



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICA

ESTUDIO DEL EFECTO DEL VIRUS DE
PAPILOMA HUMANO EN LA FOSFORILACIÓN
DE LA PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA
SURVIVINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

**ALBA EVELYN SÁNCHEZ
VILLARREAL**

Tutor: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA

MÉXICO, D.F. Junio de 2012





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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Leticia Rocha Zavaleta en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Leticia Rocha Zavaleta Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Blanca Hayde Ruíz Ordaz Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Xochitl Pérez Martínez Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Martin Sapp, del Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad del Estado de Louisiana (Louisiana State University Health Sciences Center) por la donación de los pseudoviriones de HPV16 y HPV18.

A la M. en C. Ma. Cecilia Aguilar Zacarías y a la Q.F.B. Rosalba Pérez Villalva, por el apoyo técnico brindado.

El presente proyecto fue apoyado parcialmente por DGAPA-PAPIIT Clave IN216810 y CONACyT-SEP-Ciencia Básica No. 49167. Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente Dr. Emilio Rojas del Castillo Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

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

Secretario Dr. Juan Carlos Gómora Martínez Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Suplente Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Suplente Bonaparte Dra. Marcela Lizano Soberón Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al Gran Arquitecto Del Universo por mostrarse en mi interior.

A mis padres por su apoyo y las lecciones, en especial a mi madre por su amor incondicional.

A Carlos Andrés por todo este tiempo juntos, por las pruebas superadas y las lecciones aprendidas.

Por su amor.

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta por ser mi tutora desde la Licenciatura.

A mis amigos Ethel, Rosalba, Fer, Salvador, Hugo, Clelia, Arleth, Norma E., por sus consejos y por los momentos que hemos compartido en este tiempo.

A mi comité tutorial: Dra. Blanca Hayde Ruíz Ortiz y Dra. Xóchitl Pérez Martínez, por su asesoría y por abrirme los ojos.

A Leticia García por su paciencia y su amabilidad constante.

A mis compañeras de laboratorio, Ceci, Liz, Vale, Cris, Olga, Majo, Irma, Idalia por todos los favores y porque cada una me enseñó algo importante.

Al café La Selva por el tiempo obsequido en la escritura de este trabajo, por los nuevos amigos y esas interesantes charlas. Principalmente a Eva y Ramón por no dejarme abandonar.

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
2.1.	Apoptosis.....	2
2.2.	Caspasas.....	3
2.2.1.	Vía Extrínseca.....	3
2.2.2.	Vía Intrínseca.....	5
2.3.	Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis.....	6
2.4.	Survivina.....	7
2.4.1.	Isoformas de survivina.....	10
2.4.2.	Asociación virus-survivina.....	12
2.5.	Virus del papiloma humano.....	13
2.6.	Relación del HPV con los receptores celulares $\alpha 6\beta 4$ integrina y heparán sulfato.....	16
3.	ANTECEDENTES.....	18
4.	JUSTIFICACIÓN.....	18
5.	HIPÓTESIS.....	18
6.	OBJETIVO GENERAL.....	19
6.1.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
7.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
7.1.	1.- Línea celular.....	20
7.2.	2.- Pseudoinfección de células HaCat con los pseudoviriones de HPV16 y HPV18 (fluorescencia).....	20
7.3.	3.- Extracción de RNA.....	21
7.4.	4.- Análisis de la expresión del gen de survivina.....	21
7.5.	5.- Diferencia cuantitativa en la transcripción del gen de survivina (qRT-PCR).....	22
7.6.	6.- Inmunocitoquímica.....	23
7.7.	7.- Análisis de proteínas por Western Blot.....	23
7.8.	8.- Pseudoinfección de células HaCat con los pseudoviriones HPV18 (extracción de proteína).....	25
7.9.	9.- Inhibición de los receptores celulares heparán sulfato y $\alpha 6$ integrina.....	25
11.-	Análisis Estadístico.....	27
8.	RESULTADOS.....	27
8.1.	1.- Corroboración de la capacidad infecciosa de los pseudoviriones.....	27
8.2.	2.- Expresión del gen de Survivina en células HaCat.....	28
8.3.	3.- Efecto de la infección con pseudoviriones de HPV16 y HPV18 sobre la activación de la transcripción del gen de Survivina.....	28
8.4.	4.- Activación transcripcional del gen de Survivina en células infectadas con pseudoviriones de HPV16 y HPV18.....	29
8.5.	5.- Expresión basal de la proteína Survivina en las células.....	30
8.6.	6.- Efecto de la infección con pseudoviriones de HPV18 sobre la expresión de la proteína Survivina.....	31
8.7.	7.- Efecto de la inhibición de los receptores $\alpha 6\beta 4$ integrina y heparán sulfato en la expresión de la proteína survivina.....	32
8.8.	8.- Efecto de la infección con los pseudoviriones de HPV16 y HPV18 en la inducción de apoptosis por cisplatino en células HaCat.....	34
9.	DISCUSIÓN.....	36
10.	CONCLUSIONES.....	43
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

RESUMEN

Survivina es una proteína que participa en la inhibición de la apoptosis y en la regulación de la división celular. Survivina es expresada en etapas embrionarias y es casi indetectable o expresada a niveles muy bajos en tejido adulto normal. Existen estudios que muestran una sobre-expresión de la proteína en diversos tipos de cáncer, entre ellos el cérvico-uterino, cuyo principal factor etiológico es la infección por Virus del Papiloma Humano (HPV). Sin embargo, a la fecha se desconoce el efecto de la infección primaria por HPV sobre la expresión de survivina. Por lo anterior, decidimos estudiar el efecto de la infección por HPV en la expresión y fosforilación de survivina en células HaCat, ya que son queratinocitos no tumorales que expresan a los receptores para el HPV, heparán sulfato y alfa6beta4 integrina. Se analizó el nivel de transcripción de survivina en células infectadas por pseudoviriones de HPV16 y HPV18 mediante PCR en tiempo real. Los resultados mostraron un aumento dependiente del tiempo de infección, siendo 10 veces mayor que el nivel basal una hora posterior a esta, en la infección con los pseudoviriones de HPV18.

La expresión y fosforilación de la proteína survivina fue evaluada por Western Blot en células HaCat infectadas por pseudoviriones de HPV18, y se observó que en ambos casos, hubo una tendencia a incrementar su expresión, dependiente del tiempo de infección. Así mismo, la inhibición conjunta de los receptores heparán sulfato y alfa6beta4 integrina, indujo una disminución significativa de la expresión y fosforilación de survivina. Se ha demostrado que para desarrollar su actividad anti-apoptótica, survivina debe ser fosforilada por la cinasa cdc2, por lo tanto investigamos si la infección con pseudoviriones inducía la activación de dicha cinasa. Estudios por Western Blot demostraron que la infección indujo la activación de cdc2. Dado que survivina es conocida como una molécula anti-apoptótica, se evaluó el efecto de la infección por pseudoviriones de HPV18 sobre la muerte inducida por el quimiofármaco cisplatino, y se encontró una mayor sobrevivencia en las células infectadas por pseudoviriones de HPV18, dependiente del tiempo de infección.

En conclusión, la infección de células HaCat con pseudoviriones de HPV18 induce la expresión y fosforilación de survivina, así como la activación de la cinasa cdc2, a través de la unión a los receptores celulares heparán sulfato y alfa6beta4 integrina.

INTRODUCCIÓN

Apoptosis

La apoptosis es la forma regulada de muerte celular utilizada por todos los metazoarios para remover las células no necesarias, dañadas o potencialmente deletéreas (Hail *et al.*, 2006), lo cual mantiene un control decisivo en el número total de células. Se encuentra implicada en el desarrollo embrionario, regulación del sistema inmune, morfogénesis y regulación de la homeostasis de los tejidos, así como en varios estadios de enfermedad (Kerr, 2002). Una célula apoptótica típicamente sufre un encogimiento, condensación de la cromatina, cariérresis (fragmentación nuclear) y protuberancias en la membrana plasmática que eventualmente llevan a la formación de cuerpos apoptóticos (Hail *et al.*, 2006).

Para su estudio, se ha dividido a la apoptosis en 3 fases: Fase de iniciación, fase efectora y fase de degradación. La fase de iniciación depende del tipo celular y del estímulo apoptótico, la fase efectora constituye la activación de proteasas, enzimas y factores que participan en la fase de degradación, estas dos últimas fases le confieren características a la célula que sugieren la entrada de esta a un proceso apoptótico (Hail *et al.*, 2006).

Las señales intracelulares que inician un proceso apoptótico pueden ser en respuesta a una gran cantidad de estímulos como estrés, calor, radiación, privación de nutrientes, infección viral, hipoxia, incremento en el calcio (Ca^{++}) intracelular, activación de receptores por sus ligandos, etc. (Lewin, 2007).

En el sistema inmunológico el proceso de apoptosis se aprecia claramente, iniciando cuando los linfocitos T citotóxicos atacan a sus células blanco. Por otro lado, la proteína supresora de tumores p53, tiene la capacidad de disparar la apoptosis como una defensa importante contra la malignización celular (Lewin, 2007).

Las vías que activan la apoptosis son diferentes en cada una de ellas aunque la respuesta es similar. En muchas de estas vías, el estímulo inicial converge en una vía efectora común (Lewin, 2007).

La apoptosis es un proceso altamente controlado por una serie de señales celulares que pueden ser extrínsecas e intrínsecas.

Caspasas

Las caspasas son proteasas de cisteína con especificidad por aspartato como sustrato, de ahí su nombre de complejo de “cisteinil-aspartato proteasas” (caspasas) y forman parte de los mecanismos efectores de la apoptosis. Las caspasas son reguladas a nivel post-traducciona para que puedan ser activadas rápidamente, se caracterizan por tener un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. Son sintetizadas como pro-caspasas inactivas o zimógenos, presentando un prodominio, una subunidad pequeña y una subunidad grande (Stennicke & Salvesen, 1998).

Se clasifican según su función en las cascadas de señalización intracelular en caspasas iniciadoras o apicales (caspasas 2, 8, 9, 10) (Chen & Wang, 2002) y caspasas efectoras o ejecutoras (caspasas 3, 6, 7) del proceso catalítico (Stennicke & Salvesen, 1998). Las señales potencialmente apoptóticas pueden ser intracelulares o extracelulares, estas señales son transducidas por proteínas adaptadoras y transmitidas a las caspasas iniciadoras las cuales se agrupan para permitir su autoactivación, lo que a su vez, les permitirá activar a las caspasas efectoras.

Se localizan en el citoplasma y su activación se produce por una reacción proteolítica en cadena en donde se rompen los enlaces peptídicos posteriores a los residuos de aspartato (Asp), que permite la dimerización de las caspasas por diversas vías en las que participan varios complejos moleculares (Leist & Jaatela, 2001), como el complejo formado por Apaf-1 y citocromo C que participan en la activación de la caspasa 9 (Stennicke & Salvesen, 1998).

Vía Extrínseca

La vía extrínseca de la apoptosis también es conocida como la vía de “Receptores de Muerte”, llamada así por el recibimiento de señales proapoptóticas del exterior, a receptores celulares que poseen dominios de muerte (Death Domains, DD) intracelulares implicados en las interacciones proteína-proteína (Kumar *et al.*, 2003). Es iniciada por la unión de los receptores celulares de muerte presentes en la membrana plasmática como FasR (Receptor de Fas), TNFR (Receptor de TNF), TRAIL-R (Receptor de TRAIL) a sus ligandos, FasL (Ligando de Fas), TNF (Tumoral Necrosis Factor) y TRAIL (TNF-related apoptosis-

inducing ligand), respectivamente, agrupándose subsecuentemente los receptores en la membrana plasmática y promueven el reclutamiento de proteínas adaptadoras quienes a su vez, reclutan a las caspasas iniciadoras (8 o 10) para iniciar la cadena de activación de las caspasas que median la fase de ejecución de la apoptosis (Figura 1) (Lewin, 2007; Kumar *et al.*, 2003).

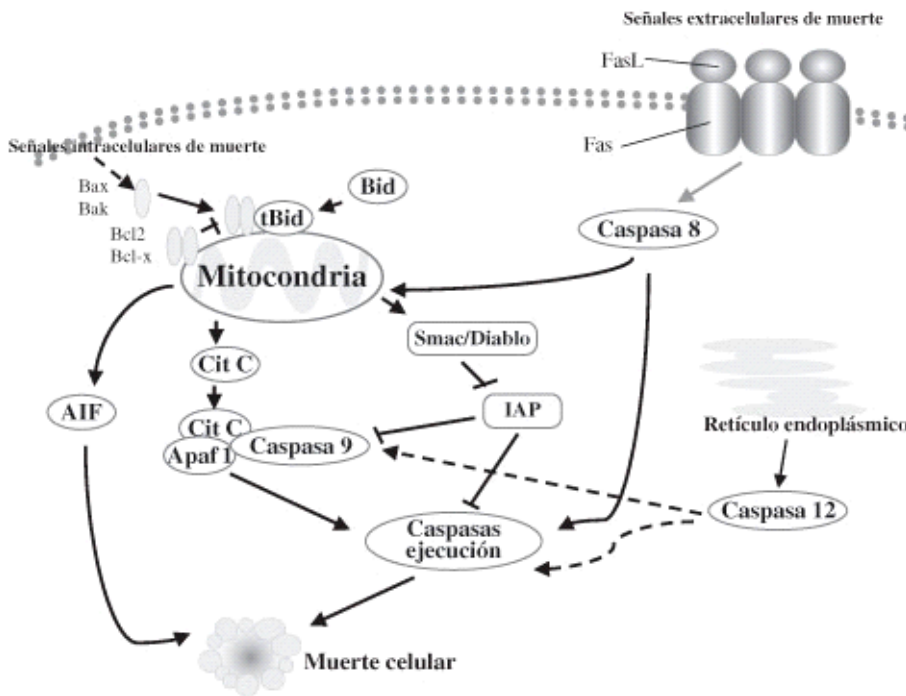


Fig. 1 Vías Extrínseca e Intrínseca de la apoptosis. (Modificado de: Bernhardt R.2004. **Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases: apoptosis or necrosis?** Rev Chil Neuro-Psiquiat. 4:281-292.)

Señales extracelulares e intracelulares de muerte, involucrando a los “Receptores de muerte” que reciben estímulos del exterior de la célula, y a la vía mitocondrial que recae en la permeabilización de la membrana de este organelo, respectivamente.

La caspasa 8 es la caspasa apical en la vía de receptores de muerte, el zimógeno de la caspasa 8 puede interactuar con proteínas adaptadoras para generar la forma activa y una vez que la caspasa 8 es activa puede disparar la activación de caspasas efectoras río abajo, como la caspasa 3.

La cascada de activación de las caspasas se encuentra regulada tanto positiva como negativamente de manera estricta. Por un lado, existen reguladores negativos como los miembros de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP's) a la cual pertenecen las proteínas NAIP, cIAP1, cIAP2, XIAP y SURVIVINA, entre otras. Estas proteínas se unen a las caspasas y neutralizan su actividad (Ceballos-Cancino *et al.*, 2007). Existe también una proteína llamada Smac (Second mitochondria-derived activator of caspases) que es un regulador positivo de la apoptosis o regulador negativo de la vía anti-apoptótica

(Vucic *et al.*, 2002), esta proteína se encuentra en la mitocondria, durante la apoptosis es procesada a su forma activa y liberada al citoplasma, en donde se une a las IAP's para prevenir la inhibición de las caspasas.

Vía Intrínseca

El mecanismo de la vía intrínseca de la apoptosis, recae en la permeabilización de la membrana mitocondrial para liberar moléculas pro-apoptóticas al citoplasma, sin la intervención de los receptores de muerte. Es también llamada vía mitocondrial.

Cuando las células se encuentran sujetas a condiciones de estrés o existe un daño al DNA, la membrana mitocondrial se vuelve permeable y pierde moléculas antiapoptóticas como los miembros de la familia de Bcl-2, lo cual permite que se liberen del espacio intermembranal al citoplasma, moléculas pro-apoptóticas que pueden activar la cascada de las caspasas (Kumar *et al.*, 2003).

El intermediario de la cadena transportadora de electrones, Citocromo c, que se localiza en el espacio intermembranal, también es liberado al citoplasma. El Citocromo c se combina con dATP y Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1) para activar a la caspasa 9 formando un complejo que forma el apoptosoma (Zoratti & Szabó, 1995). Este complejo catalítico es el responsable de la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 por hidrólisis generando cascadas para ejecutar la apoptosis (Figura 1).

La vía intrínseca puede ser regulada por la familia de las proteínas Bcl-2, proteasas, y agentes que promueven la transición de la permeabilidad mitocondrial (ceramidas, especies reactivas de oxígeno y Ca^{++}) (Tsujimoto, 2003), así como por otras proteínas antiapoptóticas. Por otro lado, en respuesta al ligando Fas (FasL) o TNF, la caspasa 8 induce el rompimiento de Bid (BH3 interacting domain death agonista, miembro de la familia de Bcl-2) para producir un fragmento truncado en el carboxilo terminal que se transloca del citoplasma a la membrana mitocondrial externa, estos oligómeros truncados de Bid pueden disparar la permeabilización de la membrana mitocondrial y la activación de caspasas mediada por Citocromo c. Así, el reclutamiento de la vía intrínseca de apoptosis por activación de la caspasa 8 puede servir para iniciar y/o amplificar señales intracelulares para disparar la apoptosis (Luo *et al.*, 1998).

Las vías de los receptores de muerte y la mitocondrial convergen a nivel de la activación de la caspasa 3 por medio de Bid.

Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis

Las proteínas Inhibidoras de la Apoptosis (IAP's) son una familia de proteínas que fueron inicialmente descubiertas en baculovirus y sus homólogas celulares han sido encontradas en organismos que van desde las levaduras hasta los humanos (Miller, 1999). El motivo estructural de la familia de las IAP's es un dominio conocido como BIR (Baculoviral IAP Repeat), el cual comprende una región de unión a zinc de aproximadamente 70 aminoácidos con 3 residuos de cisteína y una histidina que se encuentran conservados en la secuencia CX₂CX₁₆HX₆₋₈C (Verhagen *et al.*, 2001).

Las proteínas que pertenecen a esta familia se agrupan en ella por la presencia de uno a tres dominios BIR. Un segundo motivo estructural es el dominio RING que une 2 átomos de zinc y se encuentra en el carboxilo (C-)Terminal, sin embargo, este motivo no está presente en todas las proteínas de esta familia. La ausencia o presencia de este dominio y la homología de los dominios BIR, es lo que permite clasificar a las IAP's en 3 clases (Verhagen *et al.*, 2001).

La clase I contiene a proteínas con dominios BIR homólogos y un motivo RING (ejemplos: XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, MLIAP).

La clase II incluye solo a la proteína NAIP la cual presenta 3 dominios BIR y no presenta motivo RING.

La clase III incluye proteínas que contienen un solo dominio BIR, pero no presentan motivo RING, a este clase pertenecen las proteínas BRUCE y Survivina (Figura 2) (Verhagen *et al.*, 2001).

Las IAP's inhiben el proceso apoptótico a través de la inhibición de las caspasas 3, 7 y/o 9 (Schimmer, 2004), por interacciones directas a través de los dominios BIR.

Se han descrito muchas propiedades biológicas de las IAP's, entre ellas la regulación de la división celular, participación en cascadas de señalización intracelulares, facilitación de la degradación de proteínas a través de la ligasa de ubiquitina E3 (Liston *et al.*, 2003) y principalmente, en la inhibición de la apoptosis. Actualmente, se sabe que existe una sobre-

expresión de algunas IAP's en distintos tipos de cáncer, las más reportadas son las proteínas XIAP y Survivina (Marasawa *et al.*, 2003; Ambrosini *et al.*, 1997).

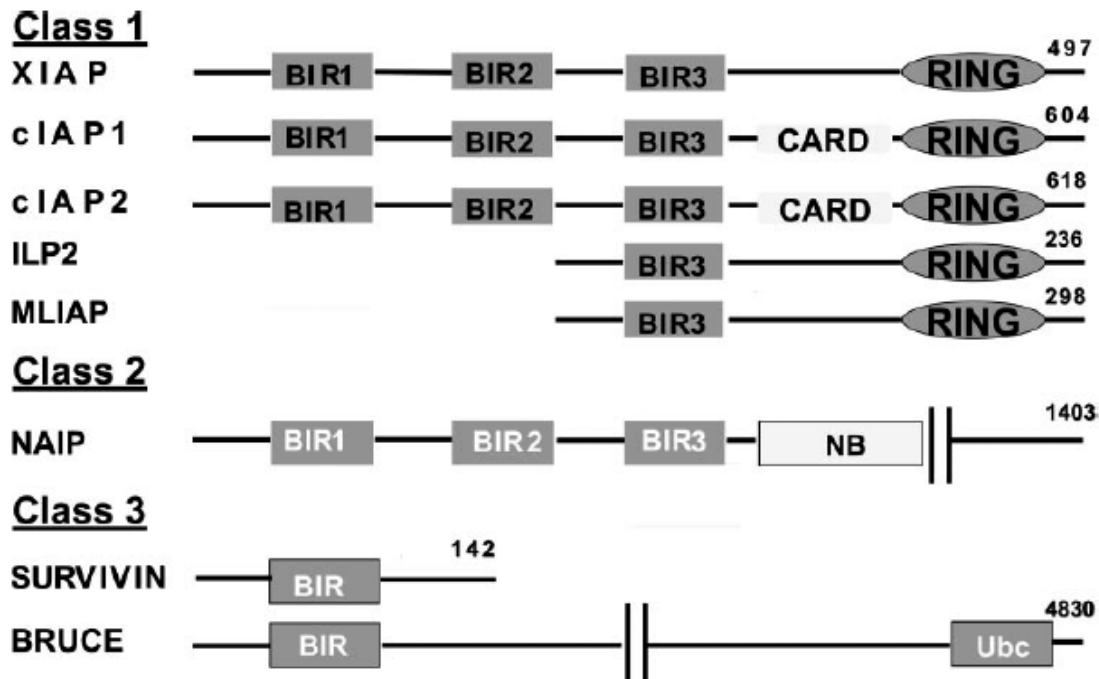


Fig. 2 Clasificación de las IAP's (Schimmer A, 2004).

Las Proteínas inhibidoras de la apoptosis se han dividido en 3 clases, en donde podemos encontrar a XIAP en la Clase I con un dominio RING y 3 dominos BIR. Por otro lado, en la Clase 3 se encuentra survivina con un solo dominio BIR y sin dominio BIR.

SURVIVINA

Survivina es una proteína pequeña de aproximadamente 16.5 kDa, conformada por 142 aminoácidos, con una función dual (implicada en la inhibición de la apoptosis y en la regulación de la división celular), presentando una vida media de aproximadamente 30 minutos cuando no sufre modificaciones post-traduccionales (Zhao *et al.*, 2000), antes de ser degradada por ubiquitinación (Vong *et al.*, 2005).

Survivina es una proteína homodimérica con un solo dominio BIR de aproximadamente 70 aminoácidos situado a la mitad del extremo amino (N-)Terminal (Ambrosini *et al.* 1997) (Figura 3).

La interfase del dímero está compuesta de residuos hidrofóbicos en su extremo amino, así como de residuos que conectan el dominio BIR a la α -hélice del carboxilo terminal, formando una estructura en forma de corbata de moño (Chantalat *et al.*, 2000).

Esta proteína es expresada en etapas embrionarias y es casi indetectable o expresada a niveles muy bajos en tejido adulto normal, sin embargo, existen estudios que muestran una sobre-expresión de la proteína en casi todos los tumores humanos estudiados (Ambrosini *et al.*, 1997; Altieri, 2003; Kania *et al.*, 2003).

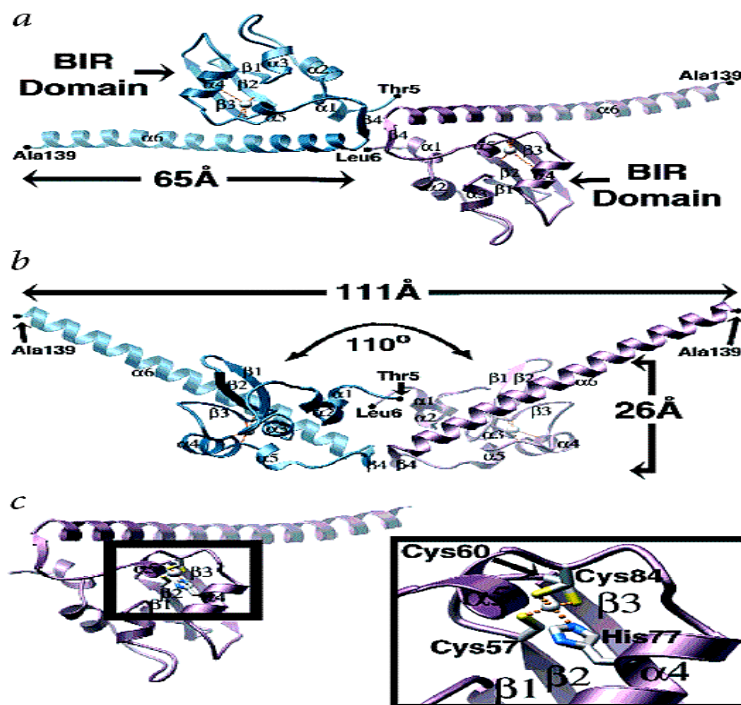


Fig. 3 Estructura del homodímero de survivina (Chantalat *et al.*, 2000).

El homodímero de Survivina con sus 2 dominios BIR (uno de cada monómero) formando la estructura de corbata de moño.

Actualmente se conocen dos papeles principales de survivina en la célula. El primero es dado por su expresión en la fase G2/M del ciclo celular en células normales, en esta fase survivina se localiza en el huso mitótico por interacción con tubulina, se encuentra asociada a la cinasa Aurora B y a la proteína interna del centrómero (INCENP), como componente esencial del complejo protéico asociado a cromosomas (CPC), regulando el ensamblaje de los microtúbulos en el huso mitótico permitiendo así una división celular apropiada (Honda *et al.*, 2003, Zhao *et al.*, 2000), en este estado activo survivina es fosforilada por la enzima Aurora B en el residuo 117 de Thr (Wheatley *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que survivina sigue un patrón de localización durante el ciclo celular, en la profase y metafase se encuentra principalmente en el núcleo, durante la profase se empieza a mover a los centrómeros, en la prometafase cuando la membrana nuclear se disocia y los microtúbulos cruzan la región nuclear, se localiza en los centrómeros; en la metafase cuando los cromosomas se alinean en la parte media y son empujados hacia los polos por los cinetocoros, survivina se encuentra asociada a estos últimos. Durante la anafase, survivina se mueve con los cinetocoros conforme los microtúbulos se acortan y se van hacia la región media, acumulándose finalmente en el cuerpo medio durante la formación del surco de división (Figura 4).

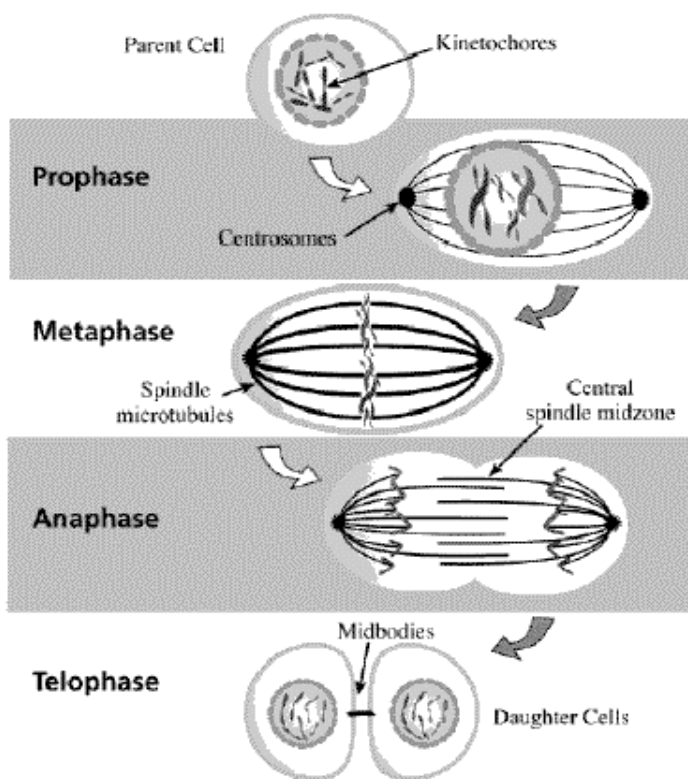


Fig 4.- Localización de survivina en la estabilización de la división celular (Altieri D, 2003).

Durante la Profase survivina se encuentra asociada a los centrómeros, en la Metafase a los cinetocoros (Kinetochores) y finalmente en la Telofase se asocia al cuerpo medio (Midbodies).

Por otro lado, survivina presenta un papel antiapoptótico por sobre-expresión del gen que codifica para la proteína en células de distintos tejidos en el desarrollo embrionario (Adida et al., 1998), así como en distintos tipos de cáncer (Ambrosini *et al.*, 1997). La sobre-expresión de survivina es capaz de inhibir las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis (Altieri, 2003).

En experimentos realizados *in vitro*, se observó que la función antiapoptótica de survivina se correlacionaba con una localización citoplásmica, y que además la sobre-expresión de esta fue capaz de inhibir a las caspasas 3 y 7 (Shin *et al.*, 2001; Tamm *et al.*, 1998).

Estudios *in vitro* muestran que la actividad supresora de la apoptosis así como los niveles de survivina en las células están reguladas por su fosforilación en el residuo 34 de Thr, así mismo, se sabe que esta fosforilación la lleva a cabo la cinasa dependiente de ciclina (cdk), cdc2 o cdk1 (O'Connor *et al.*, 2000; Frost *et al.*, 2002). Se ha demostrado que para llevar a cabo la fosforilación de survivina, cdc2 se encuentra en un estado activo, unida a la ciclina B y a su vez, defosforilada en los residuos 14 de Thr y 15 de tirosina (Tyr), esta defosforilación es llevada a cabo por la fosfatasa cdc25A (Gautier *et al.*, 1991). Además de la defosforilación de estos residuos, cdc2 necesita al mismo tiempo estar fosforilada en el residuo 161 de Thr para su completa activación, esta fosforilación es realizada por la ciclina cdk7 (Liang *et al.*, 2002).

Isoformas de survivina

El gen que codifica para survivina humana, llamado BIRC5, se encuentra en el cromosoma 17q25 y puede dar lugar a 4 isoformas por distintos empalmes del transcrito.

Una sola copia del gen de survivina es transcrito de un promotor rico en GC's para generar el RNA mensajero (Altieri, 2006).

Survivina es conocida como el tipo silvestre, cuenta con 3 intrones y 4 exones, posteriormente se identificó a survivina 2-B la cual retiene una parte del intrón 2 (Mahotka *et al.*, 1999). Survivina Δ -Ex3, muestra una carencia del exón 3, esta carencia provoca un cambio en el marco de lectura que da origen a un único extremo C-terminal que podría tener la función de una señal de localización nuclear o incluso mitocondrial (Caldas *et al.*, 2005; Li, 2005).

Y finalmente, Survivina 3B la cual contiene un nuevo exón 3 derivado de una porción del intrón 3 (Badran *et al.*, 2004) (Figura 5).

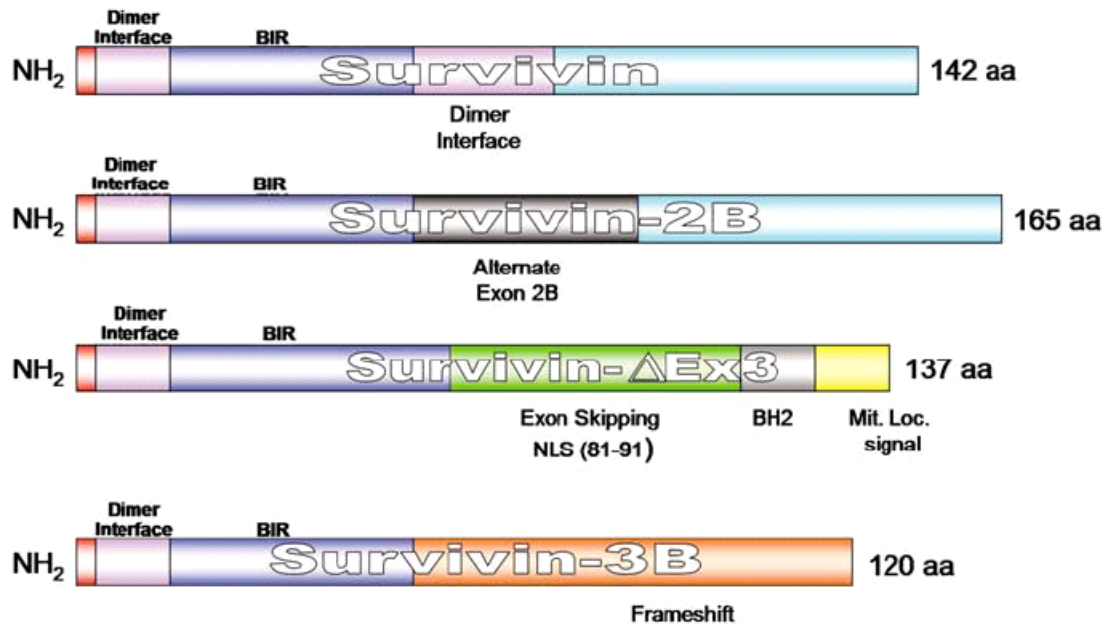


Fig. 5.- Isoformas de survivina (Caldas *et al.*, 2005).

Esquema de survivina más tres isoformas (survivina 2B, survivina Δ Ex3 y survivina 3B) encontradas en distintas localizaciones celulares. Se ha encontrado un pool de survivina entre las membranas mitocondriales en líneas celulares provenientes de tumores.

Se ha identificado también un pool de survivina distribuido entre las membranas mitocondriales en líneas celulares de tumores, esta localización parece estar asociada con la proteína chaperona Hsp90 (Dohi & Altieri, 2005), y corresponde a la isoforma de survivina llamada Δ Ex-3, esta isoforma puede interactuar con la proteína antiapoptótica Bcl2 e inhibir la actividad de la caspasa 3 (Wang *et al.*, 2002).

Por lo anterior, survivina parece tener distintas funciones en la célula, de acuerdo a sus distintas localizaciones.

Asociación virus-survivina

Algunos virus relacionados a la inhibición de la apoptosis tienen como molécula blanco a la proteína survivina, para inhibir la apoptosis de las células infectadas y poder continuar con su ciclo de vida, tal es el caso del virus de la hepatitis B (Marusawa *et al.*, 2003), el poliomavirus JC (JCV) (Pina-Oviedo *et al.*, 2007), el virus de la hepatitis C (Zhou & Gong, 2006), el VIH (Zhu *et al.*, 2003) y el virus del papiloma humano (Lo Muzio *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2007).

En el caso de las infecciones por poliomavirus JC y por VIH, se observó que ambos virus son capaces de incrementar la activación de survivina (Pina-Oviedo *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2003), el poliomavirus JC fue observado en un cáncer cerebral, y el mecanismo por el cual incrementa la expresión de survivina no ha sido descrito. En la infección por VIH, el incremento en la activación fue explicado por la transactivación del promotor del gen que codifica para survivina, vía la proteína viral *vpr*.

Por otro lado, la relación Survivina con el Virus de Papiloma Humano (HPV), fue observada por Lo Muzio y colaboradores, quienes encontraron una asociación entre la expresión de survivina y la infección por HPV (por inmunohistoquímica) y sugirieron una posible regulación directa o indirecta del virus, en la expresión de la proteína survivina (Lo Muzio *et al.*, 2004). También se han hecho otros estudios en muestras de tejido infectado por HPV y en distintos estadios del cáncer cérvico-uterino en donde se ha visto un incremento en la expresión de survivina dependiente del grado de la lesión (Kim *et al.*, 2002; Jimenez *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de la clara co-localización de survivina en tejido infectado por HPV, hasta el momento, no se ha reportado si existe un incremento en la expresión de esta proteína en los eventos tempranos de infección viral.

Es de gran importancia resaltar el papel del virus de la hepatitis B como un problema de salud por su asociación con un carcinoma humano (al igual que la relación HPV-Cáncer Cérvico-Uterino). En este caso, se sabe que la proteína survivina y la proteína X del virus de Hepatitis B (HBX) forman un complejo y se unen a la procaspasa-9, previniendo su reclutamiento al factor regulador mitocondrial Apaf-1, suprimiendo así la apoptosis iniciada vía mitocondria/citocromo c, potenciando la carcinogénesis hepatocelular (Marusawa *et al.*, 2003).

La relación existente entre esta infección viral y la sobre-expresión de survivina es lo que nos lleva a pensar que podría estar sucediendo algo semejante en el cáncer cérvico-uterino, cuyo desarrollo se encuentra asociado a infección persistente por HPV de alto riesgo.

Virus del papiloma humano

Los virus del papiloma humano pertenecen a la familia *Papillomaviridae* (de Villiers *et al.*, 2004) y son virus pequeños con un peso molecular de 5×10^6 Daltons, contienen un genoma de DNA de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases (pb), en una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros con un diámetro de 52 a 55 nm.

El genoma del HPV está organizado en 3 regiones principales, dos que codifican para proteínas tempranas o E (Early) y que contiene a los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Una región tardía o L (Late) que contiene a los genes L1 y L2, además de una región larga de control, no codificante o LCR (Long Control Region) (Park 1995), dando un total de 8 regiones de lectura abierta (ORF's, Open Reading Frame) (Figura 6).

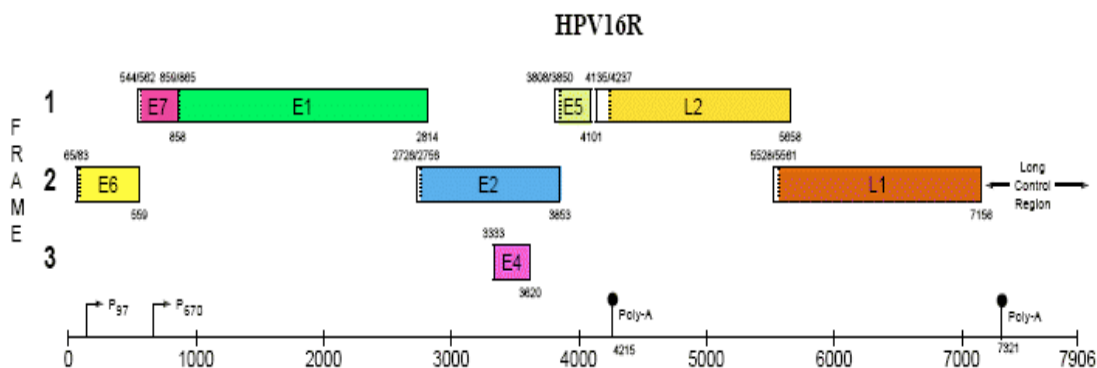


Fig. 6.- Mapa de los transcritos de mRNA de HPV16, indicando los marcos de lectura (Baker C, et al., 1996).

Mapa de los transcritos de RNA mensajero de HPV16, indicando los 3 marcos de lectura presentes en el genoma viral. (Marco 1: E7, E1, E5, L2. Marco 2: E6, E2, L1. LCR. Marco 3: E4).

La LCR o región reguladora, que se encuentra río arriba en el genoma, regula la replicación viral y la expresión de los genes.

La región temprana codifica para proteínas no estructurales. Los genes E1 y E2 son requeridos para la replicación del DNA. El gen E1 codifica una proteína multimérica con

actividad helicasa y ATPasa, capaz de reconocer regiones de origen de replicación en el DNA viral. El gen E2 codifica para una proteína dimérica que puede formar un complejo con la proteína E1 para replicar el DNA viral (Masterson *et al.*, 1998), además E2 es capaz de reprimir a los promotores P97 (HPV 16) y P105 (HPV 18) que son los encargados de la transcripción de los genes E6 y E7 (Desaintes *et al.*, 1997).

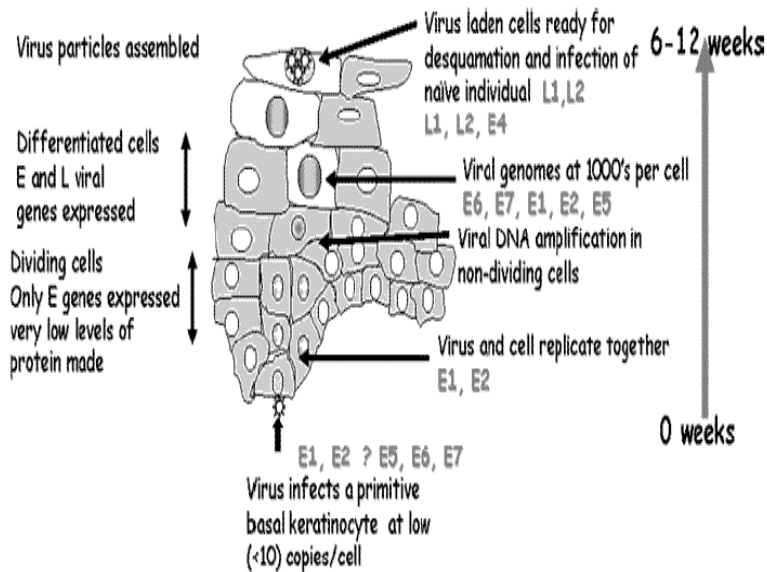
E4 es un gen que a pesar de estar localizado en la región temprana, es expresado desde el promotor de la región tardía (Strauss & Strauss, 2008).

Los genes E5, E6 y E7 codifican proteínas involucradas en la transformación celular (Strauss & Strauss, 2008). El papel de E5 no está completamente descrito, sin embargo, se ha observado que la proteína que codifica transforma indirectamente a la célula infectada, al alterar la actividad de proteínas de membrana involucradas en la proliferación celular (Fields *et al.*, 1996).

La proteína codificada por el gen E6 es una oncoproteína que se une a la proteína supresora de tumores p53 favoreciendo su degradación por ubiquitinación, lo cual causa un daño en el control del ciclo celular (Fields *et al.*, 1996; Lewin, 2007).

La proteína codificada por el gen E7 puede unirse a la proteína supresora de tumores pRb, a través de su extremo N-Terminal, así como a p107 y p130, provocando así que Rb deje libre al factor de transcripción E2F para que este pueda comenzar la transcripción de ciertos genes que permiten a la células continuar a la fase S del ciclo celular. (Lewin, 2007; Strauss & Strauss, 2008).

La región tardía se encuentra río arriba de la LCR y codifica para las proteínas estructurales L1 y L2, las cuales se transcriben y traducen exclusivamente en células diferenciadas del epitelio, siendo su principal función la de conformar la cápside de los viriones maduros en la infección productiva (Fields *et al.*, 1996) (Figura 7). La proteína L1 forma el 95% de la cápside y tiene un peso molecular de aproximadamente 55 kD, es la más antigénica y es capaz de auto-ensamblarse cuando es expresada sola, característica que ha sido utilizada para producir partículas pseudo-virales (VLP's) o pseudovirus (Hagensee *et al.*, 1993), los cuales han sido ampliamente utilizados en ensayos de infección así como en la activación de la respuesta inmune y vacunas (Knappe *et al.*, 2007; Buck *et al.*, 2003; Buck *et al.*, 2004).



No viraemia, no cytolysis or death, long infectious cycle

Fig. 7 Expresión de las proteínas virales en la infección productiva (Stanley *et al.*, 2007).

El HPV infecta la capa basal de los queratinocitos, en células en división solo se expresan bajos niveles de proteínas tempranas (E). En células diferenciadas se expresan los genes tempranos y tardíos (E y L). Las partículas virales se encuentran ensambladas cuando las células están por descamarse.

La proteína L2 forma el 5% restante de la cápside y tiene un peso molecular de 75 kD aproximadamente (Koutsky, 1997). Cuando L2 es co-expresada con L1, es capaz de incorporarse en la formación de las VLP's (Strauss & Strauss, 2008).

Los HPV's son virus especie-específicos y son capaces de infectar a la mayoría de los vertebrados superiores, tienen tropismo por las células del epitelio escamoso.

Las zonas de transformación entre los epitelios columnar y escamoso de las mucosas nasal, faríngea y cervical de humanos, son susceptibles a infectarse. Se conocen más de 100 tipos de HPV y se han subdividido en 2 clases debido a su capacidad oncogénica: de bajo riesgo, como los tipos 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 73, 81, y de alto riesgo como son los tipos 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 72, 73 (Zur-Hausen & de Villiers, 1994; Muñoz *et al.*, 2003).

Los tipos 16 y 18 de HPV se encuentran en el 70% de las biopsias de cáncer cérvico-uterino (CaCU) (Zur-Hausen & de Villiers 1994), siendo el tipo 16 el que se asocia al 50% del cáncer cérvico-uterino.

Los HPV's de alto riesgo son capaces de infectar a las células del estrato basal del epitelio escamoso estratificado, al cual tienen acceso por micro-heridas producidas durante el coito, o por partos múltiples.

Relación del HPV con los receptores celulares $\alpha 6\beta 4$ integrina y heparán sulfato

Se ha reportado que la proteína de membrana celular $\alpha 6\beta 4$ integrina, sirve como receptor del HPV tipo 16 (Yoon *et al.*, 2001; Evander *et al.*, 1997) en la infección viral, esta es expresada únicamente en la capa basal de las células del epitelio escamoso estratificado, que es el sitio de infección del virus, y se ha propuesto que una vez que los HPV llegan a su célula blanco, se produce una unión mediante la proteína L1 de la cápside viral del HPV a la $\alpha 6\beta 4$ integrina (Evander *et al.*, 1997).

Por otro lado, existen también estudios que proponen al Heparán Sulfato (HS) como co-receptor para la entrada del virus a la célula (Rommel *et al.*, 2005; Joyce *et al.*, 1999; Knappe *et al.*, 2007). En la infección por HPV se ha demostrado que el tipo 16 es capaz de utilizar al HS (Giroglou *et al.*, 2001) como primer sitio de unión celular (Shafti-Keramat *et al.*, 2003). Aún no ha sido claramente descrito el orden de la unión del HPV a los receptores celulares mencionados, sin embargo, existe evidencia de que la unión inicial se da a través del heparán sulfato (Shafti-Keramat *et al.*, 2003).

Así mismo, existen reportes donde el HS es utilizado como receptor celular por otros tipos virales, como sucede con los virus del dengue (en el cual funciona como receptor único para la infección viral) (Chen *et al.*, 1997), virus del herpes (Shukla & Splear, 2001) y el virus de la hepatitis B (Schulze *et al.*, 2007).

Tanto la $\alpha 6\beta 4$ como el HS, son receptores que se encuentran presentes en los queratinocitos humanos.

Las integrinas son receptores de membrana heterodiméricos compuestos de una combinación de una subunidad α más una subunidad β con especificidad para un ligando en particular, que median la unión intercelular y la unión célula-matriz extracelular (MEC) que puede conectar a varios componentes del citoesqueleto de actina y enzimas que participan en vías de señalización, a través de sus dominios intracelulares (Larsen *et al.*, 2006). También juegan un papel muy importante en la movilidad y regulación del ciclo celular.

La $\alpha 6\beta 4$ integrina tiene como ligando preferencial a la laminina 5 que es un componente importante de la membrana basal epidérmica (Tsuruta *et al.*, 2008), y ambos tienen como función el mantenimiento y remodelación del epitelio estratificado (Davis *et al.*, 2001). La unión de la $\alpha 6\beta 4$ integrina a su ligando dispara cascadas de señalización que pueden culminar río abajo con la activación de cinasas dependientes de ciclinas (cdk's) para fosforilar proteínas importantes en el ciclo celular (Schwartz & Assoian, 2001) y regulación de la apoptosis (Mainiero *et al.*, 1994)

El Heparán Sulfato es un polisacárido lineal que se encuentra presente en todos los tejidos animales, pertenece a la familia de proteoglicanos, que consisten en cadenas de glicosaminoglicanos unidos a una proteína en el centro lo que la convierte en una proteína altamente glicosilada (Kjellén & Lindall, 1991). El HS se puede encontrar en la superficie de la membrana celular o en la MEC. Su unión a distintos ligandos le permite regular una amplia variedad de actividades biológicas en procesos de desarrollo, angiogénesis, coagulación sanguínea y metástasis (Lindahl *et al.*, 1998).

ANTECEDENTES

En un estudio realizado en el laboratorio, se observó la sobre-expresión de la proteína survivina y de survivina fosforilada en biopsias de tejido infectado por virus del papiloma humano. Sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre dicho efecto no fue analizado, por tal motivo, en el presente trabajo nos dispusimos a analizar la relación de la infección por HPV con la sobre-expresión y fosforilación de la proteína survivina.

JUSTIFICACIÓN

Se sabe que muchos tipos de cáncer presentan una sobre-expresión de la proteína survivina, incluyendo al cáncer cérvico-uterino, cuyo principal factor etiológico es el virus del papiloma humano, por otro lado, se sabe también que el HPV se une al receptor celular $\alpha 6\beta 4$ integrina. Dado que se conoce que la unión de este receptor a su ligando es capaz de desencadenar cascadas de señalización involucradas en la sobrevivencia celular, proponemos que la unión de los pseudoviriones de HPV16 y HPV18 a la $\alpha 6$ integrina inducirá cascadas de señalización que activen por fosforilación a la proteína antiapoptótica survivina.

HIPÓTESIS

Se sabe que la infección por HPV induce un incremento en la expresión de survivina fosforilada en las células infectadas. Dado que se conoce que la activación de survivina se da a través de su fosforilación por cdc2 y que esta cinasa participa en vías de señalización activadas por receptores de tipo integrina, nos planteamos la siguiente hipótesis:

La fosforilación de survivina será inducida por la unión de los pseudoviriones de HPV16 y HPV18 a su receptor celular $\alpha 6\beta 4$ integrina.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la unión de los Virus de Papiloma Humano tipos 16 y 18, a los receptores $\alpha 6\beta 4$ Integrina y Heparán Sulfato, sobre la expresión y fosforilación de la proteína anti-apoptótica Survivina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Analizar la expresión de survivina y survivina fosforilada (Thr 34) en queratinocitos humanos inmortalizados, por inmunocitoquímica y western blot.
- 2.- Evaluar el efecto de la infección con pseudoviriones de HPV16 y HPV18 en la expresión del gen de survivina, por retrotranscripción (RT-PCR) y PCR en Tiempo Real (qRT-PCR).
- 3.- Analizar el efecto de la infección con pseudoviriones de HPV en la expresión de la proteína survivina y survivina fosforilada, por Western Blot.
- 4.- Determinar la participación de los receptores $\alpha 6\beta 4$ integrina y heparán sulfato en la regulación de Survivina mediada por la infección con los pseudoviriones de HPV.
- 5.- Analizar si la infección con pseudoviriones de HPV modifica los niveles de la cinasa de Survivina, cdc2.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Línea celular.

Para la realización de este proyecto se utilizó la línea celular HaCat, la cual es derivada de queratinocitos humanos de piel, que por una mutación espontánea han perdido la capacidad de diferenciarse, lo que la convierte en una línea inmortalizada, estas células presentan los receptores celulares α -6 integrina y Heparán Sulfato, que son utilizados por los HPV en la infección natural.

Las células HaCat fueron mantenidas en medio RPMI (In Vitro), suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y antibióticos 10,000 U/ μ g/ μ l (penicilina-estreptomicina, In Vitro), en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y humedad constante.

2.- Pseudoinfección de células HaCat con los pseudoviriones de HPV16 y HPV18 (fluorescencia).

Para los ensayos de infección se utilizaron pseudoviriones de HPV16 y HPV18 generados en células de mamífero (293TT), que presentan una cápside compuesta de la proteínas L1 y L2 la cual encapsula un plásmido que contiene un gen reportero que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), gentilmente donados por el Dr. Martin Sapp (Department of Microbiology and Immunology, Feist Weiller Cancer Center, and Center for Tumor Virology, LSU Health Sciences Center, Shreveport, LA, USA).

Se sembraron 50,000 células HaCat en cubreobjetos de 12 mm de diámetro dentro de placas de 24 pozos, con 1 ml de medio RPMI suplementado con SFB más antibióticos y se incubaron a 37°C por 2 horas para que las células pudieran adherirse a los cubreobjetos. Posteriormente, se adicionaron diluciones de 10, 5 y 2.5 μ l de los pseudoviriones, y se incubaron a 37°C por 72 horas. Transcurrido el tiempo, se realizaron 3 lavados en cada pozo con 100 μ l de PBS al 1% estéril. Para fijar las células se adicionaron 100 μ l de paraformaldehído al 1% en PBS a cada pozo y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron retirados de cada pozo y secados para montarse en laminillas utilizando medio de montaje para fijar fluorescencia (Fluorescing Mounting Medium, Dako Cytomation). Las células fueron observadas y cuantificadas en un microscopio de fluorescencia (Axiovert, Zeiss) a 20X, utilizando un filtro para FITC,

3.- Extracción de RNA.

El RNA total fue extraído de 1×10^6 células HaCat, utilizando el kit *RNeasy Mini kit* (Qiagen). Todos los reactivos y material utilizados de la misma marca para la extracción, fueron libres de RNAsas. Las células fueron despegadas con 2 ml de verseno y se pasaron a un tubo en donde fueron centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, se tiró el sobrenadante y se agregaron 350 μ l de buffer RLT, se resuspendieron las células y se agitaron en vórtex por 1 minuto. Se añadieron 350 μ l de etanol al 70% y se pipeteó ligeramente. Un volumen máximo de 700 μ l se transfirió a una columna de sílica gel y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 segundos, el líquido filtrado fue desechado. Se adicionaron 700 μ l de buffer RW1 a la columna y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 segundos, se desechó el sobrenadante y posteriormente se adicionaron 500 μ l de buffer RPE (preparado con etanol), se centrifugó a 10,000 rpm por 15 segundos, se adicionaron 500 μ l de buffer RPE y se centrifugó a 10,000 rpm por 2 minutos. Se transfirió la columna a un tubo colector nuevo de 1.5 ml. Para eluir se adicionaron 30 μ l de H₂O y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 minuto, repitiendo este último paso.

El RNA fue cuantificado a 230 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop, ND-100) y fue almacenado a -80°C hasta su uso posterior.

4.- Análisis de la expresión del gen de survivina.

Se realizó la retro-transcripción del RNA total extraído de células HaCat, por medio del kit *QiagenSuper Script One Step, RT-PCR with platinum Taq* (Invitrogen), utilizando los oligonucleótidos Sur-F: 5' *GGA CCA CCG CAT CTC TAC AT* 3' y Sur-R: 5' *GCA CTT TCT TCG CAG TTT CC* 3', que amplifican 338 pb del gen que codifica para survivina humana (Kania J, 2003). La retrotranscripción se hizo a 50°C por 30 min, seguida de la activación de la Taq polimerasa (2 U) a 95°C por 15 min, para cada reacción se utilizaron 0.3 μ M de los oligos Sur-F y Sur-R, 10 μ l de Master Mix, 2 mM de dNTP's, 10 μ l de buffer RT-PCR 5X y agua libre de RNAsas para un volumen final de 20 μ l. Una vez teniendo el cDNA, se realizaron 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1 min, con una extensión final a 72°C por 10 min.

El producto de la reacción se analizó en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (EtBr), y se fotografió en un documentador de geles (Gel Logic 2000 Imaging System, Kodak).

5.- Diferencia cuantitativa en la transcripción del gen de survivina (qRT-PCR).

Para este ensayo utilizamos células HaCat no infectadas, e infectadas con los pseudoviriones de HPV16 y HPV18 a los 15 minutos, 30 minutos y 60 minutos de infección. El cDNA se obtuvo partiendo de 1 µg de RNA molde, para cada tratamiento, utilizando el kit *Super Script III* (Invitrogen), por reacción se utilizaron 10 µl de RT Reaction Mix 2X, 2 µl de RT Enzyme Mix, 1 µg de RNA y agua tratada con DEPC para obtener un volumen final de 20 µl. Cada tubo con la mezcla anterior, se incubó a 25°C por 10 min, seguido de una incubación a 50°C por 30 min, la reacción se terminó a 85°C por 5 min, se dejó en hielo y se adicionó 1 µl (2U) de RNasa H de *E.coli*, finalmente se realizó una incubación a 37°C por 20 min. El cDNA obtenido fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

Para estandarizar la dilución de cDNA molde que era amplificable, se hicieron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10,000, partiendo de un stock de 50 ng/µl de cDNA; en cada pozo para placa de qRT-PCR en un volumen final de 20 µl por pozo. Se realizó una normalización de 6 genes, para encontrar un gen de referencia utilizando el kit *geNorm Kit* para uso con SYBR Green.

La reacción de PCR en tiempo real fue llevada a cabo con el agente intercalante SYBR Green (*SYBR GreenER qPCR Super Mix*, Invitrogen), mezclando 10 µl de SYBR Green, 2.5 ng de cDNA, 200 y 300 nM de los oligonucleótidos para el gen de referencia (House Keeping Gene) y para survivina, respectivamente, y agua grado molecular para llevar a un volumen final de 20 µl por reacción, cada tratamiento se hizo por triplicado. Como gen de referencia se utilizó B2M (mioglobulina β2), para obtener la diferencia de expresión con cada muestra.

El programa de amplificación consistió en una primera incubación a 50°C por 2 min (UDG), una segunda incubación a 95°C por 10 min (activación de Taq) y 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min, en un termociclador ABI-PRISM 7000. Como controles negativos se utilizaron una muestra con el RNA que se utilizó como templado y otra sin RNA, para asegurar que no hubiera contaminación con DNA.

Para el análisis de los resultados se llevaron los procedimientos estándar de obtención de ΔCt (cociente de muestra – gen de referencia), $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt del tratamiento – ΔCt del negativo) y el exponente $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

6.- Inmunocitoquímica.

Se sembraron 200,000 células HaCat en cubreobjetos de 12 mm de diámetro dentro de placas de 24 pozos. Después de 2 horas, una vez que las células se adhirieron se les retiró el medio y se hicieron 2 lavados con 150 µl de PBS cada uno. Las células fueron fijadas con 150 µl de metanol frío por 10 minutos. La peroxidasa endógena fue bloqueada con 150 µl de una solución de peróxido de hidrógeno al 1% en metanol, por 10 minutos a temperatura ambiente. Para bloquear sitios inespecíficos en la célula, se adicionó a cada pozo 150 µl de una solución de suero fetal bovino 1:4 en TBST/BSA (Bovine Serum Albumin, Roche) (Apéndice 1), por 30 minutos a temperatura ambiente.

Los anticuerpos anti-survivina (Abcam) que reconoce a la molécula de survivina humana completa, y anti-survivina fosforilada (Santa Cruz) que reconoce un péptido que corresponde a una secuencia corta de aminoácidos que contiene la Thr 34 fosforilada de survivina humana, fueron diluidos 1:100 en TBS/T/BSA, se adicionaron al pozo correspondiente y se dejaron incubando por 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (HRP: Horseradish Peroxidase) diluido 1:500 en TBST/BSA, por 45 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados con TBST/BSA, un lavado con PBS y un último lavado con agua desionizada. Como sistema de cromógeno para desarrollar la tinción se utilizó el kit Bajoran Purple (Biocare Medical) preparado al momento, en 1.25 ml de buffer que contenía 16 µl del reactivo A, más 16 µl del reactivo B y 16 µl del reactivo C, se agitó en vórtex y se adicionaron 100 µl a cada cubreobjeto, se dejó incubando por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizó una contratinción con hematoxilina para resaltar los núcleos celulares, por 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con agua desionizada hasta que no quedó rastro de colorante. Para su análisis al microscopio, los cubreobjetos fueron montados en laminillas utilizando una gota de medio de montaje (Cover care, Biocare Medical). Las laminillas fueron analizadas en un microscopio óptico (Zeiss) a un aumento de 20X.

7.- Análisis de proteínas por Western Blot.

Se cosecharon 2×10^6 células HaCat de placas de cultivo para extraer proteína total. Las células fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos y posteriormente resuspendidas en 500 µl de buffer de lisis NP-40 (Apéndice 2) mantenido en hielo. Para lisar las células por completo se hicieron pasar 3 veces por una aguja de insulina estéril. Se cuantificó la proteína total utilizando el kit BioRad-DC Protein assay para microplato, con 5 µl de la muestra más

25 µl del reactivo A, más 200 µl del reactivo B, se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 750 nm en un lector de ELISA (BIOTEK, ELx800). El extracto celular fue diluido en un volumen igual de buffer de carga SDS-PAGE 2X. Como control positivo, se utilizó 1µl de survivina recombinante humana (R&D Systems). Para desnaturalizar las proteínas, las muestras se hirvieron a 95°C durante 5 minutos, posteriormente fueron cargadas por microgramo de proteína en un gel de poliacrilamida al 14% de acrilamida (Apéndice 5, 6) y se corrió la electroforesis a 2000 V por 1 hora aproximadamente (Apéndice 3). Se realizó la transferencia a una membrana de PVDF (Immobilon P^{SQ}, Millipore) a 300 mA por aproximadamente 1 hr a 4°C en buffer de transferencia con 10% de metanol (Apéndice 4).

La membrana fue bloqueada con 10 ml de una solución al 3% de BSA en TBST/BSA (Apéndice 1), a 4°C toda la noche. Posteriormente se realizaron 3 lavados con TBST de 15 minutos cada uno, en un rotor (LabRoller II) a 20 rpm, se incubó primeramente con el anticuerpo primario anti-survivina fosforilada (Thr34) (Santa Cruz) diluido 1:250 en TBST/BSA, a temperatura ambiente por una hora, en el rotor. Se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con TBS/Tween 20. Se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a HRP (Zymed) diluido 1:5000 en TBST/BSA y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en el rotor.

El anticuerpo primario anti-survivina (Abcam) fue utilizado en una dilución 1:500 en TBS-T/1%BSA, incubando a temperatura ambiente por 1 hora. Como anticuerpo secundario se utilizó el mismo anti-IgG de conejo mencionado anteriormente.

El anticuerpo anti-cdc2 (E161, Abcam) fue utilizado en una dilución 1:4000 en TBST/BSA, y las incubaciones y lavados fueron realizados de la misma manera que para los anticuerpos anteriores, como anticuerpo secundario se utilizó un anti-conejo acoplado a HRP (ZYMED) en una dilución 1:5000 en TBS-T/1%BSA.

Todas las membranas fueron verificadas con un control de carga, utilizando el anticuerpo primario anti-β actina (Abcam) en una dilución 1:1000 en TBST/BSA, y como anticuerpo secundario un anti-IgG de ratón acoplado a HRP (ZYMED) en una dilución 1:5000 en TBST/BSA.

Para poder revelar la misma membrana utilizando distintos anticuerpos, fue limpiada utilizando 12.4 ml de Tris 0.5 M pH 6.8, más 20 ml de SDS al 10 % aforados a 100 ml con agua desionizada más 750 µl de β-mercaptoetanol (Stripping Buffer), se adicionaron 20 ml de stripping buffer a la membrana y se incubó a 50°C por 35 min. Posteriormente, se lavó

con agua destilada hasta que desapareció el olor del β -mercaptoetanol. La membrana fue equilibrada con TBST por 10 minutos en agitación a temperatura ambiente y se bloqueó con una solución TBST/BSA a 4°C toda la noche.

El revelado se hizo por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL Plus (Amersham), una vez que se retiró el anticuerpo secundario, la membrana fue lavada 3 veces con TBST y se agregaron 1 ml del reactivo A más 25 μ l del reactivo B, se dejó incubando por 5 minutos y se colocó una placa autorradiográfica (Kodak). La placa se expuso de 1 a 5 minutos en el cassette de exposición en el cuarto oscuro, se introdujo en el revelador y posteriormente en el fijador (ambos de la marca Kodak, Apéndice 7, 8) hasta observar a simple vista las bandas correspondientes.

8.- Pseudoinfección de células HaCat con los pseudoviriones HPV18 (extracción de proteína).

Se sembraron 1×10^6 células HaCat en placas de 6 pozos, con 2 ml de medio RPMI, cada pozo fue incubado con 10 μ l de pseudoviriones de HPV18 a distintos tiempos: 15, 30 y 60 min, 1, 2, 6, 12, 24 y 48 horas, además de un control que no fue incubado con pseudoviriones, se mantuvieron a 37° C.

Las células fueron cosechadas y se les extrajo proteína total de la manera previamente descrita, utilizando el buffer de lisis NP-40 adicionado con inhibidores de proteasas y de fosfatasas (ZYMED) al 10% y 1%, respectivamente. Los extractos proteicos se alicuotaron y se guardaron a -80° C hasta su utilización.

9.- Inhibición de los receptores celulares heparán sulfato y $\alpha 6$ integrina.

Se sembraron 1×10^6 células HaCat en placas de 6 pozos.

Como controles se utilizaron células HaCat y células HaCat más 10 μ l de pseudoviriones de HPV18, se incubaron por 2 hr a 37°C.

Para el primer tratamiento, las células fueron incubadas con 2 U de Heparinasa I (SIGMA) en buffer de digestión que contenía 20 mM de Tris-HCl pH=7.5, 50 mM de NaCl, 4 mM de CaCl_2 y 0.01% de BSA, en un volumen final de 2 ml, por 1 hr a 37°C, transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS pH=6.8, se les agregó medio nuevo y se incubaron con 10 μ l de pseudoviriones de HPV18 por 2 hr a 37°C.

Para el segundo tratamiento, las células fueron incubadas con 10 μ g de un anticuerpo anti $\alpha 6$ integrina (CD49f, Millipore), en 2 ml de PBS, por 1 hr a 37°C, transcurrido este tiempo

se realizaron 3 lavados con PBS, se les agregó medio nuevo y se incubaron con 10 μ l de pseudoviriones de HPV18 por 2 hr a 37°C.

Para el tercer tratamiento, las células fueron incubadas primeramente con heparinasa (de la misma forma que en el primer tratamiento) y posteriormente con el anticuerpo anti α 6 integrina (de la misma manera que en el segundo tratamiento), para finalizar se agregaron 10 μ l de pseudoviriones de HPV18 y se mantuvieron por 2 hr a 37°C.

10.- Ensayos de inducción de apoptosis

Para conocer la dosis letal media (DL₅₀) del antineoplásico cisplatino en células HaCat, se realizó un ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), el cual es un método ampliamente utilizado para medir la viabilidad celular mediante la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul conocido como formazan, permitiendo así determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido.

En una placa de 96 pozos se sembraron 50,000 células HaCat con 200 μ l de medio RPMI, se incubaron a 37°C por 2 horas, después de la adhesión celular, se agregaron distintas concentraciones de cisplatino (Blastolem RU, Lemery) (0, 0.25, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.25, 1.5, 2, 5, 10, 12.5, 15, 20, 22.5 y 25 μ g/ μ l.) y se incubaron nuevamente a 37°C por 24 horas, se retiró el medio y se hizo un lavado con PBS, se adicionaron 200 μ l de medio fresco a cada pozo más 50 μ l de MTT (1mg/ml de PBS, SIGMA) y se incubó a 37°C por 2 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio, se hizo un lavado con PBS y se adicionaron 200 μ l de isopropanol a cada pozo, los cuales fueron resuspendidos y cambiados a pozos limpios, inmediatamente se realizó una lectura espectrofotométrica a 570 nm en el lector de ELISA.

Para conocer el efecto de la infección con los pseudoviriones de HPV16 y HPV18 sobre la apoptosis producida por cisplatino, en placas de 96 pozos se sembraron 50,000 células HaCat en cada pozo, se incubaron a 37°C por 2 horas para que se adhirieran las células, posteriormente fueron infectados pozos por duplicado en un intervalo de 1, 2, 6, 24 y 48 horas, con los pseudoviriones de HPV16 y HPV18 (1.5 μ l c/u). Transcurrido el tiempo de infección, se les agregó la DL₅₀ de cisplatino y se dejaron incubando a 37°C por 24 horas. Posteriormente se realizó el ensayo de MTT y se realizó la lectura a 570nm.

Los ensayos fueron realizados por triplicado.

11.- Análisis Estadístico

Para la realización de los análisis estadísticos se utilizaron análisis de varianza y la Prueba Post hoc de Tukey, estableciendo un criterio de significancia de $P < 0.05$.

RESULTADOS

1.- Corroboración de la capacidad infecciosa de los pseudoviriones .

Para conocer la cantidad necesaria de pseudoviriones capaces de infectar a las células HaCat, se evaluaron 3 volúmenes distintos, los cuales fueron 10, 5 y 2.5 μl de pseudoviriones de HPV16. Después de 72 hrs, las células fueron observadas en el microscopio de fluorescencia a un aumento de 20X. No hubo mayor diferencia en la fluorescencia (generada por la GFP reportera de los pseudoviriones) cuando se infectaron con 10 ó 5 μl , mientras que las células infectadas con 2.5 μl presentaron una fluorescencia menor. Por lo que decidimos tomar como volumen óptimo el de 5 μl , ejemplo mostrado en la figura 8.

Estos datos nos sirvieron para conocer la concentración apropiada de pseudoviriones para realizar posteriores experimentos.

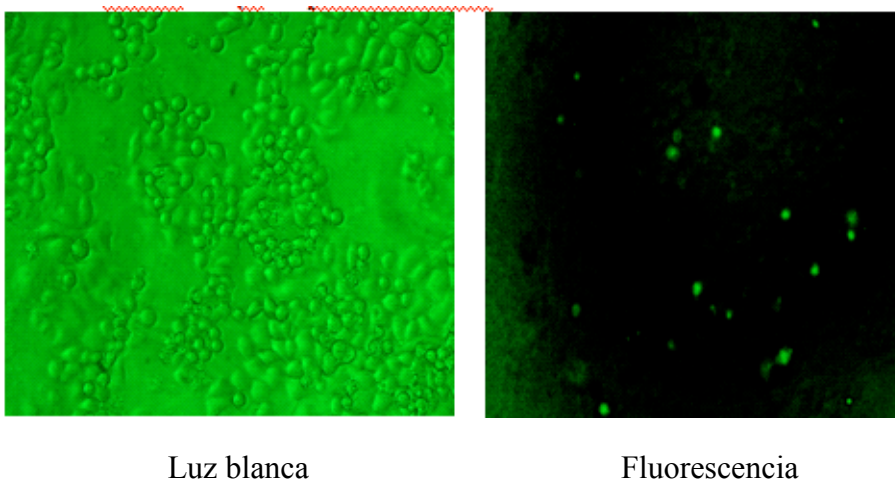


Fig. 8.- Infección de células HaCat con pseudoviriones de HPV16. Monocapas de células HaCat fueron infectadas con 5 μl de pseudoviriones de HPV16. La expresión del gen reportero que codifica la proteína verde fluorescente se evaluó a las 72 horas por microscopía de fluorescencia (20X).

2.- Expresión del gen de Survivina en células HaCat.

Para conocer la expresión basal del gen de survivina en células HaCat, se realizó un RT-PCR de punto final. Se extrajo el RNA total y se utilizó como molde para obtener cDNA y amplificar con los oligonucleótidos correspondientes a dicho gen (sección 2.4). Se obtuvo un amplicón de 338 pb, correspondiente al gen de survivina. Gracias a esta observación se pudo determinar que existe una expresión basal del mensajero del gen de survivina (Figura 9) en las células utilizadas para este estudio.

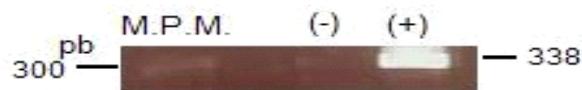


Fig. 9.- RT-PCR de punto final del gen de survivina. MPM: Marcador de peso molecular 100bp, (-) control negativo se utilizaron todos los reactivos excepto la retrotranscriptasa, (+) amplicon de survivina del RNA extraído de células HaCat.

3.- Efecto de la infección con pseudoviriones de HPV16 y HPV18 sobre la activación de la transcripción del gen de Survivina.

Para determinar el efecto de la infección por HPV sobre la activación transcripcional de survivina, se analizó el RNA total extraído de células no infectadas e infectadas con los pseudoviriones de HPV16 y HPV18 a 4 tiempos distintos en el lapso de una hora (es decir, 15, 30 y 60 minutos). El amplicon de 338 pb obtenido, correspondiente al gen de survivina no mostró diferencias a simple vista entre los distintos tiempos de pseudoinfección, así como tampoco entre la pseudoinfección realizada con los 2 tipos virales 16 y 18 (Figura 10). Dicha observación no fue concluyente ya que el ensayo realizado fue un RT-PCR de punto final que es solamente cualitativo.



Fig. 10.- Expresión del gen de survivina en células infectadas con los pseudoviriones de HPV16 (A) y HPV18 (B). MPM: Marcador de Peso Molecular 100 bp, (-) como control negativo se utilizaron todos los reactivos excepto la retrotranscriptasa. 1: Células HaCat sin pseudoviriones, 2: 15 minutos de infección, 3: 30 minutos de infección, 4: 60 minutos de infección.

4.- Activación transcripcional del gen de Survivina en células infectadas con pseudoviriones de HPV16 y HPV18.

Para corroborar con detalle si había una diferencia en la transcripción del gen de survivina, mediada por la infección con los pseudoviriones de HPV16 y HPV18 (psHPV16 y psHPV18), se realizó un PCR en tiempo real (qRT-PCR “quantitative Real Time-PCR”) con el cDNA obtenido de las células no infectadas e infectadas con ambos tipos de pseudoviriones, utilizando los mismos tiempos que en la sección anterior (Figura 11). Se observó que no hubo un incremento significativo ($P=0.581$) en la transcripción de las células infectadas con los pseudoviriones de HPV16.

De manera interesante, observamos que en las células infectadas con los pseudoviriones de HPV18 hubo un incremento significativo en la transcripción del gen de survivina a través del tiempo, a los 15 y 30 minutos de infección la transcripción de survivina fue mayor al nivel basal sin llegar a ser significativo ($P>0.05$). En contraste, a los 60 minutos de infección el incremento en la transcripción de survivina fue de aproximadamente 10 veces con respecto al nivel basal ($P<0.0001$) (Figura 12). Estos resultados indican que la infección con los pseudoviriones de HPV18, regula positivamente la transcripción del gen de survivina.

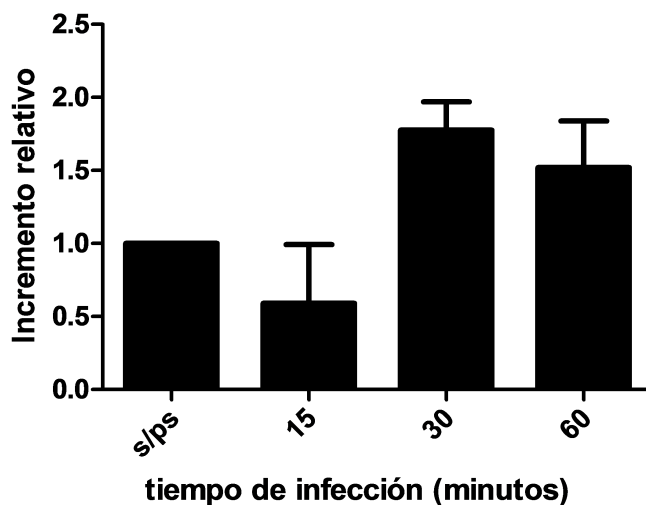


Fig. 11.- Activación transcripcional del gen de survivina en las células infectadas con pseudoviriones de HPV16. s/ps: células HaCat sin pseudoviriones. Tiempo de infección con pseudoviriones a los 15, 30 y 60 minutos.

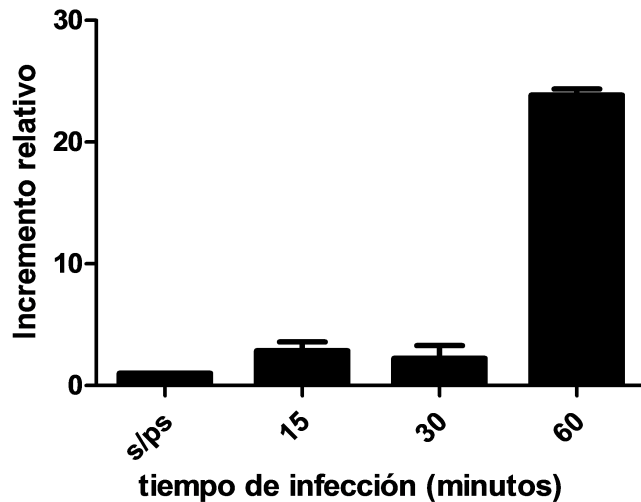


Fig. 12.- Activación transcripcional del gen de survivina en las células infectadas con pseudoviriones de HPV18. s/ps: células sin pseudoviriones. Tiempo de infección a los 15, 30 y 60 minutos.

5.- Expresión basal de la proteína Survivina en las células.

Como un primer acercamiento para conocer de manera cualitativa el nivel basal de la expresión de la proteína survivina y survivina activa (fosforilada en la Thr 34) presente en las células HaCat, se realizó una inmunocitoquímica.

Como puede observarse en la Figura 13, las células HaCat tuvieron una tinción positiva para survivina y survivina fosforilada, principalmente en el citoplasma, indicando que existe un nivel basal en la expresión survivina, además de que alguna proporción está fosforilada. El control negativo al cual no se le agregó anticuerpo primario, solo presentó núcleos azules debido a la contratinción con hematoxilina.

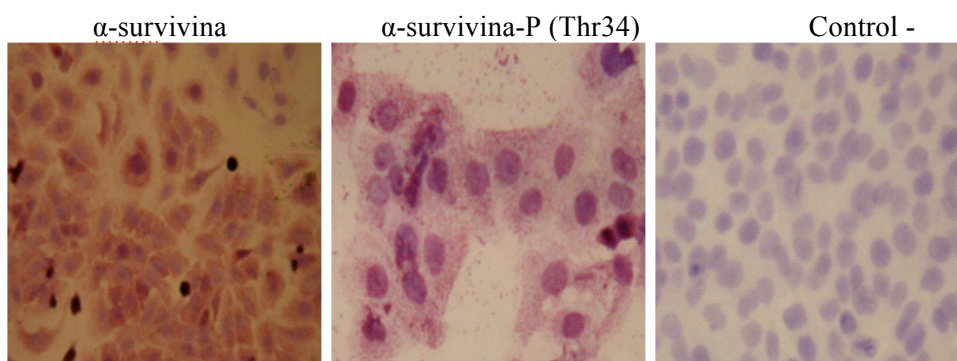


Fig. 13.- Inmunocitoquímica de células HaCat (aumento 20 X). Survivina total (izquierda), survivina fosforilada (centro) y control negativo (derecha) al cual no se le agregó anticuerpo primario.

6.- Efecto de la infección con pseudoviriones de HPV18 sobre la expresión de la proteína Survivina.

Una vez conocido el incremento en la expresión transcripcional de survivina mediado por la infección de los pseudoviriones de HPV18, nos dimos a la tarea de analizar la expresión de la proteína, así como la fosforilación de la misma. Para ello, se infectaron células con pseudoviriones de HPV18 en tiempos de 15, 30 y 60 minutos, así como a las 2, 6, 12, 24 y 48 horas, estos últimos reportados en estudios de evaluación de la proteína. La expresión proteica fue evaluada por Western Blot.

En la Figura 14 podemos observar que la proteína Survivina (16.5 kDa) muestra una tendencia a incrementar su expresión dependiente del tiempo de infección. Observamos que a las 6 horas hay un pico en la expresión, la cual va disminuyendo como se puede apreciar a las 48 horas. Por otro lado, pudimos observar que la fosforilación de la proteína (pSurvivina) muestra la misma tendencia a incrementar su expresión, la cual es visible a partir de los 30 minutos de infección, presentando un pico a las 2 horas que se mantiene hasta las 12 horas y posteriormente disminuye.



Fig. 14.- Western Blot. Efecto de la infección con pseudoviriones de HPV18 en la expresión de la proteína Survivina. Los tiempos de infección fueron de 0, 15, 30 y 60 minutos, así como 2, 6, 12, 24 y 48 horas. Las imágenes corresponden a los blots de Survivina, Survivina fosforilada y β-actina (control de carga).

7.- Efecto de la inhibición de los receptores $\alpha 6\beta 4$ integrina y heparán sulfato en la expresión de la proteína survivina.

Con la finalidad de determinar si el incremento en la expresión de survivina es mediado por la unión de los pseudoviriones a los receptores celulares $\alpha 6\beta 4$ integrina y heparán sulfato que son utilizados por el HPV para infectar a las células, se realizó un ensayo de inhibición pre-incubando a las células ya sea con heparinasa para digerir los residuos sulfatados del heparán sulfato, o con el anticuerpo CD49f que es dirigido contra el complejo $\alpha 6\beta 4$ integrina para bloquear la unión a sus ligandos, y con ambos. Posteriormente se realizó el ensayo de infección, se extrajo proteína total y se analizó la expresión de survivina por Western Blot.

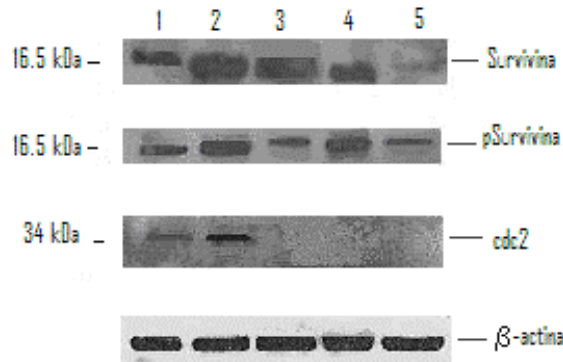
En la Figura 15 podemos apreciar claras diferencias en la expresión de la proteína survivina, la cual se incrementó cuando las células fueron infectadas con los pseudoviriones de HPV18, y las células fueron tratadas previamente con heparinasa, la expresión de survivina fue menor a la presentada cuando las células fueron infectadas con los pseudoviriones de HPV18, pero fue el doble de la expresión en las células que no recibieron ningún tratamiento. Por otro lado, cuando las células fueron pre-incubadas con el anticuerpo anti-integrina CD49f, la expresión de survivina mostró un nivel ligeramente mayor al de las células no infectadas. De manera interesante, cuando la infección fue antecedida de una incubación con heparinasa y con el anticuerpo anti-integrina, la expresión de survivina disminuyó aproximadamente al nivel que presentó en las células no infectadas, de acuerdo a la densitometría realizada (Figura 16).

El mismo comportamiento fue observado en la expresión de survivina fosforilada, donde podemos apreciar que en la infección con los pseudoviriones de HPV18, el nivel de expresión aumenta con respecto a las células que no fueron infectadas, cuando las células fueron pre-incubadas con heparinasa el nivel de expresión disminuye con respecto a las células que fueron infectadas con los pseudoviriones pero es ligeramente mayor a la expresión de las células que no recibieron ningún tratamiento. Cuando las células fueron pre-incubadas con el anticuerpo anti-integrina, el nivel de expresión fue similar al que presentan las células que no fueron infectadas, y nuevamente, cuando la infección es antecedida de la incubación con heparinasa y el anticuerpo anti-integrina, el nivel de expresión es muy similar al que presentan las células que no fueron infectadas.

Como un acercamiento a la cascada de señalización que se desencadena en la activación de survivina, mediada por la unión de los pseudoviriones a sus receptores, analizamos el nivel de expresión de la cinasa cdc2 que se sabe es la encargada de fosforilar a survivina. Lo que

se aprecia en las Figuras 16 y 17 es que la expresión de *cdc2* aumenta con la infección de los pseudoviriones, con respecto a las células que no fueron infectadas, y ya no es visible cuando las células fueron pre-incubadas con heparinasa, con el anticuerpo anti- integrina y con ambos.

Como control de carga se utilizó anti- β actina.



Pseudoviriones	-	+	+	+	+
Heparinasa	-	-	+	-	+
Anticuerpo anti-integrina	-	-	-	+	+

Fig. 15.- Western Blot. Efecto de la inhibición de los receptores $\alpha 6\beta 4$ integrina y heparán sulfato en la expresión de survivina, survivina fosforilada y *cdc2*, utilizando Heparinasa y/o el anticuerpo anti-integrina CD49f.

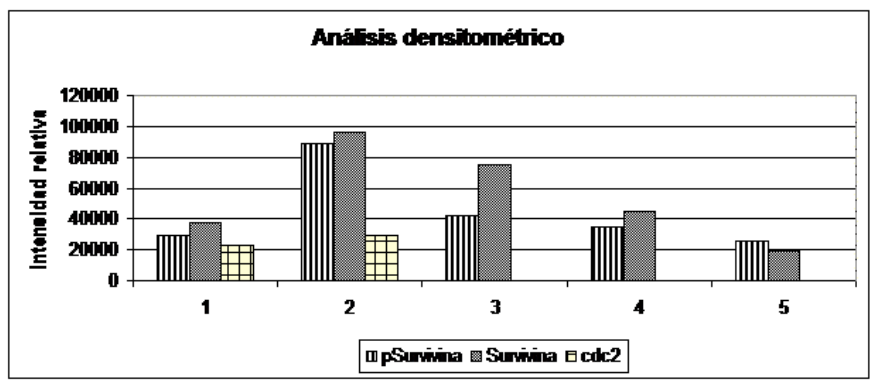


Fig. 16.- Análisis densitométrico de la expresión de Survivina fosforilada (pSurvivina), Survivina y *cdc2* en 1) células HaCat, 2) Infección con los pseudoviriones de HPV18, 3) Incubación con heparinasa, 4) Incubación con el anticuerpo anti-integrina CD49f y 5) Incubación con heparinasa y el anticuerpo CD49f.

8.- Efecto de la infección con los pseudoviriones de HPV16 y HPV18 en la inducción de apoptosis por cisplatino en células HaCat.

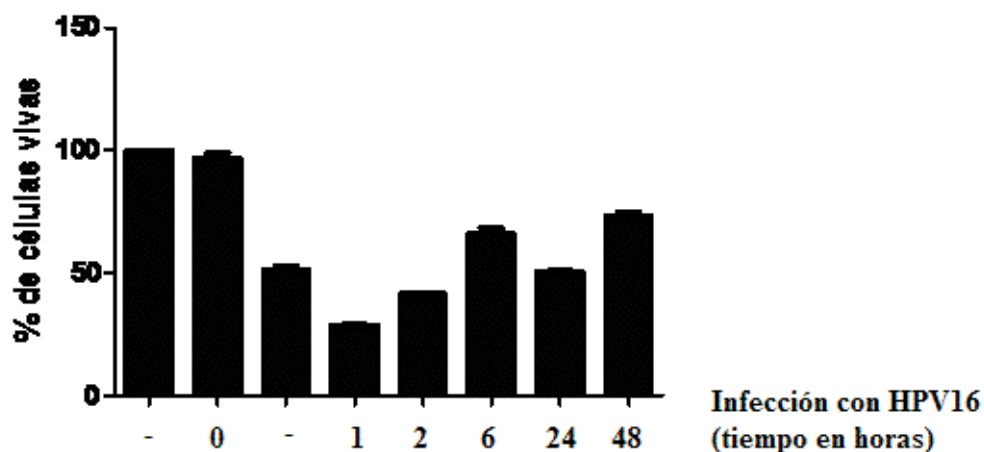
Nuestros resultados indican que la infección con HPV18 induce una sobre expresión de Survivina, y dado que esta es una proteína antiapoptótica, realizamos un ensayo para conocer si dicha sobreexpresión podría afectar la apoptosis de las células al ser tratadas con el quimiofármaco cisplatino (CisPl), el cual es utilizado en las terapias contra el cáncer cérvico-uterino.

Como primer paso para conocer la sensibilidad de las células HaCat al cisplatino, se realizó una curva mediante el ensayo de MTT, probando distintas concentraciones de cisplatino por 24 hr, dando como resultado una Dosis Letal media (DL_{50}) de 1.25 mg/ml.

Posteriormente, se realizó un ensayo en el cual las células fueron infectadas con los pseudoviriones de HPV16 y HPV18 por diferentes tiempos e inmediatamente tratadas con la DL_{50} de cisplatino.

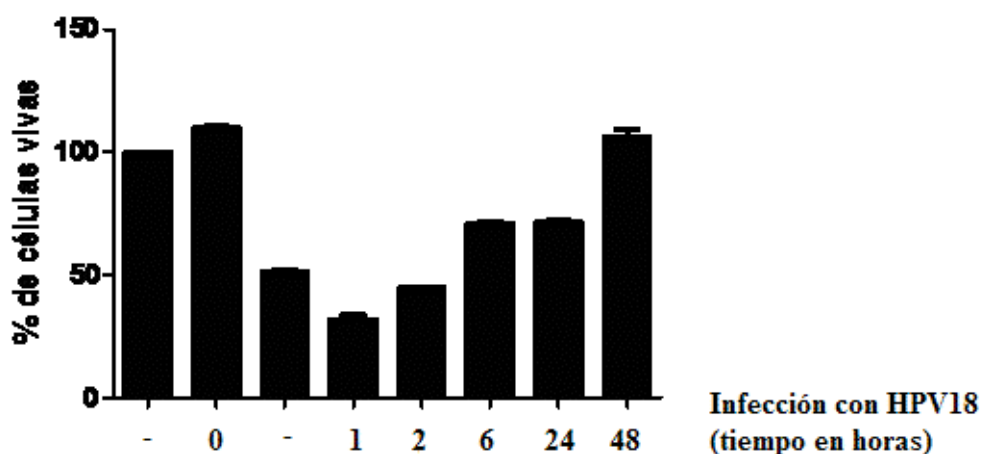
Los resultados muestran que la infección con pseudoviriones de HPV16 tienen un efecto en la sobrevivencia al cisplatino que depende del tiempo de infección. Como se muestra en la Figura 17, la infección por 1 y 2 horas no mostró efecto sobre el número de células vivas después de la exposición a cisplatino. Sin embargo, la infección por 6 y 48 horas, indujo un incremento del 21.1% y 25% ($P < 0.05$) respectivamente en el número de células vivas después del tratamiento con cisplatino.

De igual manera, la infección con pseudoviriones de HPV18 mostró un efecto en la sobrevivencia al cisplatino dependiente del tiempo de infección. Como se muestra en la Figura 18, la infección por 1 y 2 horas no mostró efecto sobre el número de células vivas después de la exposición a cisplatino. Sin embargo, la infección por 6, 24 y 48 horas, indujo un incremento del 25.1%, 25.5% ($P < 0.05$) y 50% ($P < 0.0001$) respectivamente, en el número de células vivas después del tratamiento con cisplatino. De manera interesante, la infección con pseudoviriones de HPV18 en ausencia de cisplatino, indujo un aumento del 10% de células vivas, en comparación con las células que no fueron infectadas.



Cisplatino (DL ₅₀)	-	-	+	+	+	+	+	+
--------------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---

Fig. 17.- Efecto de la infección con pseudoviriones de HPV16 sobre la muerte de células HaCat inducida por cisplatino. (-) Células que no fueron infectadas con los pseudoviriones de HPV16. (0) Células infectadas con los pseudoviriones de HPV16 en ausencia de cisplatino. 1, 2, 6, 24 y 48 horas de infección con los pseudoviriones de HPV16.



Cisplatino (DL ₅₀)	-	-	+	+	+	+	+	+
--------------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---

Fig. 18.- Efecto de la infección con pseudoviriones de HPV18 sobre la muerte de células HaCat inducida por cisplatino. (-) Células que no fueron infectadas con los pseudoviriones de HPV18. (0) Células infectadas con los pseudoviriones de HPV18 en ausencia de cisplatino. 1, 2, 6, 24 y 48 horas de infección con los pseudoviriones de HPV18.

DISCUSIÓN

La infección recurrente por HPV de alto riesgo es el principal factor etiológico en el desarrollo del cáncer cérvico-uterino. Actualmente se tiene conocimiento de las proteínas virales oncogénicas, así como el mecanismo que utilizan en la transformación de las células infectadas. Sin embargo, hasta ahora se conoce muy poco sobre las primeras etapas de la infección en las células epiteliales, ocasionada por el HPV y su interacción con los receptores presentes en dichas células que desemboca en señales que permiten continuar con la malignización de estas.

En el presente trabajo estudiamos el efecto de la infección por HPV en la expresión y fosforilación de la proteína survivina, la cual es de gran importancia debido a su función dual como reguladora del ciclo celular y como inhibidora de la apoptosis, para tener una aproximación de lo que sucede en las etapas iniciales de la infección.

En la realización de este trabajo se utilizó la línea celular HaCat, la cual fue derivada de queratinocitos humanos transformados espontáneamente durante el cultivo. Estas células no son de origen tumoral, sin embargo cuando fueron analizadas por RT-PCR se observó una expresión basal del gen de survivina. Es probable que la expresión de survivina sea un evento asociado con el ciclo celular de las células que forman parte de un cultivo asincrónico, ya que se ha descrito que survivina se expresa preferencialmente durante la fase G2-M del ciclo (Ambrosini *et al.*, 1997), y que participa durante la división celular formando parte del complejo de proteínas asociadas al centrómero (Honda *et al.*, 2003; Wheathley *et al.*, 2004).

Dado que el interés principal del presente trabajo era estudiar el efecto de la infección en etapas tempranas por HPV16 y HPV18 sobre la expresión de survivina, realizamos infecciones de células HaCat con pseudoviriones derivados de ambos tipos virales. Al analizar el efecto de la infección sobre la expresión del gen de survivina por PCR en tiempo real, observamos un incremento de la expresión del gen de survivina dependiente del tiempo en células infectadas con HPV18 ($P < 0.0001$). Sin embargo, la infección con HPV16 no produjo cambios detectables en la expresión del gen de survivina ($P > 0.05$). La sobreexpresión de survivina en células infectadas con HPV18 podría explicar en parte la agresividad reportada para este tipo de virus, el cual se asocia con el desarrollo acelerado de adenocarcinomas (Arends *et al.*, 1993).

Nuestros resultados indican que la infección por HPV18 induce un incremento en la expresión del gen de survivina. La sobre-expresión de survivina ha sido asociada principalmente con etapas avanzadas de diferentes cánceres humanos (Kim *et al.*, 2010; Krepela *et al.*, 2009; Nouraei *et al.*, 2009; Small *et al.*, 2010), incluido el cáncer cervical, en el que adicionalmente se ha demostrado que existe una correlación positiva entre los niveles de expresión de survivina y la etapa clínica de los tumores (Singh *et al.*, 2004; Yaqin *et al.*, 2007). En estudios de inmunohistoquímica se ha podido establecer que la expresión de survivina es un evento que se manifiesta durante el desarrollo del cáncer cervical, ya que se puede detectar en lesiones pre-malignas de bajo y alto grado. De tal forma, se ha reportado que existe una relación lineal significativa entre el grado de la lesión y la intensidad de la expresión de survivina (Frost *et al.*, 2002; Branca *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2007). En algunos trabajos se ha establecido que la sobre-expresión de survivina está fuertemente asociada con la infección por HPV de alto riesgo (Branca *et al.*, 2005) observándose una co-localización del DNA de HPV y el de survivina en las células de este tipo de lesiones cervicales (Frost *et al.*, 2002). Sin embargo, esta es la primera vez que se reporta una alteración en la expresión de survivina mediada simplemente por la infección con HPV, y de manera independiente al desarrollo de una lesión cervical.

Es conocido que algunos virus son capaces de interactuar con survivina en diferentes maneras. Por ejemplo, se sabe que en el caso del virus de la Hepatitis B, la proteína survivina y la proteína X del virus (HBX) forman un complejo y se unen a la procaspasa-9, previniendo su reclutamiento al factor regulador mitocondrial Apaf-1, de tal manera que suprime la apoptosis que es iniciada vía mitocondria/citocromo c, potenciando así la carcinogénesis hepato-celular (Marusawa *et al.*, 2003).

Mientras que la presencia de la proteína 5A no-estructural del virus de la Hepatitis C, puede estimular la expresión de la proteína survivina como resultado del aumento en la transcripción del gen (Zhou & Gong, 2006). Así mismo, el Poliomavirus JC induce la expresión de survivina en eventos tempranos de la infección, antes de que inicie la replicación del DNA viral, es probable que este evento suceda por la unión de la proteína reguladora antígeno T al promotor de survivina, activándolo (Pina-Oviedo *et al.*, 2007). Y por último, la proteína Vpr del virus del VIH-1 es capaz de inducir la expresión de survivina por transactivación de su promotor, manteniendo el ciclo celular arrestado en G2/M (Zhu *et al.*, 2003). Para el caso particular del HPV se ha reportado que la proteína E6 del HPV16

interactúa con p53 induciendo su degradación por ubiquitinación y de esta manera activa al promotor de survivina originando una sobre-expresión de la misma (Borbély *et al.*, 2006).

Se ha reportado que para ser capaz de realizar su función anti-apoptótica, la proteína survivina debe ser fosforilada en el residuo 34 de treonina (Thr) (O'Connor *et al.*, 2000). Por lo tanto, con la finalidad de investigar si la infección por HPV18 tiene un efecto sobre la fosforilación de survivina, se realizó la infección de células HaCat con pseudoviriones de HPV18 y se evaluó tanto la expresión como la fosforilación de survivina mediante Western Blot, utilizando para lo segundo un anticuerpo que reconoce específicamente el residuo de Thr34 fosforilado. De manera interesante, la cantidad de survivina aumentó significativamente después de la infección viral, observándose un nivel máximo a las 6 horas post-infección. De manera interesante, cuando se evaluó el nivel de fosforilación, no se detectó una señal positiva antes de la infección. La proteína fosforilada comenzó a ser visible a los 30 minutos post-infección, presentando un nivel máximo a las 6 horas, el cual coincide con el mayor nivel de expresión. Esta observación es interesante ya que es la primera vez que se reporta que existe una expresión y fosforilación de la proteína survivina, en los primeros momentos de la infección por HPV.

En algunos trabajos, se ha reportado a survivina fosforilada en el residuo 34 de Thr en distintos carcinomas, como en el oral de células escamosas (OSCC), en donde se encontró predominantemente en el núcleo celular, durante el proceso de malignización de las células de fibrosis oral submucosa (Zhou *et al.*, 2008). En contraste, Mesri (2001) utilizó una transfección con una survivina no fosforilable (cambiando la Thr34 por una Alanina) en líneas celulares de cáncer de mama, cervical, próstata, pulmón y colorrectal, y la propuso como una terapia contra el cáncer, ya que encontró que al hacer a survivina no fosforilable, las células morían por apoptosis. De la misma manera, al evaluar tejidos cancerosos de próstata, el grupo de Zhang mostró que al cambiar la Thr 34 por una Ala, las células cancerosas comenzaban a morir por apoptosis (Zhang *et al.*, 2010). Lo anterior apoya nuestros resultados indicando un papel importante en la fosforilación de survivina y su efecto anti-apoptótico. En ambos casos, survivina ha sido encontrada en tejidos cancerosos o en proceso de malignización que son eventos tardíos, a diferencia de lo encontrado en el presente trabajo en donde se encontró dicha fosforilación desde los primeros momentos de la infección por HPV.

Se sabe que los virus de HPV infectan a las células para-basales del epitelio cervical, y es solamente en los queratinocitos terminalmente diferenciados donde son ensambladas las proteínas de la cápside y las partículas virales, por lo que el ciclo infeccioso completo del HPV depende del programa de diferenciación del queratinocito (Stanley *et al.*, 2007). Debido a que este es un epitelio de recambio y que las células son descamadas, es probable que en este proceso, la infección de los virus de HPV en las células para-basales desencadene un proceso anti-apoptótico mediado en este caso por la sobre-expresión de la proteína survivina, que pase por alto la vigilancia del sistema inmunológico activado por la misma infección, lo cual permita que la célula continúe con su proceso de división normal, replicando así mismo el material genético del HPV que se encuentra en un estado episomal. Dado que nuestros resultados mostraron un aumento en la fosforilación de survivina, mediada por la infección de los pseudoviriones de HPV18 en las primeras horas post-infección, y que esta es la manera en que se encuentra la proteína para llevar a cabo su función anti-apoptótica, podríamos suponer que se está llevando a cabo el proceso anteriormente descrito, lo cual permitiría que en un proceso posterior, el DNA viral se integre al cromosoma celular y se expresen la proteínas tardías E6 y E7 que son las que intervienen en el proceso de malignización de las células, y quizá esto no tome mucho tiempo después de la infección, lo cual reflejaría la mayor agresividad en el proceso de carcinogénesis mediado por la infección de HPV18.

Se ha reportado que la infección primaria por HPV se inicia a través de la unión de las partículas virales a receptores localizados en la superficie de sus células blanco. Inicialmente se propuso a la Integrina $\alpha 6\beta 4$ como el receptor primario para el HPV6 y 16 (Evander *et al.*, 1997; McMillan *et al.*, 1999; Yoon *et al.*, 2001). Posteriormente, se observó que algunos tipos virales son capaces de infectar células que no expresan la Integrina $\alpha 6\beta 4$, y que las partículas virales pueden utilizar al Heparán Sulfato como receptor, como se ha reportado para los HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 58, 59, 68 (Combata *et al.*, 2001; coincidiendo con lo reportado por Giroglou *et al.*, 2001 para los tipos virales 16 y 33), y para el HPV 11 (Joyce *et al.*, 1999). Por lo tanto, con la finalidad de demostrar por un lado que el efecto de la infección por HPV18 sobre la expresión y fosforilación de survivina es mediado por la unión de la pseudopartícula viral a los receptores descritos, y por otro evaluar la posible participación de los mismos en tal proceso, se realizaron experimentos en los cuales se bloqueó a la Integrina con un anticuerpo neutralizante, o bien se trató a las células con

Heparinasa para digerir los residuos sulfatados del heparán sulfato a los que se unen los pseudoviriones.

Los resultados mostraron que el bloqueo de la Integrina no abolió la expresión de survivina mediada por la infección con los pseudoviriones, pero sí indujo una disminución significativa de dicha expresión, lo cual sugiere que la inducción de la expresión de survivina depende parcialmente de la Integrina y de posibles vías de señalización activadas tras la unión de la cápside viral a dicha proteína. Con respecto a lo anterior, se ha demostrado que las Integrinas participan en la activación de distintas cascadas de señalización como las presentes en el reacomodo de la matriz extracelular (EMC) que se presenta en distintos tipos de cáncer (Larsen *et al.*, 2006) o en cultivos celulares de melanoma murino (Sil & Chatterjee, 2011), en respuesta a estrés mecánico (Pereira *et al.*, 2011) y para regular la proliferación celular, activación, migración y homeostasis (Hynes, 2002), a través de mecanismos llamados outside-in e inside-out, los cuales se siguen estudiando debido a la gran cantidad de moléculas involucradas.

Por otro lado, cuando las células fueron incubadas con heparinasa, se detectó una disminución de la expresión de survivina inducida por la infección con pseudoviriones. Esta observación sugiere que el Heparán Sulfato tiene también una participación parcial en la activación de la expresión de survivina al unirse a las pseudopartículas virales. Se ha reportado que las moléculas de heparán sulfato son capaces de activar vías de señalización como en células BaF3 donde modulan la actividad de proteínas de la familia FGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos) (Berry *et al.*, 2004) uniéndose a ellas (Yayon *et al.*, 1991) e incluso, cooperando con las integrinas para conectar la matriz extracelular al citoesqueleto (Lopes *et al.*, 2006).

Así mismo, existe evidencia en la literatura de la activación de cdc2 (cinasa que fosforila a survivina) por integrinas, como en el caso de la migración celular donde la integrina $\alpha 5\beta 3$ tiene como efector río abajo a cdc2 (Manes *et al.*, 2003) y existe solo un reporte que involucra la unión de virus del herpes HSV-1 y una vez que ha infectado a la célula, es capaz de activar cinasas, entre ellas cdc2 (Carter, 2008).

De manera interesante, nuestros resultados mostraron que la inhibición de alguno de los dos receptores de manera individual no logró abatir la expresión de survivina mediada por la infección por pseudoviriones, lo cual sugiere que ambos receptores participan en este fenómeno. Esta propuesta fue apoyada por la observación de que al inhibir ambos receptores la expresión de survivina mediada por la pseudoinfección fue abatida. Hasta el momento no

existían reportes donde se mostrara que la expresión de survivina puede ser regulada a través de dos receptores diferentes.

Se sabe que la cinasa dependiente de ciclinas cdc2, es la encargada de fosforilar a survivina en la Thr34 (Frost *et al.*, 2002) y que esta puede ser activada a partir de la $\alpha6\beta4$ integrina en cascadas de sobrevivencia y proliferación celular (Mainiero *et al.*, 1994; Noh *et al.*, 2010), por tal motivo decidimos analizar la expresión de la cinasa cdc2 en la infección de células HaCat con los pseudoviriones de HPV18. Los resultados mostraron un aumento en la expresión de cdc2 con la infección de los pseudoviriones. Dicha expresión fue abatida cuando la infección fue bloqueada utilizando Heparinasa y/o el anticuerpo anti-integrina. Estos resultados sugieren que esta cinasa se expresa a partir de la unión de los pseudoviriones de HPV18 a los receptores, lo que pasaría en los primeros momentos de una infección por el virus, llevando así la función de fosforilar a survivina.

El Cisplatino es un antineoplásico que se utiliza en las terapias contra el cáncer cérvico-uterino (Mancebo *et al.*, 2010). Dado que survivina tiene una actividad antiapoptótica y que la infección con los pseudoviriones de HPV16 y HPV18 mostró un aumento en la expresión de esta proteína, analizamos el efecto de la infección en la apoptosis mediada por Cisplatino en células HaCat. Los resultados mostraron que las células infectadas con los pseudoviriones de HPV16 presentaron una mayor sobrevivencia al cisplatino. Por otro lado, las células infectadas con los pseudoviriones de HPV18 tuvieron una sobrevivencia aún mayor que la presentada por los pseudoviriones de HPV16, ante el quimiofármaco. Así mismo, la infección con pseudoviriones de HPV18 en ausencia de cisplatino, indujo un aumento en la sobrevivencia celular, cuando se les comparó con las células que no fueron infectadas, por lo que dicha infección podría estar contribuyendo a la proliferación de las mismas o protegiéndolas de la apoptosis.

Estos resultados coinciden con la sobre-expresión de survivina presentada en las células infectadas con los pseudoviriones, y probablemente este evento podría estar relacionado, como lo mencionamos previamente, a la mayor agresividad que presenta el HPV18 al infectar a las células y progresar rápidamente hacia un cáncer invasivo, lo que coincide con lo reportado por el grupo de Arends (1993) donde sugiere la posibilidad de un mayor riesgo de progresión o malignización más rápida en la infección por HPV18.

Hasta ahora, los trabajos que muestran una relación entre la sobre-expresión de survivina en el cáncer, y en particular en cáncer cérvico-uterino, reportan que el gen de survivina es

sobre-expresado por una transactivación de su promotor (Mirza *et al.*, 2002; Raj *et al.*, 2008) mediada por las proteínas oncogénicas E6 y E7 de HPV16, que se lleva a cabo por la degradación de p53 mediada por la proteína E6 así como la inactivación de pRB mediada por la unión de la proteína E7 del virus (Bórbely *et al.*, 2006). A diferencia de lo encontrado por el grupo de György Veress (Borbély *et al.*, 2006), en el presente trabajo encontramos que existe una sobre-expresión del gen y de la proteína Survivina a partir de los primeros momentos de la infección, y que además este proceso es independiente de la activación de E6 y E7 (las cuales no estuvieron presentes en nuestro estudio).

Sería interesante conocer si el factor nuclear NFκB se encuentra relacionado al incremento en la transcripción del gen de survivina que se observó en el presente estudio, ya que se ha reportado la existencia de una secuencia de reconocimiento para este factor en el promotor de survivina (Kawakami *et al.*, 2005) y si la infección por los pseudoviriones de HPV16 y HPV18, mediante su unión a los receptores Heparán Sulfato y α6β4, es capaz de activar a dicho factor nuclear.

Debido a lo anterior, lo encontrado en este proyecto resulta de gran relevancia para comprender lo que sucede en etapas tempranas de la infección por HPV.

CONCLUSIONES

- La infección con pseudoviriones de HPV18 induce la sobre-expresión del gen de Survivina en células HaCat.
- La infección con pseudoviriones de HPV18 induce la sobre-expresión de la proteína Survivina y Survivina fosforilada en células HaCat, a través del tiempo.
- La infección con pseudoviriones de HPV18 en células HaCat es capaz de desencadenar cascadas de señalización que involucran la activación de la cinasa CDC2, la cual es la cinasa que fosforila a Survivina.
- Los receptores celulares $\alpha6\beta4$ integrina y heparán sulfato se encuentran involucrados en la expresión y fosforilación de survivina.
- La infección con pseudoviriones de HPV18 incrementa la sobrevivencia de células HaCat tratadas con el quimiofármaco Cisplatino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adida C, Crotty P, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri D. 1998. **Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation.** Am J Pathol. 1: 43-49.

Ai Z, Yin L, Zhou X, Zhu Y, Zhu D, Yu Y, Feng Y. 2006. **Inhibition of survivin reduces cell proliferation and induces apoptosis in human endometrial cancer.** Am Cancer Soc. 746-756.

Altieri D. 2003. **Validating survivin as a cancer therapeutic target.** Nat Rev Cancer. 3: 46-54.

Altieri D. 2003. **Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer.** Prog Cell Cycle Res. 5:447-452.

Altieri D. 2006. **The case of survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions.** Curr Opin Cell Biol. 6:609-615.

Ambrosini G, Adida C, Altieri D. 1997. **A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma.** Nat Med. 8:917-921.

Arends M, Donaldson Y, Duvall E, Wyllie A, Bird C. 1993. **Human papillomavirus type 18 associates with more advanced cervical neoplasia than human papillomavirus type 16.** Hum Pathol. 24:432-437.

Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, Inuzuka M. 2004. **Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin.** Biochem Biophys Res Commun. 3:902-907.

Baker C, Calef C, 1996. **Maps of Papillomavirus RNA transcripts.** Los Alamos National Laboratory.

Berry D, Shriver Z, Venkataraman G, Sasisekharan R. 2004. **Quantitative assessment of FGF by cell surface Heparan Sulfate.** Biochem Biophys Res Commun. 4:994-1000.

Bórbely A, Murvai M, Kónya J, Beck Z, Gergely L, Li F, Veress G. 2006. **Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression.** J Gen Virol. 87: 287-294.

Branca M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Ciotti M, Costa S, Benedetto A, Casolati E, Favalli C, Paba P, Di Bonito P, Mariani L, Syrjänen S, Bonifacio D, Accardi L, Zanconati F, Syrjänen K. 2005. **Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer.** Am J Clin Pathol. 1:113-121.

Broutian T, Brendle S, Christensen N. 2009. **Differential binding patterns to host cells associated with particles of several human alpha papillomavirus types.** J Gen Virol. DOI:10.1099/vir.0.012732-0.

- Buck C, Pastrana D, Lowy D, Schiller J. 2003. **Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors.** *J Virol.* 2:751-757.
- Buck C, Thompson C, Pang Y, Lowy D, Schiller J. 2004. **Maturation of papillomavirus capsids.** *J Virol.* 5:2839-2846.
- Caldas H, Jiang Y, Holloway M, Fangusaro J, Mahotka C, Conway E, Altura R. 2005. **Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death.** *Oncogene.* 24(12):1994-2007.
- Carter C. 2008. **Interactions between the products of the Herpes simplex genome and Alzheimer's disease susceptibility genes: relevance to pathological-signalling cascades.** *Neurochem Int.* 6:920-934.
- Ceballos- Cancino C, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. 2007. **Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO selective release by survivin.** *Oncogene.* 26:7569-7575.
- Chang F, Lee J, Navalonic P, Steelman L, Shelton J, Blaloch W, Franklin R, McCubrey J. 2003. **Involvement of PI3k/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy.** *Leukemia.* 17:590-603.
- Chantalat L, Skoufias D, Kleman J, Jung B, Dideberg O, Margolis R. 2000. **Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual α -helical extensions.** *Molecular Cell.* 6: 183-189.
- Chen M, Wang J. 2002. **Initiator caspasas in apoptosis signaling pathways.** *Apoptosis.* 4:313-319.
- Chen Y, Maguire T, Hileman R, Fromm J, Esko J, Linhardt R, Marks R. 1997. **Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparin sulfate.** *Nat Med.* 3:866-871.
- Combita A, Touz e A, Bousarghin L, Sizaret P, Muñoz N, Coursaget P. 2001. **Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate.** *FEMS Microbiol Lett.* 1:183-188.
- Conger K, Liu J, Kuo S, Chow L, Wang T. 1999. **Human papillomavirus DNA replication. Intereactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase.** *J Biol Chem.* 5:2696-2705.
- Cooray S. 2004. **The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival.** *J Gen Virol.* 85:1065-1076.
- Crook N, Clem R, Miller L. 1993. **An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif.** *J Virol.* 67:2168-2174.
- Davis T, Cress A, Dalkin B, Nagle R. 2001. **Unique expression pattern of the alpha6beta4 integrin and laminin-5 in human prostate carcinoma.** *Prostate.* 3:240-248.

Desaintes C, Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. 1997. **Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis.** EMBO J. 3:504-514.

de Villiers E, Fauquet C, Broker T, Bernard H, zur Hausen H. 2004. **Classification of papillomaviruses.** Virology. 1:17-27.

Dohi T, Altieri D. 2005. **Mitochondrial dynamics of survivin and “four dimensional” control of tumor cell apoptosis.** Cell cycle. 4:21-23.

Evander M, Franzer H, Payne E, Qi Y, hengst K, McMillan N. 1997. **Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses.** J Virol. 71:2449-2456.

Fields B, Knipe D, Howell P. 1996. **Fields Virology 3rd edition.** Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, USA. 2945-2076, 2089-2101.

Frost M, Jarboe E, Orlicky D, Gianani R, Thompson L, Enomoto T, Shroyer K. 2002. **Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma.** Am J Clin Pathol. 5:738-744.

Gautier J, Solomon M, Booher R, Bazan J, Kirschner M. 1991. **cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34^{cdc2}.** Cell 67:197-211.

Giancotti FC. 2007. **Targeting integrin β 4 for cancer and anti-angiogenic therapy.** Trends Pharmacol Sci. 10:506-511.

Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck R, Sapp M. 2001. **Human papillomavirus infection requires cell surface heparin sulfate.** J Virol. 3:1565-1570.

Grossman D, McNiff J, Li F, Altieri D. 1999. **Expression of the apoptotic inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line.** Lab Invest. 9:1121-1126.

Hagensee M, Yaegashi N, Galloway D. 1993. **Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins.** J Virol. 1:315-322.

Hail N, Carter B, Konopleva M, Andreeff M. 2006. **Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys.** Apoptosis. 11:889-8904.

Honda R, Korner R, Nigg E. 2003. **Exploring the functional interactions between aurora B, INCENP, and survivin in mitosis.** Mol Biol Cell. 14:3325-3341

Hynes R. 2002. **Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.** Cell. 6:673-687.

Jimenez L, Aguliar M, Monroy O, Cruz-Talonia F, Cruz R, Huitron C, Rocha-Zavaleta L. 2007. **Detection of autoantibodies to survivin in cervical mucus from patients with human papillomavirus-associated cervical cancer and precursor lesions.** Autoimmunity. 1:66-72.

Joyce J, Tung J, Przysiecki C, Cook J, Lehman E, Sands J, Jansen K, Keller P. 1999. **The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes.** J Biol Chem. 274:5810-5822.

Kania J, Konturek S, Marlicz K, Hahn E, Konturek P. 2003. **Expression of survivin and caspase-3 in gastric cancer.** Dig Dis Sci. 48(2):266-271.

Kawakami H, Tomita M, Matsuda T, Ohta T, Tanaka Y, Fujii M, Hatano M, Tokuhisa T, Mori N. 2005. **Transcriptional activation of survivin through NF kappa-B pathway by human T-cell leukemia virus type I tax.** Int J Cancer. 6:967-974.

Kerr J. 2002. **History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept.** Toxicology. 181-182: 471-474.

Kim H, Shiraki K, Park S. 2002. **Expression of survivin in CIN and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix.** Anticancer Res. 22:805-808.

Kim Y, Kim S, Kim Y, Hong S, Kim M, Myoung H. 2010. **Evaluation of survivin as a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma.** J Oral Pathol Med. 5:368-375.

Kjellén L, Lindall U. 1991. **Proteoglycans: structures and interactions.** Annu Rev Biochem. 60:443-475.

Knappe M, Bodevin S, Selinka H, Spillmann D, Streeck R, Chen X, Lindahl U, Sapp M. 2007. **Surface-exposed amino acid residues of HPV16 L1 protein mediating interaction with cell surface heparin sulfate.** JBC. 38:27913-27922.

Koutsky, L. 1997. **Epidemiology of genital human papillomavirus: from warts to cancer.** Am J Med. 5A:3-8.

Krepela E, Dankova P, Moravcikova E, Krepelova A, Prochazka J, Cermak J, Schützner J, Zatloukal P, Benkova K. 2009. **Increased expression of inhibitor of apoptosis proteins in non-small cell lung carcinoma.** Int J Oncol. 6:1449-1462.

Kumar V, Cotran R, Robbins L. 2003. **Patología humana.** Saunders. 7a Ed. pp 29-32.

Larochelle S, Merrick K, Terret M, Wohlbold L, Barboza N, Zhang C, Shokat K, Jallepalli P, Fisher R. 2007. **Requirements for cdk7 in the assembly of cdk1/cyclin B and activation of cdk2 revealed by chemical genetics in human cells.** Mol Cell. 6: 839-850.

Larsen M, Artym V, Green J, Yamada K. 2006. **The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling.** Curr Opin Cell Biol. 5:463-471.

Leist M, Jaatela M. 2001. **Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2:589-598.

Lewin B. 2007. **Genes VIII.** Oxford University Press.

- Liang Y, Tsai S, Chen L, Lin-Shiau S, Lin J. 2002. **Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of Cdk7 and p34^{cdc2} kinases in colon carcinoma HT29 cells.** *Biochemical Pharmacology*. 65:1053-1060.
- Li F. 2005. **Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis.** *Br J Cancer*. 2:212-216.
- Lindahl U, Kusche-Gullberg M, Kjellén L. 1998. **Regulated diversity of heparan sulfate.** *J Biol Chem*. 39:24979-24982.
- Liston P, Fong W, Korneluk R. 2003. **The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2.** *Oncogene*. 53:8568-8580.
- Lo Muzio L, Campisi G, Giovannelli L, Ammatuna P, Greco I, Staibano S, Pannone G, De Rosa G, Di Liberto C, D'Angelo M. 2004. **HPV DNA and survivin expression in epithelial oral carcinogenesis: a relationship?** *Oral Oncol*. 7:736-741.
- Lopes C, Dietrich C, Nader H. 2006. **Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are need for cell signaling.** *Braz J Med Biol Res*. 157-167.
- Luo X, Kim C, Yang J, Jemmerson R, Wang X. 1998. **Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from the mitochondria in response to activation of cell surface death receptor.** *Cell*. 94:481-490.
- Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert H, Gerharz C. 1999. **Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties.** *Cancer Res*. 24:6097-7102.
- Mainiero F, Pepe A, Wary KK, Spinardi L, Mohammadi M, Schlessinger J, Giancotti FG. 1994. **Signal transduction by the $\alpha_6\beta_4$ integrin: distinct β_4 subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes.** *EMBO J*. 14(18):4470-4481.
- Mancebo G, Gil-Moreno A, Vergés R, Martínez-Palones J, Checa M, Carreras J, Giralt J, Xercavins J. 2010. **Out-of-protocol concurrent use of cisplatin and radiation therapy in locally advanced cervical cancer: feasibility and survival.** *Eur J Gyneacol Oncol*. 1: 18-22.
- Manes T, Zheng D, Tognin S, Woodard A, Marchisio P, Languino L. 2003. **Alpha(v)beta3 integrin expression up-regulates cdc2, which modulates cell migration.** *J Cell Biol*. 4:817-826.
- Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed J. 2003. **HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression.** *EMBO J*. 11:2729-274.
- Masterson P, Stanley M, Lewis a, Romanos M. 1998. **A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and DNA polymerase alpha-primase p68 subunit.** *J Virol*. 9:7407-7419.
- McMillan N, Payne E, Frazer I, Evander M. 1999. **Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells.** *Virology*. 2: 271-279.

Mesri M, Wall N, Li J, Kim R, Altieri D. 2001. **Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus.** J Clin Invest. 7:981-990.

Miller L. 1999. **An exegesis of IAP's: salvation and surprises from BIR motifs.** Trends Cell Biol. 8:323-328.

Mirza A, McGuirk M, Hockenberry T, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen S, Wang L, Kirschmeier P, Bishop W, Nielsen L, Pickett tC, Liu S. 2002. **Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway.** Oncogene. 17: 2613-2622.

Muñoz N, Bosch F, de SanJosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K, Snijders P, Meijer C. 2003. **Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer.** N Engl J Med. 6:518-527.

Noh T, Soung Y, Kim H, Gil H, Kim J, Lee E, Chung J. 2010. **Effect of β 4 integrin knockdown by RNA interference in anaplastic thyroid carcinoma.** Anticancer Res. 11:4485-4492.

Nouraei N, Mowla S, Ozhand A, Parvin M, Ziaee S, Hatefi N. 2009. **Expression of survivin and its spliced variants in bladder tumors as a potential prognostic marker.** Urol J. 2: 101-108.

O'Connor D, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio P, Altieri D. 2000. **Regulation of apoptosis at cell division by p34^{cdc2} phosphorylation of survivin.** Proc Natl Acad Sci. 97:13103-13107.

Paba P, Bonifacio D, Di Bonito L, Ombres D, Favalli C, Syrjänen K, Ciotti M. 2008. **Co-expression of HSV2 and *Chlamydia trachomatis* in HPV-positive cervical cancer and cervical intra-epithelial neoplasia lesions is associated with aberrations in key intracellular pathways.** Intervirology. 51: 230-234.

Park T, Fujiwara H, Wright T. 1995. **Molecular Biology of cervical cancer and its precursors.** Cancer. 10 Suppl:1902-1913.

Pereira A, Tudor C, Kanger J, Subramaniam V, Martin-Blanco E. 2011. **Integrin-dependent activation of the JNK signaling pathway by mechanical stress.** PLoS ONE 6:12

Pina- Oviedo S, Urbanska K, Radhakrishnan S, Sweet T, Reiss K, Khalili K, Del Valle L. 2007. **Effects of JC virus infection on anti-apoptotic protein survivin in progressive multifocal leukoencephalopathy.** Am J Pathol. 4:1291-1304.

Preuss S, Weinell A, Molitor M, Stenner M, Senrau R, Drebber U, Weissenborn S, Speel E, Wittekindt C, Guntinas-Lichius O, Hoffmann T, Eslick G, Klussman J. 2008. **Nuclear survivin expression is associated with HPV-independent carcinogenesis and is an indicator of poor prognosis in oropharyngeal cancer.** Brit J of Cancer. 98:627-632.

- Raj D, Liu T, Samadashwily G, Li F. 2008. **Survivin repression by p53, Rb and E2F2 in normal human melanocytes.** *Carcinogenesis*. 1: 194-201.
- Rommel O, Dillner J, Fligge C, Bergsdorf C, Wang X, Selinka H, Sapp M. 2005. **Heparan sulfate proteoglycans interact exclusively with conformationally intact HPV L1 assemblies: Basis for virus-like particle ELISA.** *J Med Virology*. 75:114-121.
- Sapp M, Bienkowska-Haba M. 2009. **Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus.** *FEBS J*. 24: 7206-7216.
- Schimmer A. 2004. **Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice.** *Cancer Res*. 64:7183-7190.
- Schulze A, Gripon P, Urban S. 2007. **Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans.** *Hepatology*. 6: 1759-1768.
- Schwartz M, Assoian R. 2001. **Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways.** *J Cell Sci*. 114:2553-2560.
- Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Menequzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. 2003. **Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses.** *J Virol*. 24:13125-13135.
- Shin S, Sung B, Cho Y, Kim H, Ha N, Hwang J, Chung C, Jung Y, Oh B. 2001. **An antiapoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and-7.** *Biochemistry*. 40:1117-1123.
- Shukla D, Spear P. 2001. **Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry.** *J Clin Invest*. 4:503-510.
- Sil H, Sen T, Chatterjee A. 2011. **Fibronectin-integrin (alpha5beta1) modulates migration and invasion of murine melanoma cell line B16F10 by involving MMP-9.** *Oncol Res*.7:335-348.
- Singh A, Sharma H, Salhan S, Gupta S, Bhatla N, Jain S, Singh N. 2004. **Evaluation of expression of apoptosis-related proteins and their correlation with HPV, telomerase activity, and apoptotic index in cervical cancer.** *Pathobiology*. 6:314-322.
- Small S, Keerthivasan G, Huang Z, Gurbuxani S, Crispino J. 2010. **Overexpression of survivin initiates hematological malignancies in vivo.** *Leukemia*. 11:1920-1926.
- Stanley M, Pett M, Coleman N. 2007. **HPV: from infection to cancer.** *Biochem Soc Trans*. 35:1456-1460.
- Stennicke H, Salvesen G. 1998. **Properties of the caspases.** *Biochim Biophys Acta*. 1-2:17-31.
- Strauss J, Strauss E. 2008. **Viruses and human disease 2nd Edition.** Academic Press. pp 308.

Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero D, Vigna N, Oltersdorf D, Reed J. 1998. **IAP-family protein survivin inhibites caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases and anticancer drugs.** *Cancer Res.* 58:5315-5320.

Tsujimoto Y. 2003. **Cell Regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria.** *J Cell Physiol.* 195:158-167.

Tsuruta D, Kobayashi H, Imanashi H, Sugawara K, Ishii M, Jones J. 2008. **Laminin-332-integrin interaction: a target for cancer therapy?** *Curr Med Chem.* 15(20):1968-1975.

Verhagen A, Coulson E, Vaux D. 2001. **Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAP's and other BIRP's.** *Genome Biol.* 7:Reviews3009.

Vong Q, Cao K, Li H, Iglesias P, Zheng Y. 2005. **Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin.** *Science.* 5753: 1499-1504.

Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, Pisabarro M, Kadkhodayan S, Fairbrother W, Dixit V. 2002. **Smac negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP).** *J Biol Chem.* 277:12275-12279.

Wang H, Sharp T, Koumi A, Koentges G, Boshoff c. 2002. **Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus which resembles a spliced variant of human survivin.** *EMBO J.* 21:2602-2615.

Wang Q, Wu PC, Roberson RS, Luk BV, Ivanova I, Chu E, Wu DY. 2010. **Survivin and escaping in therapy-induced cellular senescence.** *Int J Cancer.* (En Publicación).

Wheatley S, Henzing A, Dodson H, Khaled W, Earnshaw W. 2004. **Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo.** *J Biol Chem.* 7:5655-5660.

Yang Y, Xiao M. 2000. **The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities.** *Cell Res.* 3:169-177.

Yaqin M, Runhua L, Fuxi Z. 2007. **Analyses of Bcl-2, Survivin, and CD44v6 expressions and human papillomavirus infection in cervical carcinomas.** *Scand J Infect Dis.* 5:441-448.

Yayon A, Klagsbrun M, Esko J, Leder P, Orniz D. 1991. **Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor.** *Cell.* 4:841-848.

Yoon C, Kim K, Park S, Cheong S. 2001. **α -6 Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP.** *Biochem Biophys Res Commun.* 3:668-673.

Zhang M, Coen J, Suzuki Y, Siedow M, Niemierko A, Khor L, Pollack A, Zhang Y, Zietman A, Shipley W, Chakravarti A. 2010. **Survivin is a potential mediator of prostate cancer metastasis.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 4: 1095-1103.

Zhao J, Tenev T, Martins L, Downward J, Lemoine N. 2000. **The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner.** J Cell Sci. 113:4363-4371.

Zhou S, Li L, Jian X, Ou X, Jiang H, Yao Z, Xu C, Peng J. 2008. **The phosphorylation of survivin Thr 34 by p34cdc2 in carcinogenesis of oral submucous fibrosis.** Oncol Rep. 5:1085-1091.

Zhou Y, Gong G. 2006. **Hepatitis C virus NS5A protein upregulates survivin gene expression.** Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. 6:414-417.

Zhu Y, Roshal M, Li F, Blackett J, Planelles V. 2003. **Upregulation of survivin by HIV-1 Vpr. Apoptosis.** 8:71-79.

Zoratti M, Szabó I. 1995. **The mitochondrial permeability transition.** Biochim Biophys Acta. 1241 :139-176.

zur Hausen H, de Villiers E. 1994. **Human Papillomaviruses.** Annu Rev Microbiol. 48:427-447.