y proteínas de proliferación celular
N: núcleo; NI: nucléolo; C: citoplasma
Los números entre paréntesis () indica porcentaje de células positivas en 10 campos
Intensidad de reacción: baja +, intermedia ++, alta +++.

1.6.4.5. EXPRESIÓN DE METALOPROTEASAS Y CATEPSINAS

La expresión de las metaloproteasas (MMP) 9 y 11 (intensa y débil, respectivamente) se observó en el citoplasma de la mayoría de las células (>90%) en todas las líneas celulares de cáncer. La expresión de las MMP 2 y MMP 10 fue positiva débil en el citoplasma de la mayoría de las células (> 90%) de todas las líneas celulares, con excepción de la línea C-33A donde fue ausente. La expresión de la MMP 12 fue negativa en todas las líneas celulares consideradas en este trabajo (Tabla 8). La expresión positiva de las Catepsinas B, D y F fue observada en el citoplasma de casi todas las células (> 90%) en todas las líneas celulares. La intensidad de reacción fue alta para la Catepsina D y débil para las Catepsinas B y F (Tabla 8).

Tabla 8. Metaloproteasas y Catepsinas

	HeLa	SiHa	Ca Ski	C-33A	MCF-7	SW480
MMP-2	C+ (93.8)	C+ (93.6)	C+ (92.0)	ND	C+ (95.8)	C+ (92.8)
MMP-9	C+++ (92.8)	C+++ (95.0)	C+++ (92.6)	C+++ (93.6)	C+++ (95.0)	C+++ (91.0)
MMP-10	C+ (93.0)	C+ (93.2)	C+ (95.6)	ND	C+ (93.2)	C+ (92.8)
MMP-11	C+ (91.4)	C+ (94.4)	C+ (93.8)	C+ (94.0)	C+ (94.0)	C+ (93.6)
MMP-12	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Catepsina B	C+ (95.0)	C+ (93.4)	C+ (92.4)	C+ (92.8)	C+ (95.6)	C+ (92.2)
Catepsina D	C+++ (93.4)	C+++ (93.8)	C+++ (93.4)	C+++ (93.4)	C+++ (94.0)	C+++ (93.6)
Catepsina F	C+ (93.2)	C+ (93.0)	C+ (92.8)	C+ (92.2)	C+ (93.6)	C+ (94.4)

Expresión de proteasas en líneas celulares de cáncer
 C: citoplasma; ND: no detectado
 Los números entre paréntesis () indica porcentaje de células positivas en 10 campos
 Intensidad de reacción: baja +, intermedia ++, alta +++.

1.6.5. DISCUSIÓN

Se ha discutido en los últimos años sobre la conveniencia del empleo de las líneas celulares en la investigación del cáncer. Lo que es un hecho es que las líneas celulares representan un recurso muy importante en el estudio de los cambios celulares observados en ciertos estadios fisiológicos y patológicos. En el estudio del cáncer, se realizan importantes esfuerzos para correlacionar el conocimiento obtenido de las líneas celulares derivadas de cánceres humanos con los cambios observados en las células de cáncer in vivo. Tomando en cuenta las diferencias entre estos dos tipos de células, las similitudes entre ellas son suficientes como para entender que operan los mismos mecanismos patogénicos (Sharma, 2010).

La abundante literatura en relación al uso de p16^{INK4A} como un marcador “específico” de la infección y transformación por el VPH-AR del cérvix uterino, se ha realizado tanto en células como en tejidos, datos que han contribuido a destacar la importancia de validar el empleo de este biomarcador en la clínica (Tsoumpou, 2009; Kurshumliu, 2009). Es sorprendente la poca atención que se le ha dado al significado de la expresión de p14^{ARF} como un biomarcador para cánceres asociados a VPH-AR, pues se sabe que esta proteína se sobre-expresa en respuesta a un estímulo oncogénico que puede ser de naturaleza viral (Harris, 2005). Nuestros resultados indican que, entre las diferentes proteínas estudiadas, solamente p16^{INK4A} y p14^{ARF} marcan diferencialmente células de cáncer cervical transformadas por VPH-AR. Como se esperaba, fue evidente que las proteínas asociadas a proliferación celular como PCNA y Ki-67 estuvieron presentes en todas las líneas celulares. No observamos diferencias en la intensidad de la reacción y localización de estos marcadores entre líneas celulares de cáncer transformadas por VPH-AR y la que son negativas a VPH. La proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) se une al ADN durante la fase S en cualquier célula en ciclo. Ki-67 es también una proteína asociada a proliferación celular, que se sobreexpresa durante la síntesis de ADN. Por lo tanto la presencia de ambas proteínas en todas las líneas celulares solamente es una indicación de proliferación y no distinguen entre células de cáncer transformadas con o sin VPH-AR. Hay, sin embargo, algunos reportes que proponen a PCNA como un marcador para el diagnóstico citológico e histológico de CaCU asociado a VPH-AR y de la progresión de la enfermedad (Branca, 2007). Otros estudios han usado a Ki-67 como un marcador en combinación con p16^{INK4A}, sin embargo la especificidad no es mejorada significativamente (Galgano, 2010).

Aún cuando la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 solamente se observó en las líneas celulares derivadas de CaCU con VPH-AR (Tabla 6), debe mencionarse que su expresión fue difícil de detectar. En relación a este punto, aún cuando existen anticuerpos disponibles comercialmente o los investigadores elaboren sus anticuerpos contra E6 y E7, en varios trabajos se han descrito dificultades en la detección de estas oncoproteínas, las explicaciones van desde la inestabilidad química, inhibición de su síntesis y/o degradación de éstas (Vaeteewoottacharn, 2005; Wise-Draper, 2008). En nuestra experiencia el empleo de las proteínas E6 y E7 como marcadores en ICQ o IHQ es de difícil reproducibilidad, por lo que no son marcadores adecuados en clínica. Por otro lado, p53 mostró una reacción positiva débil en las líneas celulares derivadas de CaCU con VPH-AR y en MCF-7, mientras que Rb tuvo una reacción positiva de débil a moderada en todas las líneas celulares, por lo que estos marcadores no parecen distinguir entre líneas de cáncer transformadas por VPH de las que carecen de VPH, pero sí entre las que tienen mutaciones en p53, tal es el caso de las líneas celulares C-33A y SW480. En las líneas celulares de CaCU con VPH, la baja expresión de p53 y Rb se atribuyó a que estas son degradadas por E6 y E7, respectivamente (Syrjänen, 2005; zur Hausen, 2009). En conclusión las proteínas p53 y Rb no pueden ser empleadas como marcadores de células de CaCU transformadas por VPH-AR.

Aún cuando las proteasas participan de forma significativa en los procesos de invasión y metástasis, no todas las proteasas están sobre-expresadas en la mayoría de los tejidos con cáncer. Las MMP y las Catepsinas han sido extensamente estudiadas en el CaCU asociado a VPH-AR con la finalidad de descubrir algún patrón de expresión o su utilidad como marcadores, los resultados obtenidos hasta la fecha son controversiales (Vázquez-Ortiz,

2005; Schröpfer, 2010; Utrera-Barillas, 2000). En nuestro estudio no encontramos un patrón de expresión característico y no observamos diferencias de expresión entre las líneas celulares positivas a VPH-AR de las negativas a VPH-AR.

Nuestros resultados claramente mostraron que solamente p16^{INK4A} y p14^{ARF} fueron consistentemente expresados en las líneas celulares de CaCU positivas VPH-AR. Ha sido bien establecido que la sobreexpresión del inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas p16^{INK4A} resulta de la liberación del factor de transcripción E2F-1 a causa de la inactivación de Rb por la oncoproteína E7. Hasta el momento, una gran cantidad de estudios ICQ e IHQ en CaCU han demostrado alta sensibilidad y especificidad de p16^{INK4A} como marcador de lesiones pre-malignas y malignas en células y tejidos de cérvix con VPH (Klaes, 2001; Tsoumpou, 2009). Hay, sin embargo, otros reportes que han emitido serias dudas sobre la especificidad de p16^{INK4A} como marcador subrogado (Trunk, 2004; Tsoumpou, 2009). Otro punto de debate es su localización intracelular. La interpretación inmunocitoquímica de la tinción para p16^{INK4A} con el método de peroxidasa varía de un estudio a otro. Algunos estudios consideran que la tinción en el núcleo/citoplasma es positiva, mientras que otros estudios postulan que solamente la tinción nuclear en las células cervicales con VPH-AR debe considerarse positiva (Kurshumliu, 2009; Murphy, 2003). Nosotros no encontramos ninguna razón que fundamente o explique porque una u otra localización deba considerarse positiva. En nuestro estudio, p16^{INK4A} consistentemente fue localizado en el núcleo y citoplasma de las células de cáncer cervical, excepto en la línea C-33A, en la que exclusivamente se localizó en el citoplasma. Este fenómeno podría arrojar algo de luz sobre los mecanismos responsables de su ubicación intracelular. p16^{INK4A} debe estar enlazado al ADN para ejercer su acción y se transporta desde el citoplasma al núcleo por

las proteínas chaperonas. Podría inferirse que en la línea C-33A el mecanismo de transporte de p16^{INK4A} al núcleo por las proteínas chaperona está dañado (Evangelou, 2004). Por lo tanto, es posible que la localización en el citoplasma no deba ser tomada como una reacción positiva para p16^{INK4A}, ya que no es transportado al núcleo donde ejerce su acción. p14^{ARF} estuvo presente de forma consistente en el nucléolo de todas las células de CaCU. No encontramos expresión de esta proteína en otras líneas de cáncer. Algunos estudios han sugerido que p14^{ARF} podría ser un marcador subrogado para cáncer cervical, después de p16^{INK4A} (Bulten, 2006; Feng, 2007). p14^{ARF} es codificado por los exones 1β, 2 y 3 del cromosoma humano 9p21, p16^{INK4A} comparte los exones 2 y 3 en un marco alternativo de lectura (Stott, 1998). p14^{ARF} puede detener el ciclo celular en G1/S y G2/M dependiente de p53, su expresión se incrementa después de un estímulo oncogénico con desregulación del ciclo celular. En una variedad de cánceres humanos, las mutaciones puntuales, la hipermetilación del promotor y las deleciones de p16^{INK4A} y p14^{ARF} son frecuentes. En el CaCU, las mutaciones puntuales, la hipermetilación del promotor y las deleciones, usualmente están ausentes y la sobre-expresión de p16^{INK4A} y p14^{ARF} siempre se observa (Sharpless, 2005; Feng, 2007).

La oncoproteína E7 del VPH-AR al unirse a la proteína Rb la lleva a su inactivación, en consecuencia ocurre la liberación del factor de transcripción E2F-1, que en su momento activa la transcripción de p16^{INK4A} y p14^{ARF}, entre otras proteínas. La sobreexpresión de p14^{ARF} también puede ser atribuible a la inactivación funcional de la proteína p53 por la degradación de la oncoproteína E6 de los VPH-AR (Figura 6). Sin embargo, es probable que los diferentes tipos y variantes de VPH-AR tengan una diferente expresión de p16^{INK4A} y p14^{ARF}. En el estudio que en otro capítulo presentaremos, demostraremos que la

transfección de E7 y de las variantes de E6 del VPH-18 a células MCF-7 afecta significativamente la expresión de p14^{ARF}.

Por IF de doble tinción, las proteínas p16^{INK4A} y p14^{ARF} exclusivamente fueron detectadas de forma simultánea en el núcleo de las líneas celulares derivadas de CaCU con VPH-AR, pero no en las células C-33A, las cuales mostraron ausencia de p16^{INK4A} en el núcleo, por el contrario p14^{ARF} se detectó intensamente positiva en el núcleo. La co-expresión en el núcleo de células derivadas de CaCU con VPH-AR de estas dos proteínas señala la posible utilización combinada de p16^{INK4A} y p14^{ARF} como marcadores específicos de CaCU asociado a VPH-AR. La presencia en el citoplasma de p16^{INK4A} en las células C-33A no debe tomarse como tinción positiva, por lo tanto, nosotros estamos de acuerdo con los autores que consideran solamente la tinción nuclear como positiva para p16^{INK4A}. Ya que p14^{ARF} está siempre localizado en el nucléolo su marca positiva no presenta problemas para identificarla.

Aún cuando se ha informado que p14^{ARF} está sobre-expresado en lesiones cancerosas y precancerosas del cérvix uterino, los estudios son pocos y el número de muestras clínicas no es lo suficiente como para ponerse de acuerdo sobre su utilidad como un marcador fiable (Bulten, 2006; Feng, 2007). Por el contrario, p16^{INK4A} ha sido el tema de muchas investigaciones, pero desafortunadamente no se ha alcanzado un consenso general sobre su utilidad como un marcador para lesiones precancerosas y cancerosas (Tsoumpou, 2009; Kurshumliu, 2009). Una combinación de marcadores se ha sugerido como el mejor enfoque para el diagnóstico clínico de las lesiones precancerosas y cancerosas del cuello uterino (Malinowski, 2007; Tsoumpou, 2009, Pinto, 2012).

1.6.6. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados mostraron que p16^{INK4A} y p14^{ARF} se co-expresan en el núcleo (núcleo y nucléolo, respectivamente) de las líneas celulares derivadas de CaCU transformadas por VPH. Podemos concluir que p16^{INK4A} y p14^{ARF} podrían ser utilizados en combinación como marcadores complementarios, ya que presentan marcaje diferencial entre líneas celulares derivadas de CaCU y otros cánceres. Además, estudios adicionales en muestras de células y tejidos de carcinomas cervicales deberán ser realizados para confirmar la validez de estos marcadores.

1.6.7. PERSPECTIVAS: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE p16^{INK4A} Y p14^{ARF} EN CITOLOGÍAS Y CORTES HISTOLÓGICOS DE CÁNCER CERVICOUTERINO

Se realizó un estudio de la expresión de p16^{INK4A} y p14^{ARF} en muestras citológicas y cortes histológicos cervicales provenientes de pacientes con CaCU invasor, positivos a VPH-16 y se encontró que ambos biomarcadores se expresan de manera similar a la observada en las líneas celulares derivadas CaCU con VPH (Figura 12).

En vista de los resultados satisfactorios de este estudio preliminar, nos proponemos realizar un estudio sistemático con material clínico para confirmar la utilidad de p16^{INK4A} y p14^{ARF} como marcadores moleculares para el diagnóstico de CaCU.

Reacción inmunológica para p14^{ARF} y p16^{INK4A} en CaCU invasor VPH-16

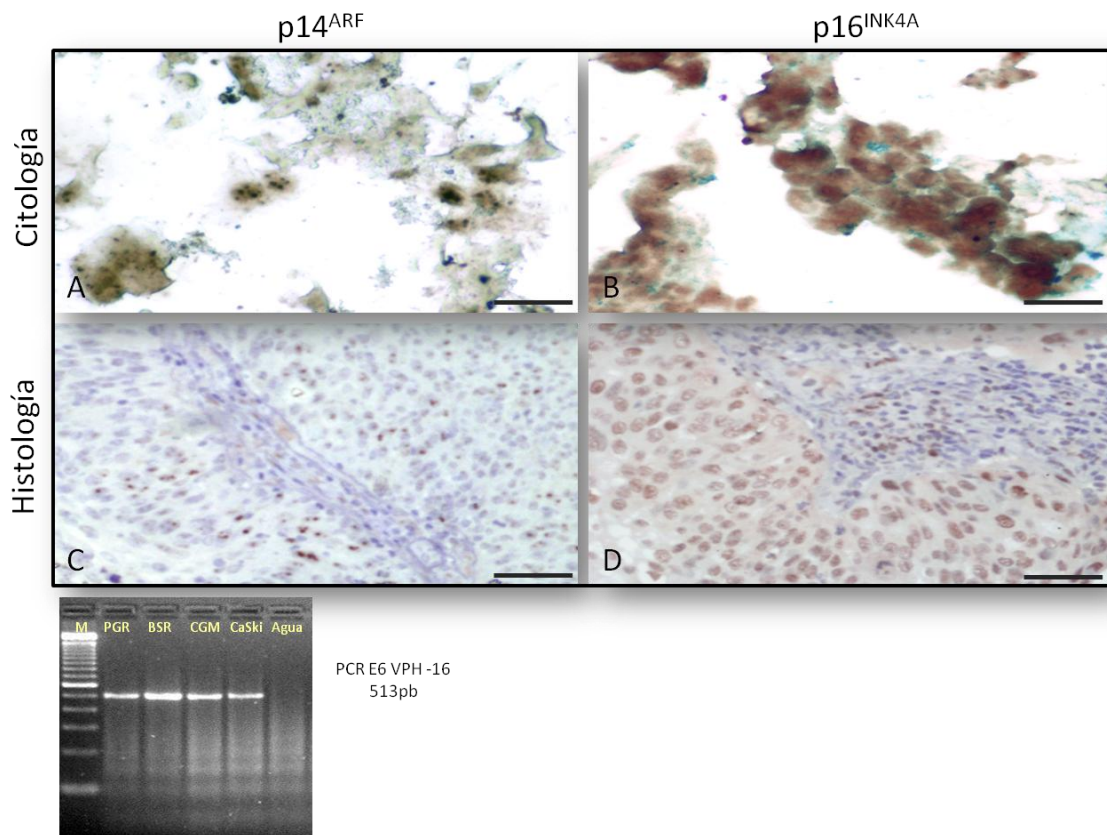


Figura 12. Inmunodetección de p14^{ARF} y p16^{INK4A} en muestras citológicas e histológicas de CaCU invasor asociado a infección por VPH-16. Citología (A) e histología (C) en las que se observa que p14^{ARF} se expresa exclusivamente en los nucléolos. Citología (B) e histología (D) en las que se observa que p16^{INK4A} se expresa en el núcleo y citoplasma de las células neoplásicas. Por PCR de punto final se confirmó la presencia de VPH-16. Escala= 50 μ m.

Es importante considerar que la gran mayoría de las muertes por CaCU en todo el mundo ocurren en mujeres que nunca han sido examinadas, por lo que nos proponemos diseñar un kit o tira diagnóstica con los biomarcadores idóneos para su detección en líquido vaginal obtenido por auto-toma.

1.7. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE p14^{ARF} EN CELULAS TRANSFECTADAS CON E7 Y VARIANTES DE E6 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 18

El papel del VPH-AR en la patogénesis del CaCU se ha establecido firmemente (zur Hausen, 2009). Los mecanismos moleculares que intervienen en la transformación maligna inducida por estos virus han sido ampliamente estudiados, en particular con respecto al efecto de las oncoproteínas E6 y E7, que son necesarias para el desarrollo de lesiones precursoras y el mantenimiento del fenotipo maligno (Moody, 2010). Ambos efectos se consiguen mediante los mecanismos que implican el bloqueo de la función de p53, p14^{ARF}, Rb y p16^{INK4A}. La oncoproteína E7 del VPH-AR al unirse a la proteína Rb la lleva a su inactivación, en consecuencia ocurre la liberación del factor de transcripción E2F-1, que en su momento activa la transcripción de p16^{INK4A} y p14^{ARF}, entre otras proteínas. La sobreexpresión de p14^{ARF} también puede ser atribuible a la inactivación funcional de la proteína p53 por la degradación de la oncoproteína E6 de los VPH-AR (Figura 5) (zur Hausen, 2008). p16^{INK4A} se ha utilizado como un marcador específico de células transformadas por VPH-AR y ha sido objeto de una amplia aplicación en la citología e histopatología. Se ha informado de que su sensibilidad es cercana a 92%. Hay, sin embargo, otros informes que indican que su especificidad es bastante baja en lesiones de difícil clasificación, que varía entre 63,2% y 71,1% en el ASCUS (p <.001) y L-SIL (p <0,001), respectivamente (Denton, 2010). Otro marcador molecular objeto de estudio es p14^{ARF} que, de hecho, se origina en un marco de lectura alternativo de CDKN2A, gen que también codifica para p16^{INK4A} (Bulten, 2006). Aunque p14^{ARF} ha sido menos estudiada que p16^{INK4A} y no se ha usado rutinariamente para citología y/o estudios histopatológicos, se sabe que es tan sensible como (y, probablemente, más específica que) p16^{INK4A} para la detección de células

transformadas por VPH-AR (Kanao, 2004; Bulten, 2006). p14^{ARF} se limita a los núcleos y nucléolos de las células transformadas por VPH y se co-expresa con p16^{INK4A}. También se ha sugerido que la detección simultánea de ambos marcadores podría aumentar aún más la sensibilidad y especificidad del diagnóstico citológico e histológico de CaCU (Bulten, 2006; Vázquez-Vega, 2010-2011).

Se sabe que la expresión p14^{ARF} es regulada negativamente por p53 (Stott, 1998) y el complejo Rb/E2F (James, 2000). A su vez, la degradación de p53 y Rb es controlada principalmente por las oncoproteínas E6 y E7, respectivamente (Moody, 2010). Hay circunstancias que podrían modificar la expresión de p14^{ARF} en las células infectadas con VPH-AR, tales como el tipo y la variante de la infección por VPH, por ello es probable que los diferentes tipos y variantes de los VPH-AR tengan una diferente expresión de p16^{INK4A} y p14^{ARF}.

El VPH-18 tiene tres variantes filogenéticas: Africana (Af), Europea (E) y Asiático-Amerindia (AsAi). Cada variante tiene una diferente distribución étnico-geográfica y muestran variaciones en la constitución molecular del gen E6 y, en consecuencia, en las relaciones de la expresión E6/E6*. E6* es el producto de corte y ensamble alternativo de E6 (Ong, 1993) y, paradójicamente, protege a p53 de la degradación inducida por E6 (Pim, 1997). Algunos autores atribuyen un efecto distinto sobre la degradación de p53 directamente a las diferencias en la constitución molecular del gen E6, características de cada variante de VPH (Stöppler, 1996). Sin embargo, este efecto directo de las variantes de E6 no fue confirmado por De la Cruz-Hernández y colaboradores (2005), quienes, en cambio, atribuyen los distintos efectos antes mencionados a las diferencias en los niveles de transcripción E6/E6*.

La hipótesis es que estas diferencias en la relación de E6/E6* podrían modificar la expresión p14^{ARF}, posiblemente a través de las variaciones en la degradación de p53 que se ha demostrado se producen con cada una de las tres variantes. E7, a través de la inducción alterada de la expresión de p53 (Bates, 1998), también podría influir en la expresión p14^{ARF}.

1.7.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Un agente común causante de CaCU es el virus del papiloma humano tipo 18 (VPH-18) con sus tres variantes filogenéticas: Asiático-Amerindia (AsAi), Europea (E) y Africana (Af). Cada variante muestra diferencias significativas en el gen E6, mientras que en la composición genética del gen E7 no hay cambios significativos. Las oncoproteínas E6 y E7 son reguladores negativos de las proteínas p53 y Rb, por lo que, indirectamente regulan la expresión de los supresores de tumores p14^{ARF} y p16^{INK4A}. De tal forma sería interesante diseccionar el papel que tienen E7 y las variantes de E6 del VPH-18 en la regulación de la expresión de p14^{ARF}, dada la complejidad de las variables que deben ser consideradas para la validación de biomarcadores como herramientas de diagnóstico.

1.7.2. OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de variantes de E6, E6 * y E7 del VPH-18 en la expresión de p14^{ARF} y p53. Para lograr este objetivo, células de la línea MCF-7 (derivadas de cáncer de la mama), que expresan el tipo silvestre (wt) de las proteínas p53 y Rb, pero no expresan la proteína p14^{ARF} (aún cuando poseen el gen funcional en el locus

correspondiente), se transfectaron con variantes de E6 (AsAi, E y Af), E6* y el gen E7. La evaluación se realizó por RT-PCR y técnicas inmunológicas.

1.7.3. MATERIAL Y MÉTODOS

1.7.3.1. CULTIVOS CELULARES Y TRANSFECCIÓN DE LAS VARIANTES E6 Y E6*

Células de la línea MCF-7 (derivadas de cáncer de la mama) se cultivaron hasta el 80% de confluencia en DMEM-F12 (Gibco BRL, Grand Island, NY) suplementado con SFB al 10% bajo condiciones estándar. Estas células fueron transfectadas con el ORF (open reading frame) de E6 (nt 105-581) de las variantes del VPH-18 AsAi (clona de referencia), E (T18-9), AF (T18-8) y E6 * (nt 100-228 del E6 de la clona de referencia) usando el vector de expresión pcDNA 3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) que contienen un promotor de CMV y los genes de resistencia a G418 (geneticina) (todos los plásmidos fueron amablemente proporcionados por el Dr. de la Cruz Hernández). Como control negativo se emplearon células MCF-7 transfectadas con el vector vacío (pcDNA 3.1 sin secuencias E6 HPV-18).

Las células MCF-7 fueron transfectadas con 4 µg de ADN utilizando el sistema de Lipofectamina 2000-plus (Gibco) y se cultivaron en placas seis pozos. La transfección del plásmido pcDNA3.1 con GFP (proteína verde fluorescente) (Invitrogen) se usó como un control para comprobar la eficacia de transfección que fue > 85% en todos los casos. Para la selección de clones estables, 24 horas después de la transfección se inició tratamiento con G418 a 0,8 mg ml⁻¹ en DMEM-F12 durante 3 semanas. Un mes después de la transfección, las células se cosecharon y se sometieron a la extracción de ARN para evaluar el patrón de transcripción de los genes E6 y E6 * a través de la RT-PCR.

1.7.3.2. CO-TRANSFECCIÓN CON EL GEN E7 DE VPH-18

Células MCF-7 fueron transitoriamente transfectadas con el ORF de E7 de VPH-18 clon de referencia (nt 590-907) (Ong, 1993), utilizando el vector de expresión gWiz (Amsbio, Abingdon, UK) que contiene un promotor de CMV sin genes de resistencia a G418. Como control negativo se emplearon células MCF-7 transfectadas con el vector vacío (gWiz sin secuencias E7 HPV-18). Las células fueron transfectadas con 4 µg utilizando el sistema de Lipofectamina 2000-plus (Gibco) y se cultivaron en placas de seis pozos.

En paralelo, células MCF-7 previamente transfectadas con las variantes de E6 del VPH-18 (AsAi, E y Af) y E6* fueron co-transfectadas con el gen E7, siguiendo el método similar al usado para la transfección del gen E6. La transfección del plásmido gWiz con RFP (proteína rojo fluorescente) se usó como un control para comprobar la eficacia de transfección que fue > 85% en todos los casos. La permanencia de los genes transfectados en células MCF-7 se evaluó por RT-PCR en 48, 72 y 96 horas después de la co-transfección. La transfección transitoria de E7 se realizó con el fin de analizar y diferenciar claramente los efectos atribuibles a la transfección estable de E6 sobre el proceso de transcripción de E6, así como de p14^{ARF} y la expresión de p53.

1.7.3.3. EVALUACIÓN DEL PATRÓN TRANSCRIPCIONAL DE E6 Y E7 POR RT-PCR

Las células experimentales y control fueron sometidos a extracción de ARN total mediante el sistema de RNAeasy (Invitrogen) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. Los ARN aislados adicionalmente se trataron con DNasa para asegurar la

eliminación completa de ADN contaminante. Las mediciones cuantitativas y la evaluación de la pureza de las muestras de ARN se llevaron a cabo utilizando técnicas espectrofotométricas. Se determinó que el ARN era de buena calidad mediante la migración de las muestras en geles de agarosa al 1,5%, que se visualizaron con bromuro de etidio. La síntesis del ADN complementario (ADNc) se obtuvo por RT-PCR (Superscript Invitrogen), utilizando 1 µg g de ARN total. El ADNc obtenido se utilizó para determinar el patrón de transcripción de las células transfectadas con las variantes de E6 y E7 del VPH-18 en células MCF-7 usando los siguientes cebadores específicos para la amplificación por PCR de E6:

5 'GGGGG**GATCC**ATGGCGCGCTTTGAAGATCCAACA,

3'GGGG**AATTCTT**ATACTTGTGTTTCTCTGCGTCG;

Para amplificar por PCR a E7:

5'GGGGG**GATCC**ATGCATGGACCTAAGGCAACATTG y

3'GGGG**AATTCTT**ACTGCTGGGATGCACACCACG.

1.7.3.4. EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE p53 Y p14^{ARF} POR WESTERN BLOT

De las células MCF-7 control y de las transfectadas, después de alcanzar un 80% de confluencia, se realizó la extracción de proteínas totales en condiciones de frío de la manera siguiente: La monocapa celular se lavó dos veces con PBS pH 7.4, a la que posteriormente se adicionaron 200 µl de buffer de lisis RIPA (3mM tris pH 8, 50 mM NaCl,

0.5% Nonidet P-40, 1% de aprotinina 1mM PMSF) en hielo por 30 minutos. Con un gendarme se raspó la superficie de la caja y se recuperó el lisado celular que también se sónico 5 veces durante un minuto, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C, se colectó el sobrenadante y la cuantificación de las proteínas totales se realizó mediante el método del Acido Bisinconílico (BCA) (Pierce, Rockford, IL). Por carril y variante de E6 50 µg/ 26 µl de extracto total de proteínas fueron calentados a 95 °C durante 5 minutos e inmediatamente puestos en hielo y sujetos a electroforesis SDS-Page (en geles en un intervalo de 7.5% a 15% dependiendo de la proteína) y transferidos en una cámara húmeda fría (180 minutos a 200 mA) a una membrana de nylon-nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Posteriormente las membranas fueron tratadas con una solución bloqueadora de sitios no específicos (PBS pH 7.4, leche en polvo sin grasa 5% y Tween 20 0.1%) por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron los anticuerpos primarios anti-p53 y anti p-14^{ARF} a 4 °C (Tabla 5) toda la noche en un rango de diluciones de 1:1000 a 1:10,000. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 20 0.1%) 5 veces por 10 min. Para la detección del complejo proteína-anticuerpo primario las membranas se incubaron (60 minutos a temperatura ambiente) con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con HRP. Después de esta segunda incubación las membranas finalmente fueron lavadas a temperatura ambiente 5 veces con PBS-Tween 20 0.1% por 5 minutos. El revelado de las membranas se hizo por el método de quimioluminiscencia incubándolas primero con luminol por 1 minuto (ECL + Amersham) y después exponiéndolas a una placa de rayos X (Hyperfilm ECL, Amersham) para registrar la

reacción de oxido reducción. Procedimientos similares se realizaron 48, 72 y 96 horas después de la co-transfección transitoria con E7 del VPH-18.

1.7.3.5. INMUNOCITOQUÍMICA

Las células control y transfectadas fueron cultivadas en laminillas de cuatro pozos. Después de alcanzar 80% de confluencia, el medio de cultivo se decantó y las células se lavaron dos veces con PBS (pH 7,4). Posteriormente se fijaron en formaldehído 3% en PBS (pH 7,4) durante 30 minutos y se enjuagaron dos veces. Las células fueron tratadas con la solución de recuperación de determinantes antigénicos Target Retrieval Solution High pH (DAKO) y se sometieron a 122-125 ° C a 15-24 psi en una olla a presión durante 20 minutos. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada por incubación con una solución acuosa de H₂O₂ 3%. El bloqueo de las proteínas inespecíficas se realizó con una solución bloqueadora de proteínas libre de suero (DAKO, Dinamarca) durante media hora. Los anticuerpos primarios: anti-HPV18-E6 (N-17) policlonal de cabra (dilución: 1/100), anti-p14^{ARF} (C-18) policlonal de cabra (1/200) y anti-p53 (DO-I) monoclonal de ratón (1/200) (Tabla 5) se incubaron toda la noche a 4 °C. Utilizando el sistema Dako LSAB+System HRP (DAKO). El revelado se llevó a cabo mediante una solución de 3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorado (DAB) (DAKO). Contra tinción con azul de metileno 0.2%. En cada corrida se incluyó un control negativo sin anticuerpo. Los controles negativos, incubados sin anticuerpo primario también fueron incluidos. Los experimentos de inmunocitoquímica de todos los grupos de estudio se realizaron cinco veces cada uno. Los parámetros evaluados a través del examen microscópico fueron; localización intracelular de la reacción inmunocitoquímica (núcleo, nucléolo y/o en el citoplasma) y el

porcentaje de células positivas (%) en diez campos microscópicos de 400x. La intensidad de la reacción fue reportada como baja (+), intermedia (+ +) y alta (+ + +).

1.7.4. RESULTADOS

1.7.4.1. LAS VARIANTES DE E6 DE VPH-18 POSEEN PATRONES TRANSCRIPCIONALES DIFERENTES DE E6 Y E6*

La Figura 13 muestra que tanto el transcrito completo de E6, como el transcrito truncado E6* se observan después de la transfección en todas las variantes E6 de VPH-18, aunque con claras diferencias en sus niveles relativos (relación E6/E6*). Después de la transfección con la variante de AsAi, la proporción de E6 > E6 *, mientras que con las variantes E y Af la proporción fue E6 < E6 *, pero con E los niveles de E6 fueron más altos en comparación con la variante Af. Los niveles de E6* fueron similares en las células transfectadas con cualquiera de estas dos variantes. Este predominio del transcrito E6* después de la transfección con E fue similar a la encontrada en las células transfectadas con el bicistrón E6E-E7 (E6-E7 Europea) y en células HeLa (HPV-18 variante E), donde había una ausencia casi total de E6, aparentemente debido a los efectos del gen E7.

La transfección con el constructo E6* dio como resultado la presencia exclusiva de transcritos E6 *. Los controles negativos, que consisten en la mezcla de reactivos de RT-PCR sólo (-), células MCF-7 no transfectadas y las células transfectadas con el plásmido vacío pcDNA 3,1 mostraron completa ausencia de transcritos E6 y E6*.

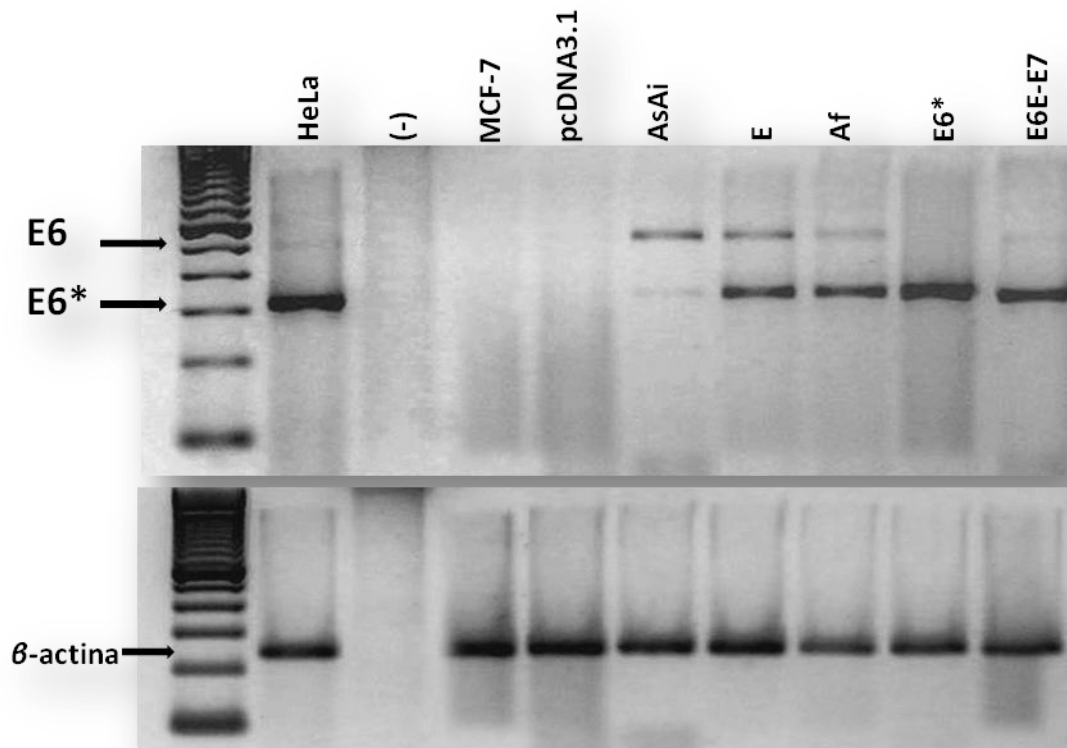


Figura 13. Patrón de transcripción de las variantes de E6 de VPH-18 transfectadas en células MCF-7. El “alternative splicing” del gen E6 del VPH-18 mostró relaciones variables de los transcritos E6/E6*. Con la variante AsAi E6>E6*, mientras que con las variantes E, Af y E6*, E6* > E6. La transfección con el bicistron E6E-E7 replicó cercanamente el patrón de transcripción observado en las células HeLa. Controles negativos: (-) = mezcla de reactivos para RT-PCR sin ADNc. MCF-7 = ADNc aislado de células MCF-7 no transfectadas. pcDNA 3.1= plásmido vacío. E6 = 495 pb, E6* = 313 pb. β-actina= control de carga. AsAi; Asiático-Amerindia, E; Europea, Af; Africana.

1.7.4.2. LAS VARIANTES DE E6 VPH-18 INDUCEN EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE

p53 Y p14^{ARF}

La Figura 14 muestra los patrones de expresión de p53 y p14^{ARF} en células MCF-7 transfectadas con variantes de E6 VPH-18 por Western blot. La expresión de la proteína p53 fue evidente en las células control (células MCF-7). El efecto diferencial de las variantes de E6 en los niveles de p53 se puede observar. Los niveles más bajos de p53 se observaron con las variantes AsAi y E. Los niveles más altos estuvieron asociados con la

variante Af y E6*. En la misma figura se observa la expresión p14^{ARF} en todas las células transfectadas y su ausencia en las células no transfectadas (células MCF-7 y las células transfectadas con plásmido vacío pcDNA 3.1). Hubo una aparente relación inversa entre la expresión de p53 y p14^{ARF}. Las células con la menor expresión de p53 (AsAi y E) mostraron sobreexpresión de p14^{ARF}, mientras que las células con la más alta expresión de p53 (Af y E6*) mostraron reducida en gran medida la expresión p14^{ARF}.

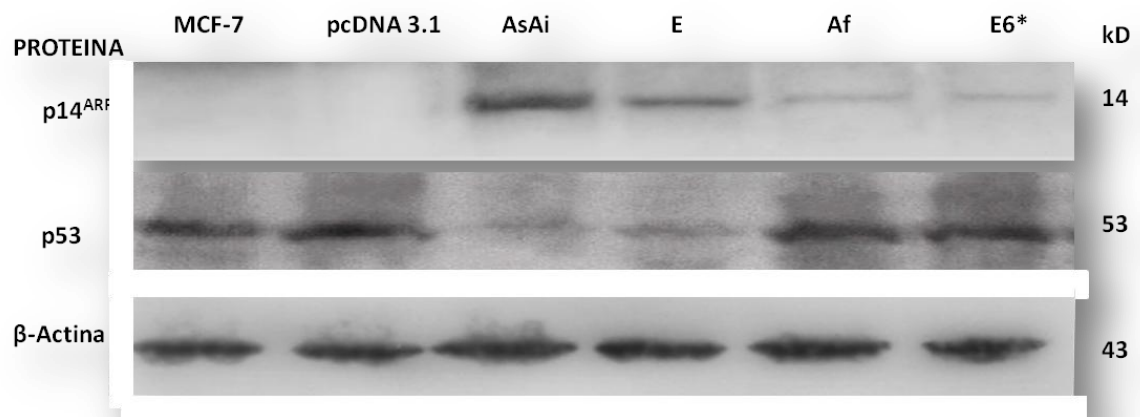


Figura 14. Patrones de expresión de p53 y p14^{ARF} en células MCF-7 transfectadas con variantes E6 de VPH-18 por Western blot. p14^{ARF} estuvo ausente en las células MCF-7 no transfectadas y en las transfectadas con plásmidos vacíos (pcDNA 3.1). La expresión de p14^{ARF} sólo se observó en las células transfectadas con las variantes de E6 y E6*. La máxima expresión de p14^{ARF} se observó con las variantes AsAi y E, la más baja con Af y E6*. El patrón de expresión de p53 fue inverso al de p14^{ARF}, es decir, la expresión más baja se observó con AsAi y E, las más alta con Af y E6*, así como en los controles: MCF-7= células no transfectadas y pcDNA 3,1 células MCF-7 transfectadas con el plásmido vacío. β-actina= control de carga de la proteína. AsAi; Asiático-Amerindia, E; Europea, Af; Africana.

1.7.4.3. LAS VARIANTES DE E6 DE VPH-18 INDUCEN EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE E6, p53 y p14^{ARF}

Después de la transfección de las variantes de E6 de VPH-18 y constructo E6*, se realizó mediante la técnica de ICQ la evaluación de la expresión de E6, p53 y p14^{ARF}. La Figura

15(A) muestra la ausencia de la expresión de E6 en las células MCF-7 transfectadas con el plásmido vacío pcDNA 3.1. Un panorama similar se observó en las células transfectadas con E6* (Figura 15E). Las células transfectadas con la variante AsAi mostraron abundante expresión nuclear y citoplásmica de la proteína E6 (Figura 15B), en las células con la variante E la expresión de E6 en los núcleos y el citoplasma fue moderada (Figura 15C). En las células transfectadas con la variante Af se observó una leve expresión de E6 en citoplasma y de moderada a intensa en algunos núcleos (Fig. 3D).

La expresión de p53 que se observó en las células transfectadas con las variantes de E6 de VPH-18 fue en diferentes niveles. La menor expresión de esta proteína se detectó en las células transfectadas con las variantes AsAi y E (Figura 15G, H), es decir, en las células con la máxima expresión de E6. En la Figura 15 (I) se muestra alta expresión de p53 en las células con la variante Af, con una baja expresión de E6. Las células transfectadas con E6* mostraron una alta expresión de p53 (Figura 15J), similar a la de las células transfectadas con el plásmido vacío y variante Af (Figura 15F, I), que coincidió, además, con la falta de expresión de E6. Podemos concluir que existe una relación inversa entre los patrones de expresión de p53 y E6.

En la Figura 15(K) que corresponde a las células MCF-7 transfectadas con el plásmido vacío, no hay expresión p14^{ARF}, mientras que una intensa tinción en el núcleo y nucléolo se observó en las células transfectadas con la variante AsAi (Figura 15L). Una reacción más suave se observó en un número variable de células con la variante E (Figura 15M). En la Figura 15(N) se muestra que en las células transfectadas con la variante Af presentaron reacción mínima en el núcleo y estuvo ausente en el nucléolo. Mínima expresión de p14^{ARF}

también se observó exclusivamente en algunos nucléolos de las células transfectadas con E6* (Fig. 30).

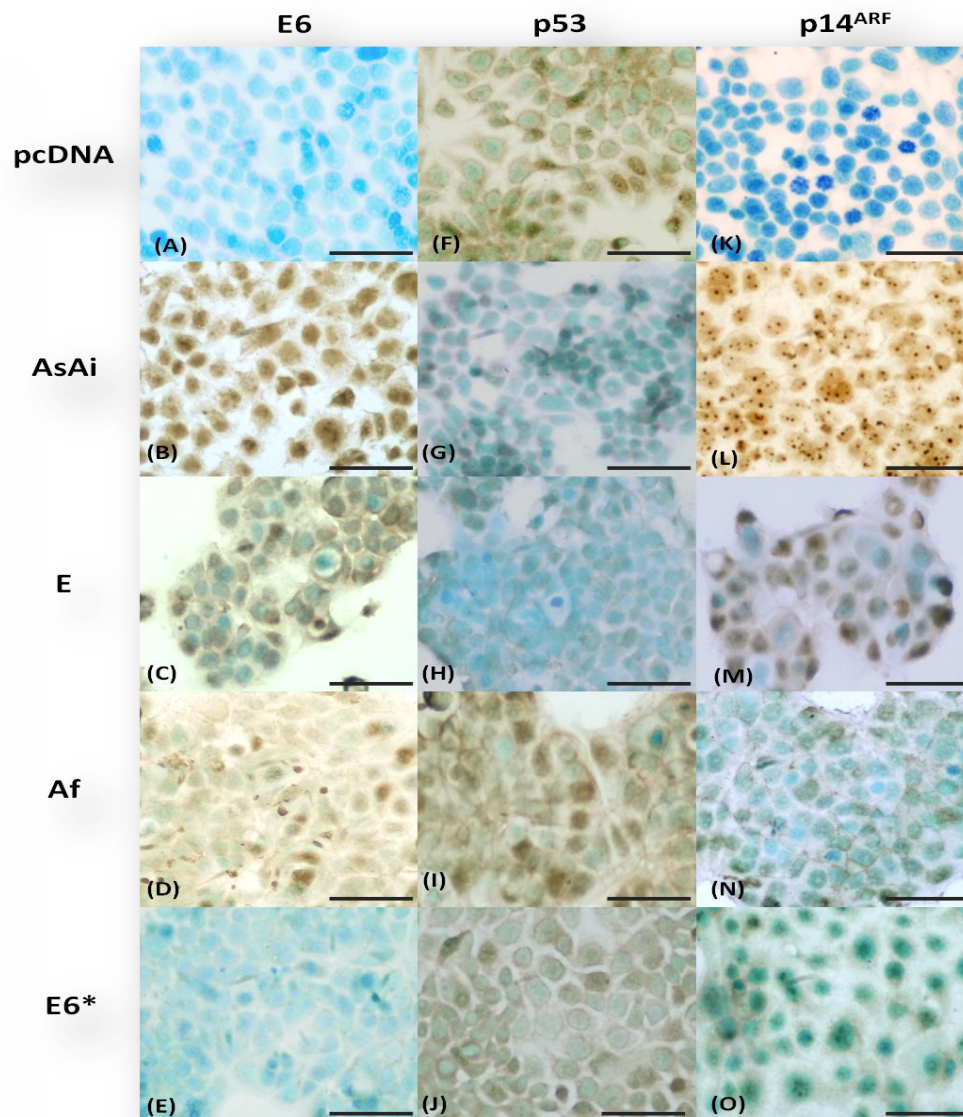


Figura 15. Inmunocitoquímica de E6, p53 y p14^{ARF} en células MCF-7 transfectadas con variantes de E6. La expresión de E6 estuvo ausente en las células transfectadas con el plásmido vacío (A) y en E6* (E), mientras que fue abundante en el núcleo y citoplasma de las células con la variante AsAi (B), disminuyendo gradualmente en las células transfectadas con las variantes E (C) y Af (D). La intensidad de la expresión de p53 es distinta, dependiendo de la variante transfectada, la mayor expresión se observó en las células transfectadas con el plásmido vacío pcDNA 3.1 (F), Af (I) y E6* (J), la más baja intensidad se observó en las células transfectadas con la variante AsAi (G) y E (H). La expresión de p14^{ARF} fue negativa después de la transfección con el plásmido vacío (K), mínima con la variante Af (N) y E6* (O), mientras que fue máxima con las variantes AsAi (L) y E (M). Escala, 50 μ m. AsAi; Asiático-Amerindia, E; Europea, Af; Africana.

1.7.4.4. LA TRANSFECCIÓN DE E7 MODIFICA AL PATRÓN DE TRANSCRIPCIÓN DE E6

La Figura 16 muestra el patrón de co-transfección con E7 en células MCF-7 previamente transfectadas con variantes de E6 y constructo E6*. En general las células transfectadas con la variante AsAi el patrón de transcripción de E6 se caracterizó por un predominio abrumador del transcrito completo de E6 sobre E6*, siendo E6 * casi indetectable a las 96 horas. Lo contrario es cierto para las células previamente transfectadas con las variantes E y Af, donde predominó E6* sobre E6 completo, siendo en estos casos E6 completo casi indetectable a las 96 horas principalmente en la variante Af. Claramente, la co-transfección con E7 reduce los niveles del transcrito E6 completo en las variantes E y Af. Los patrones de transcripción descritos fueron bastante constantes a las 48 y 72 horas. A las 96 horas se observaron variaciones mínimas, tales como un ligero incremento en la expresión de E6 principalmente en la variante E, e imperceptible en la variante Af. Los patrones de transcripción de E7 mostraron pequeñas diferencias en la cantidad de sus transcritos con las diferentes variantes de E6. A las 48 horas las células transfectadas con AsAi mostró el nivel máximo de E7, el mínimo se observó en las células transfectadas con E6 *. A las 72 y a las 96 horas el patrón anterior se ha conservado, la excepción fue un leve aumento en el patrón de transcripción de E7 en las células transfectadas con E6 *.

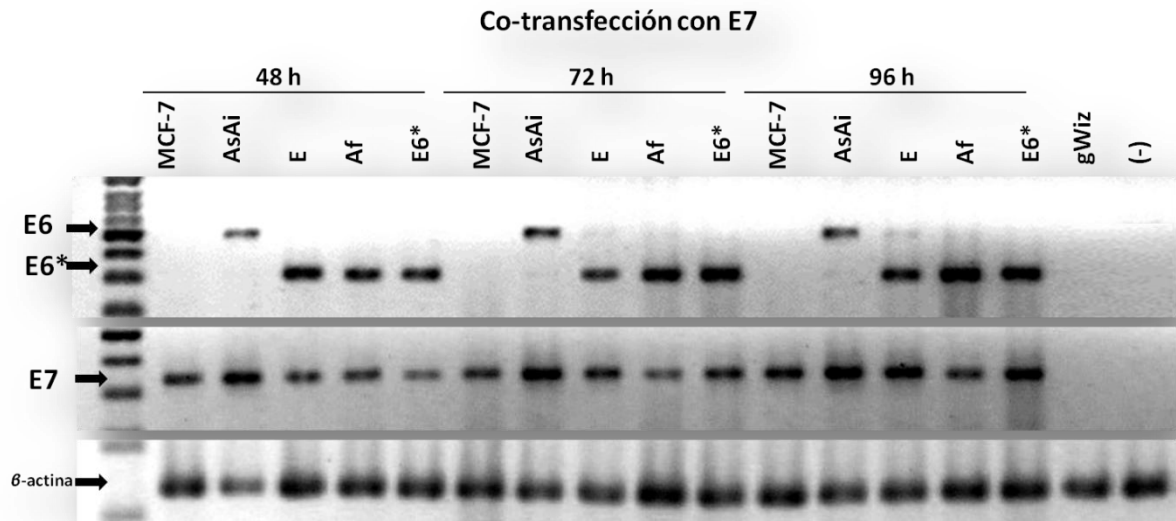


Figura 16. Patrones de transcripción por RT-PCR de E6, E6* y E7 posterior a la co-transfección con E7 (en células previamente transfectadas con las variantes de E6 y E6* del VPH-18). En una apreciación general, se puede observar que la transfección transitoria de E7 en células MCF-7 previamente transfectadas con las variantes de E6 alteró el patrón de transcripción de E6 y E6*, es decir en las células con la variante AsAi no se observó el transcrito E6* y fue evidente la falta del transcrito completo E6 en las células con las variantes E y Af. En las células transfectadas con E6* se observó aumento gradual conforme al tiempo de ambos transcritos (E6* y E7). Al parecer los niveles de transcripción de E7 no dependen de la presencia de E6, pero difieren con cada variante de E6. El patrón de transcripción de E7 fue casi homogéneo en todas las variantes desde las 48, 72 y hasta las 96 h. Los controles negativos: gWiz = plásmido vacío, (-) = RT-PCR reactivos sin ADNc, MCF-7 = ADNc aislado a partir de células transfectadas únicamente con E7 (sin transfección de E6). E6 = 495 pb, E6* = 313 pb, E7 = 336 pb, β -actina de control de carga = 250 pb. AsAi; Asiático-Amerindia, E; Europea, Af; Africana.

1.7.4.5. EL GEN E7 DE VPH-18 INDUCE UNA ELEVADA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p14^{ARF}

En la Figura 17 se muestra el patrón de expresión de p14^{ARF} a las 48 horas después de la co-transfección con E7 que se caracterizó por la presencia de niveles uniformemente altos de p14^{ARF} en las células transfectadas previamente con variantes de E6 variantes y E6*, así como en las células MCF-7 únicamente transfectadas con E7. p14^{ARF} estuvo ausente en los controles negativos, es decir, en las células transfectadas con el plásmido vacío; gWiz. El

patrón de expresión de p14^{ARF} a las 72 y 96 horas esencialmente no mostró cambios importantes (datos no mostrados). Estos hallazgos contrastan con los resultados previamente expuestos referente a la expresión de p14^{ARF} en las células transfectadas con las variantes de E6 y E6* de VPH-18 (ver Figura 14).

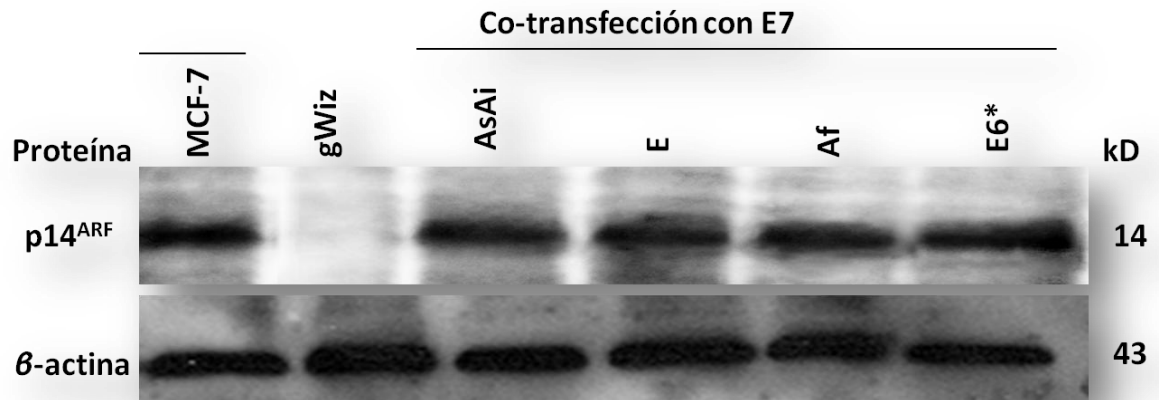


Figura 17. Patrón de expresión de p14^{ARF} en las células co-transfectadas con E7 y previamente transfectadas con variantes de E6 del VPH-18 por Western blot. En general se observó un nivel elevado y homogéneo de expresión de p14^{ARF}, 48 horas después de la co-transfección con E7 en todas las variantes de E6 y E6*. Las células sin E6 ni E7 (gWiz plásmido vacío) mostraron ausencia total de la expresión de p14^{ARF}. MCF-7 = células únicamente transfectadas con E7, β-actina= control de la carga de proteínas. AsAi; Asiático-Amerindia, E; Europea, Af; Africana.

1.7.5. DISCUSIÓN

En un estudio anterior se informó que p14^{ARF} se sobre-expresa de manera consistente en los núcleos y nucléolos de las células de CaCU transformadas por VPH-AR (Vázquez-Vega, 2010). Dado que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-18 tienen un efecto indirecto sobre la expresión p14^{ARF} es importante aclarar los efectos moleculares de estas proteínas, por separado y/o en combinación en la regulación de p14^{ARF} y la expresión de p53.

E6 y su forma trunca, E6 * (Pim, 2009), así como E7, son proteínas virales que participan en la transformación maligna causada por la infección con VPH-AR. En relación a los

transcritos de E6 y E6*, se ha informado que los transcritos truncos que corresponden a E6* son más abundantes que los transcritos de E6 completo en diferentes líneas celulares derivadas de CaCU transformadas por VPH-AR (Pim, 1997). Una de las principales conclusiones de este trabajo fue que la relación E6:E6* depende en gran medida de la variante en cuestión. Claramente, hubo predominio del transcrito E6 completo sobre E6* después de la transfección con la variante AsAi. Por el contrario, E6* predominó sobre E6 en las variantes E y Af.

No se ha dilucidado por completo por qué algunos transcritos predominan sobre otros en estas variantes. En el caso de la relación E6:E6*, al parecer depende de factores genéticos y epigenéticos que influyen en el corte y ensamble alternativo del intrón 1 del bicistron E6E7 (Mole, 2009.).

La co-transfección con E7 notablemente altero los patrones de transcripción de las variantes de E6 y de E6*. Hubo un notable predominio del producto sin “alternative splicing” en la variante AsAi. Lo contrario es cierto para las variantes E y Af, que mostraron ausencia completa del producto de transcripción E6 completo. El patrón de la transcripción de E7 se caracterizó por ligeras variaciones, pero continuó siendo detectable en cantidades significativas a lo largo del experimento (desde 48 horas hasta 96 horas) en todas las variantes de E6. No hay informes anteriores sobre esta aparente influencia recíproca sobre la actividad transcripcional de E6:E7 en una transfección por separado. No queda claro si este efecto no tiene que ver con las variaciones en la relación de E6:E6*, por lo que merece una mayor exploración.

Los estudios de RT-PCR del patrón de transcripción en las células HeLa, que están infectados con la variante E del HPV-18, mostraron que el patrón de transcripción con una

secuencia relacionada, es decir, el bicistron E6E-E7 de VPH-18, en ambos casos mostraron un patrón de transcripción similar al encontrado después de la co-transfección con E7 de las células MCF-7 previamente transfectadas con la variante E (Figura 13). Estos resultados muestran que algunas interacciones entre estos dos genes son independientes de su sitio de incorporación en el genoma de la célula huésped, es decir, si están separados o en tándem. A pesar de una extensa revisión de la literatura actual, no fue posible encontrar ningún informe sobre los efectos de la transfección por separado de los genes E6 y E7.

En los análisis de Western blot de las células transfectadas con variantes de E6 de VPH-18, se encontraron grandes diferencias en los niveles de expresión de $p14^{ARF}$, la tendencia general fue una expresión inversa a la de la expresión de p53. La variante AsAi presentó los niveles máximos de $p14^{ARF}$ asociados a la mínima expresión de p53. Integrando los patrones de transcripción E6/E6* en esta ecuación, es posible afirmar que esta variante combina dos condiciones supuestas en cuanto a alta carcinogenicidad, es decir, los bajos niveles de p53 y $E6 > E6^*$. Esto puede explicar por qué esta variante se asocia con las lesiones más agresivas (Burk, 2009; Lizano, 2009b). La menor expresión de $p14^{ARF}$, en conjunción con los niveles máximos de p53 se observó en las células transfectadas con la variante Af, donde el patrón de transcripción fue $E6^* > E6$. Esta combinación de altos niveles de p53 con predominio de la transcripción de $E6^*$ podría explicar por qué esta variante se asocia con lesiones menos agresivas. La variante E mostró tener niveles de expresión de $p14^{ARF}$ y de p53 intermedios entre los observados con las variantes AsAi y Af aunque la relación E6:E6* está moderadamente inclinada hacia el predominio $E6^*$, en consecuencia, esta variante se asocia con lesiones moderadamente agresivas. La mencionada asociación no es absoluta, lo que refleja el carácter heterogéneo del CaCU.

En las células transfectadas con E6*, se observó la expresión p14^{ARF}, aunque en un grado mínimo. Este hallazgo fue inesperado debido a los informes que confirman el efecto inhibitorio de E6* sobre la degradación de p53 por E6 y el consiguiente bloqueo de la expresión de p14^{ARF}. Este nivel mínimo de p14^{ARF} podría atribuirse a una liberación parcial de su expresión secundaria a modificaciones estructurales de p53 inducidas por su unión a E6*. La unión de E6* a p53 fue reportada primero por Pim y colaboradores (1997). Otra posible explicación es que puede haber una degradación parcial de p53 por mecanismos alternativos que pueden incluir a E6*.

La transfección con E7 en células previamente transfectadas con las variantes de E6 y E6*, así como las células MCF-7 únicamente transfectadas con E7 indujo un alto nivel de expresión p14^{ARF}. Por el contrario, las células transfectadas con los plásmidos gWiz vacíos mostraron ausencia de la expresión p14^{ARF}.

La ICQ mostró que el anticuerpo contra E6 no reconoce la proteína E6*, aún cuando éste identifique el amino terminal de la proteína. Además es claro que no hay disponibilidad de un anticuerpo específico para la detección E6* y se ha informado en repetidas ocasiones por varios autores, el gran obstáculo que representa la detección de estas proteínas (Schneider-Gädicke, 1988; Roggenbuck, 1991; Vaeteewoottacharn, 2005).

En los estudios ICQ E6 se expresó en las células transfectadas, aunque con diferencias en la proporción de células positivas y en su localización intracelular. Una tendencia decreciente en la proporción de células positivas a E6 fue la siguiente; AS*Ai* > E > Af, discernible en la Figura 15. Este hallazgo se correlaciona con claridad con los resultados obtenidos por RT-PCR en donde encontramos una tendencia similar en los niveles de transcripción de E6 con las tres variantes.

La expresión de p53 fue evaluada por inmunocitoquímica y mostró un patrón similar al observado por Western blot, es decir, las células transfectadas con la variante AsAi mostraron los niveles más bajos de la expresión de p53 y una relación E6>E6*. Los mayores niveles de p53 se encontraron en las células transfectadas con la variante Af y E6*. Los niveles de p53 en las células transfectadas con la variante E fueron intermedios entre AsAi y la variante Af. Además, los estudios por ICQ también mostraron que la expresión p14^{ARF} estuvo ausente en las células MCF-7 no transfectadas y la mínima expresión se registró en las células transfectadas con la variante Af en contraste con AsAi y E, donde p14^{ARF} fue abundantemente expresado en el núcleo y nucléolo de la mayoría de las células. Estos resultados tienen una clara correspondencia con el patrón de expresión de p14^{ARF} observado en los estudios de Western blot, que mostraron los niveles más altos en AsAi y E. Finalmente podemos afirmar que tanto por Western blot, como por ICQ se observó correlación inversa entre la expresión de p14^{ARF} y la expresión de p53.

1.7.6. CONCLUSIÓN

En conclusión, los resultados anteriormente expuestos indican que la expresión p14^{ARF} es diferencialmente regulada por las variantes de E6 del VPH-18 a través de p53 en las células sin E7.

En presencia de E7, p14^{ARF} estuvo sobre-expresado, independientemente del estatus de E6.

En las células transfectadas únicamente con E6*, se observó mínima expresión de p14^{ARF} coincidiendo con niveles aparentemente normales de p53. Esto podría atribuirse a un efecto paradójico de E6* sobre p53.

Por lo tanto, existe suficiente evidencia significativa para afirmar que E6 y E7 son oncoproteínas cuya presencia es altamente relevante para la expresión de p14^{ARF} y que el papel de E7 en la expresión de p14^{ARF} merece mayor investigación.

Los resultados anteriormente expuestos pueden explicar el efecto patogénico diferencial de las variantes del VPH-18 y exponen la complejidad de las variables que deben considerarse cuando se utilizan biomarcadores como herramientas de diagnóstico.

1.7.7. PERSPECTIVA DE ESTUDIO

Nos proponemos enfocar nuestra investigación al análisis de la expresión de otros biomarcadores de interés de lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas del cérvix uterino.

Estudiar el posible efecto protector de la inducción de la sobreexpresión de E6* en lesiones pre-malignas y CaCU.

2. BIBLIOGRAFÍA.

1. ACOG Practice Bulletin (2009): Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists, *Number* 109. December
2. Alonso P, Lazcano E, Hernández M.(2000). Cáncer cervicouterino: Diagnóstico, prevención y control. Editorial Médica Panamericana, México. 2ª edición. P. 254
3. Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Vousden KH.(1998). p14^{ARF} links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395: 124-5.
4. Bernard HU.(2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 32 Suppl 1:S1-6
5. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, et al. (2001). Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer. *J Natl Can Inst* 93:1325-1330.
6. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, et al., (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 87: 796-802.
7. Bosch FX. (2011). Human papillomavirus: science and technologies for the elimination of cervical cancer. *Expert Opin. Pharmacother.* 12: 2189-2204.
8. Branca M, Ciotti M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Costa S, Benedetto A, Bonifacio D, Di Bonito P, Paba P, Accardi L, Syrjänen S, Favalli C, Syrjänen K; HPV-PathogenISS Study Group.(2007). Up-regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is closely associated with high-risk human papillomavirus (HPV) and progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but does not predict disease outcome in cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 130: 223-31.
9. Bruni L, Díaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch F X and de Sanjosé S. (2010). Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 continents: Meta-analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *J Infect Dis.* 12:1789-1799.
10. Bulten J, van der Avoort IA, Melchers WJ, Massuger LF, Grefte JM, Hanselaar AG, de Wilde PC. (2006). p14ARF and p16INK4A, two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 101: 487-94
11. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. (2009). Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics.* 12:281-90.
12. Burk RD, Terai M, Gravitt PE, et al. (2003). Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res* 63:7215-7220.
13. Carter JR, Ding Z, Rose BR (2011). HPV infection and cervical disease: a review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 51:103-8.
14. Chakrabarti O, Veeraghavalu K, Tergaonkar V, Liu Y, Androphy EJ, Stanley MA, Krishna S. (2004). Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras. *J Virol.* 11:5934-45.
15. Contreras-Paredes A, De la Cruz-Hernández E, Martínez-Ramírez I, Dueñas-González A, Lizano M.(2009). E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. *Virology.* 383:78-85.
16. Cornelissen MT, Smits HL, Briët MA, van den Tweel JG, Struyk AP, van der Noordaa J, ter Schegget J.(1990). Uniformity of the splicing pattern of the E6/E7 transcripts in human papillomavirus type 16-transformed human fibroblasts, human cervical premalignant lesions and carcinomas. *J Gen Virol.* 71: 1243-6.
17. Cox J.T. (2009). History of the use of HPV testing in cervical screening and in the management of abnormal cervical screening results. *J Clin Virol.* 45 Suppl 1:S3-S12.

18. De Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, Jordanova ES, Fleuren GJ.(2005). Human papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *Int J Cancer*. 114: 422-5.
19. De la Cruz-Hernández E, García-Carrancá A, Mohar-Betancourt A, Dueñas-González A, Contreras-Paredes A, Pérez-Cárdenas E, Herrera-Goepfert R, Lizano-Soberón M. (2005). Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J Gen Virol*. 86:2459-68.
20. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR et al. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17–27.
21. del Moral-Hernández O, López-Urrutia E, Bonilla-Moreno R, Martínez-Salazar M, Arechaga-Ocampo E, Berumen J, Villegas-Sepúlveda N.(2010). The HPV-16 E7 oncoprotein is expressed mainly from the unspliced E6/E7 transcript in cervical carcinoma C33-A cells. *Arch Virol* 155:1959-70.
22. Denton KJ, Bergeron C, Klement P, Trunk MJ, Keller T, Ridder R; European CINtec Cytology Study Group.(2010). The sensitivity and specificity of p16 (INK4a) cytology vs. HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results. *Am J Clin Pathol*. 134: 12-21.
23. Doorbar J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110: 525-41.
24. Duensing S, Münger K. (2004). Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*. 109:157-62.
25. Evangelou K, Bramis J, Peros I, Zacharatos P, Dasiou-Plakida D, Kalogeropoulos N, Asimacopoulos PJ, Kittas C, Marinos E, Gorgoulis VG.(2004). Electron microscopy evidence that cytoplasmic localization of the p16 (INK4A) "nuclear" cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) in tumor cells is specific and not an artifact. A study in non-small cell lung carcinomas. *Biotech Histochem*. 79: 5-10.
26. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P.(1995). Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 141: 680-689.
27. Feng W, Xiao J, Zhang Z, Rosen DG, Brown RE, Liu J, Duan X.(2007). Senescence and apoptosis in carcinogenesis of cervical squamous carcinoma. *Mod Pathol*. 9: 961-6.
28. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. (2010).Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127, 2893-917.
29. Fiedler M, Campo-Fernández B, Laich A, Moser B, Stöckl P, Jansen-Dürr P, Zwerschke W.(2006). Purification and characterization of the E7 oncoproteins of the high-risk human papillomavirus types 16 and 18. *J Virol Methods*. 134: 30-35.
30. Flores-Reséndiz D, Castellanos-Juárez E, Benítez-Bribiesca L. (2009). Las proteasas en la progresión neoplásica. *Gac Méd Méx* 145: 131-142.
31. Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH.(2010). Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol*. 34: 1077-87.
32. Ganguly N, Parihar SP.(2009). Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci*. 34:113-23.
33. Griep AE, Herber R, Jeon S, Lohse JK, Dubielzig RR, Lambert PF.(1993). Tumorigenicity by human papillomavirus type 16 E6 and E7 in transgenic mice correlates with alterations in epithelial cell growth and differentiation. *J Virol* 6:1373-84.
34. Harris SL, Levine AJ. (2005).The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 24: 2899-908.
35. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT.(1989).HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*. 8:3905-10.
36. Heer A, Alonso LG, de Prat-Gay G. (2011). E6*, the 50 amino acid product of the most abundant spliced transcript of the E6 oncoprotein in high-risk human papillomavirus, is a promiscuous folder and binder. *Biochemistry* 50:1376-83.

37. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Münger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W, Crum CP. (2012). A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:10516-21.
38. Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, et al.(1993).The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*. 67:6413-23.
39. Hubert WG. (2005).Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle. *J Virol*. 79:5914-22.
40. Hwang SJ, Schreyer KR. (2012).Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma. *J Oncol*. 2012: 507286.
41. IARC Handbooks of Cancer Prevention. (2005). Cervix Cancer Screening, Chapter: 2. Volume 10.IARC Press, Lyon, France.
42. Inagaki Y, Tsunokawa Y, Takebe N, Nawa H, Nakanishi S, Terada M, Sugimura T.(1988). Nucleotide sequences of cDNAs for human papillomavirus type 18 transcripts in HeLa cells. *J Virol*. 62: 1640-6.
43. James MC, & Peters G. (2000). Alternative product of the p16/CKDN2A locus connects the Rb and p53 tumor suppressors. *Prog Cell Cycle Res* 4: 71-81.
44. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69-90.
45. Kämmer C, Wart horst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H.(2000).Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol*. 81:1975-81.
46. Kanao H, Enomoto T, Ueda Y, Fujita M, Nakashima R, Ueno Y, Miyatake T, Yoshizaki, T, Buzard GS, Kimura T, Yoshino K, Murata Y. (2004). Correlation between p14 (ARF) /p16 (INK4A) expression and HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Lett* 213: 31-37.
47. Kim YT, Zhao M. (2005).Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J*. 46: 597-613.
48. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M.(2001). Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*. 92: 276-84.
49. Kottaridi C, Tsiodras S, Spathis A, Chranioti A, Pappas A, Kassanos D, Panayiotides I, Karakitsos P.(2011).Clinical performance of human papillomavirus E6, E7 mRNA flow cytometric assay compared to human papillomavirus DNA typing. *Anal Quant Cytol Histol*. 33: 305-10.
50. Kurshumliu F, Thorns C, Gashi-Luci L. (2009). p16INK4A in routine practice as a marker of cervical epithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*. 115: 127-31.
51. Lizano M, Berumen J, García-Carrancá A. (2009a).HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Arch Med Res* 40:428-34.
52. Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, García-Carrancá A.(1997).Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 89:1227-31.
53. Lizano M, De la Cruz-Hernández E, Carrillo-García A, et al. (2006). Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population. *Gynecol Oncol* 102:230-235.
54. Lizano Soberón M, Carrillo García A, Contreras Paredes A. (2009b). Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología* 4: 205-216.
55. López J, Poitevin A, Mendoza-Martínez V, Pérez-Plasencia C, García-Carrancá A.(2012). Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer* 12:48.
56. López-Saavedra A, González-Maya L, Ponce-de-León S, García-Carrancá A, Mohar A, Lizano M.(2009).Functional implication of sequence variation in the long control region and E2 gene among human papillomavirus type 18 variants. *Arch Virol*. 154:747-54.

57. Magal SS, Jackman A, Ish-Shalom S, Botzer LE, Gonen P, Schlegel R, Sherman L. (2005). Downregulation of Bax mRNA expression and protein stability by the E6 protein of human papillomavirus 16. *J Gen Virol.* 86:611-21.
58. Malinowski DP. (2007). Multiple biomarkers in molecular oncology. I. Molecular diagnostics applications in cervical cancer detection. *Expert Rev Mol Diagn* 7: 117-31.
59. Mantovani F, Banks L. (2001). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* 20:7874-87.
60. Massimi P, Shai A, Lambert P, Banks L. (2008). HPV E6 degradation of p53 and PDZ containing substrates in an E6AP null background. *Oncogene.* 27:1800-1804.
61. Maufort JP, Shai A, Pitot HC, Lambert PF. (2010). A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res.* 70: 2924-31.
62. Mohar A, Bargalló E, Ramírez MT, Lara F, Beltrán-Ortega A. (2009) Available resources for the treatment of breast cancer in Mexico. *Salud Pública Mex.* 51 Suppl 2:s263-269.
63. Mole S, McFarlane M, Chuen-Im T, Milligan SG, Millan D, Graham SV. (2009). RNA splicing factors regulated by HPV16 during cervical tumour progression. *J Pathol* 219: 383-391.
64. Moody, CA & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 10, 550-560.
65. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K.(2004).Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 21:11451-60.
66. Münger K, Howley PM. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 89:213-28.
67. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. (2006).Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 24 Suppl 3:S3/1-10.
68. Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, Turner M, McGuinness E, Griffin M, Martin C, Sheils O, O'Leary JJ.(2003). p16^{INK4A} as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and GIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol.* 56: 56-63.
69. Ndisang D, Faulkes DJ, Gascoyne D, Lee SA, Ripley BJ, Sindos M, Singer A, Budhram-Mahadeo V, Cason J, Latchman DS.(2006).Differential regulation of different human papilloma virus variants by the POU family transcription factor Brn-3a. *Oncogene.*25:51-60.
70. Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Pfister H, Tay SK, ter Meulen J, Villa LL, et al.(1993).Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol.* 67:6424-31.
71. Pan W, Datta A, Adami GR, Raychaudhuri P, Bagchi S.(2003).P19ARF inhibits the functions of the HPV16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 22:5496-503.
72. Pim D, Massimi P, Banks L.(1997). Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. *Oncogene* 15:257-64.
73. Pim D, Tomaic V, Banks L. (2009).The human papillomavirus (HPV) E6* proteins from high-risk, mucosal HPVs can direct degradation of cellular proteins in the absence of full-length E6 protein. *J Virol* 83:9863-74.
74. Pinto AP, Degen M, Villa LL, Cibas ES. (2012). Immunomarkers in gynecologic cytology: the search for the ideal "biomolecular Papanicolaou test". *Acta Cytol.* 56:109-21.
75. Programa Nacional de Salud 2007-2012. Por un México sano: construyendo alianzas para una mejor salud. <http://www.pediatrica.gob.mx/pns.pdf>
76. Roggenbuck B, Larsen PM, Fey SJ, Bartsch D, Gissmann L, Schwarz E. (1991). Human papillomavirus type 18 E6*, E6, and E7 protein synthesis in cell-free translation systems and comparison of E6 and E7 in vitro translation products to proteins immunoprecipitated from human epithelial cells. *J Virol* 65:5068-72.
77. Scheffner M, Münger K, Byrne JC, Howley PM. (1991). The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 5523-7.

78. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM.(1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 63:1129-36.
79. Schiffman M.(2007). Integration of human papillomavirus vaccination, cytology, and human papillomavirus testing. *Cancer* 111:145-53.
80. Schiller JT, Day PM and Kines RC. (2010).Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol*. 118:S12-7.
81. Schneider-Gädicke A, Kaul S, Schwarz E, Gausepohl H, Frank R, Bastert G.(1988). Identification of the human papillomavirus type 18 E6 and E6 proteins in nuclear protein fractions from human cervical carcinoma cells grown in the nude mouse or in vitro. *Cancer Res*. 48:2969-74.
82. Schneider-Gädicke A, Schwarz E. (1986). Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J*. 9:2285-92.
83. Schröpfer A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Feix S, Anacker J.(2010). Expression pattern of matrix metalloproteinases in human gynecological cancer cell lines. *BMC Cancer*. 10: 553.
84. Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NL, Haas JA, Lowy DR, Schiller JT.(1991).The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol*. 65: 4860-6.
85. Shai A, Brake T, Somoza C, Lambert PF.(2007).The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. *Cancer Res* 67:1626-35.
86. Sharma SV, Haber DA, Settleman J. (2010). Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer*. 4: 241-53.
87. Sharpless NE. (2005). INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res*. 576: 22-38.
88. Shirasawa H, Jin MH, Shimizu K, Akutsu N, Shino Y, Simizu B. (1994). Transcription-modulatory activity of full-length E6 and E6*I proteins of human papillomavirus type 16. *Virology* 203: 36-42.
89. Sichero L, Franco EL, Villa LL. (2005). Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J Infect Dis*. 191:739-42.
90. SINAISSA, 2011. Dirección General de Información en Salud. México. Fuente: Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS (<http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>).
91. Slebos RJ, Kessid TD, Chen AW, Han SM, Hedrick L, Cho KR.(1995). Functional consequences of directed mutations in human papillomavirus E6 proteins: abrogation of p53-mediated cell cycle arrest correlates with p53 binding and degradation in vitro. *Virology*. 208:111-20.
92. Solomon D, Nayar R. (2005). El Sistema Bethesda para informar la citología cervical: Definiciones, criterios y notas aclaratorias. Ediciones Journal CABA, Buenos Aires, Argentina.P-196
93. Soto U, Das BC, Lengert M, Finzer P, zur Hausen H, Rösl F.(1999).Conversion of HPV 18 positive non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrids to invasive growth involves loss of TNF-alpha mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex. *Oncogene*. 18: 3187-98.
94. Soto U, Denk C, Finzer P, Hutter KJ, zur Hausen H, Rösl F.(2000). Genetic complementation to non-tumorigenicity in cervical-carcinoma cells correlates with alterations in AP-1 composition. *Int J Cancer*. 86: 811-7.
95. Stacey SN, Jordan D, Snijders PJ, Mackett M, Walboomers JM, Arrand JR. (1995). Translation of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from bicistronic mRNA is independent of splicing events within the E6 open reading frame. *J Virol*. 69: 7023-31.
96. Stanley M. (2007). Prophylactic HPV vaccines. *J Clin Pathol*. 60:961-5.
97. Stöppler MC, Ching K, Stöppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J.(1996). Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol*. 10:6987-93.

98. Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G.(1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14 (ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* 17: 5001-14.
99. Syrjänen KJ. (2005). Immunohistochemistry in assessment of molecular pathogenesis of cervical carcinogenesis. *Eur J Gynaecol Oncol.* 26: 5-19.
100. Tavassoli FA, Devilee P. (2003). Pathology & genetics tumours of the breast and female genital organs. World Health Organization Classification of Tumours. WHO-IARC (International Agency for Research on Cancer). IARC Press. Lyon.
101. Thomas M, Pim D, Banks L. (1999). The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 18: 7690-700.
102. Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, Fulciniti F, Botti G, Greggi S, Buonaguro L, Buonaguro FM.(2011). Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol.* 121:32-42.
103. Trunk MJ, Dallenbach-Hellweg G, Ridder R, Petry KU, Ikenberg H, Schneider V, von Knebel Doeberitz M.(2004). Morphologic characteristics of p16INK4a-positive cells in cervical cytology samples. *Acta Cytol.* 48: 771-82.
104. Tsoumpou I, Valasoulis G, Founta C, Kyrgiou M, Nasioutziki M, Daponte A, Koliopoulos G, Malamou-Mitsi V, Karakitsos P, Paraskevaidis E.(2011). High-risk human papillomavirus DNA test and p16 (INK4a) in the triage of LSIL: a prospective diagnostic study. *Gynecol Oncol.* 121: 49-53
105. Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes PJ. (2008). Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol.* 153:397-408.
106. Utrera-Barillas D, Salcedo-Vargas M, Gariglio-Vidal P, Hernández-Hernández DM, Gutiérrez-Delgado F, Benítez-Bribiesca L.(2000). H-ras and Nm23-H1 gene expression and proteolytic activity in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Arch Med Res.* 31: 172-81.
107. Vaeteewoottacharn K, Chamutpong S, Ponglikitmongkol M, Angeletti PC.(2005). Differential localization of HPV16 E6 splice products with E6-associated protein. *Virology* 2:50.
108. Valdovinos-Torres H, Orozco-Morales M, Pedroza-Saavedra A, Padilla-Noriega L, Esquivel-Guadarrama F, Gutierrez-Xicotencatl L.(2008). Different Isoforms of HPV-16 E7 Protein are Present in Cytoplasm and Nucleus. *Open Virol J.* 2:15-23.
109. Vázquez-Ortiz G, Pina-Sánchez P, Vázquez K, Dueñas A, Taja L, Mendoza P, García JA, Salcedo M.(2005). Overexpression of cathepsin F, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer. *BMC Cancer.* 5: 68.
110. Vázquez-Vega S, Sánchez SLP, Contreras PA, Castellanos JE, Peñarroja FR, Lizano SM, Andrade CR, García CA, Benítez BL. (2010-2011). Nuclear co-expression of p14^{ARF} and p16^{INK4A} in uterine cervical cancer-derived cell lines containing HPV. *Cancer Biomark* 8: 341-50.
111. Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H.(1999). Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol.* 80:1035-43.
112. Vinther J, Rosenstjerne MW, Kristiansen K, Norrild B. (2005). The 3' region of human papillomavirus type 16 early mRNAs decrease expression. *BMC Infect Dis.* 5: 83.
113. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, *et al.*, (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-9.
114. Wang SS. And Hildesheim A. (2003). Chapter 5: Viral and Host Factors in Human Papillomavirus Persistence and Progression. *J Natl Cancer Inst Monogr* 31: 41-46.
115. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. (2007). Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers.* 23:315-30.
116. Wise-Draper TM, Wells SI. (2008). Papillomavirus E6 and E7 and their cellular targets. *Frontiers in Bioscience* 13: 1003-1017.

117. Woodman CB, Collins SI & Young LS. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 7:11-22.
118. Wu CJ, Chang KS, Chang YS. (1997). Transfer of the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 18 into human epithelial cells via recombinant retrovirus infection. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi*. 3:123-134.
119. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, et al. (1997). Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 89: 796-802.
120. Xiao W, Bian M, Ma L, Liu J, Chen Y, Yang B, Wu Q. (2010). Immunochemical analysis of human papillomavirus L1 capsid protein in liquid based cytology samples from cervical lesions. *Acta Cytol* 54: 661–667.
121. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*. 71:2463-72.
122. Zanier K, Charbonnier S, Baltzinger M, Nominé Y, Altschuh D, Travé G. (2005). Kinetic analysis of the interactions of human papillomavirus E6 oncoproteins with the ubiquitin ligase E6AP using surface plasmon resonance. *J Mol Biol*. 349:401-12.
123. Zheng ZM, Baker CC. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. 11:2286-302.
124. Zuna RE, Tuller E, Wentzensen N, Mathews C, Allen RA, Shanesmith R, Dunn ST, Gold MA, Wang SS, Walker J, Schiffman M. (2011). HPV16 variant lineage, clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer. *Infect Agent Cancer*. 6: 1-9.
125. zur Hausen H (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account, *Virology* 20 (2009), 260– 265.
126. zur Hausen H. (1995). Are human papillomavirus infections not necessary or sufficient causal factors for invasive cancer of the cervix? *Int J Cancer*. 63:315-316.
127. zur Hausen H. (2008). Papillomaviruses--to vaccination and beyond. *Biochemistry (Moscow)*. 73:498-503

3. ANEXOS

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1. RNA de interferencia y su potencial terapéutico en cáncer. Revista de investigación clínica 2010 vol. 62(1): 81-90
- Anexo 2. Nuclear co-expression of p14ARF and p16INK4A in uterine cervical cancer-derived cell lines containing HPV. Cancer Biomarkers 2010-2011 vol. 8: 341-350
- Anexo 3. Regulation of p14ARF expression by HPV-18 E6 variants and E7. Sometido para consideración en la Revista Journal of Medical Virology el 16 de julio del 2012