



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**“Comparación del efecto de las oncoproteínas E6 de VPH  
tipos 18 y 11 (de alto y bajo riesgo) sobre la proliferación y  
migración de células C33A”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Lic. en Biología

P R E S E N T A

Bautista Isidro Luis Osvaldo

Director de Tesis: Dr. Carlos Pérez Plasencia

2014





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**

**Tesis Digitales**

**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A mi Mama Cristina A mi Papa Bernardo

A mis Hermanas Cynthia y Lucero

Y Para Valentina Mi Hija.

Porque Son Lo Mas Importante Que Existe En Mi  
Vida

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al Dr. Carlos Pérez-Plasencia por aceptarme en su equipo y por permitirme desarrollar éste proyecto bajo su tutela.

A la M. en B. E. Verónica García Castillo, al Dr. Eduardo López Urrutia y a la Dra. Gabriela Figueroa González por todo su apoyo, sus conocimientos y sus valiosos consejos a lo largo de mi estancia en el Laboratorio de Genómica Funcional. Muchas Gracias.

Y en general a todos los maestros presentes a lo largo de mi formación académica.

A mis amigos y hermanos a lo largo de la carrera Luis, Dayann, Germán, Rafa y Jossimar. Gracias por acompañarme en todas esas aventuras sin fin y por su compañía.

Este proyecto fue financiado por CONACYT, del fondo sectorial en salud número SALUD-2009-01-113948 y número SALUD-2010-01-141907.

## **Contenido**

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 1. RESÚMEN .....                                                  | 8  |
| 2. INTRODUCCIÓN.....                                              | 9  |
| 2.1 Cáncer .....                                                  | 9  |
| 2.2 Cáncer cérvico uterino.....                                   | 10 |
| 2.3 VPH.....                                                      | 13 |
| 2.3.1 La oncoproteína E6 .....                                    | 14 |
| 2.3.2 La oncoproteína E7 .....                                    | 17 |
| 2.3.3 Los genes E1-E5 .....                                       | 18 |
| 2.3.4 Los genes L1 y L2 .....                                     | 19 |
| 2.3.5 La región larga de control (LCR).....                       | 20 |
| 2.4 Ciclo de vida del VPH .....                                   | 20 |
| 3. JUSTIFICACIÓN.....                                             | 23 |
| 4. HIPÓTESIS .....                                                | 24 |
| 5. OBJETIVO GENERAL .....                                         | 24 |
| 6. OBJETIVOS PARTICULARES.....                                    | 24 |
| 7. MATERIAL Y MÉTODOS.....                                        | 25 |
| 7.1 Verificación de las secuencias de los genes 11E6 y 18E6 ..... | 25 |
| 7.2 Construcciones.....                                           | 26 |
| 7.2.1. Clonación en el vector pGEM-T Easy.....                    | 26 |
| 7.2.2. Subclonación en el vector pEGFP-N1 .....                   | 28 |
| 7.3 Cultivo Celular .....                                         | 31 |
| 7.4 Transfección .....                                            | 32 |
| 7.5 Ensayos de viabilidad celular .....                           | 32 |
| 7.6 Ensayos de migración celular .....                            | 33 |
| 7.7 Western Blot .....                                            | 34 |
| 8. RESULTADOS .....                                               | 36 |

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 8.1 Secuenciación de los plásmidos pMSCV/11E6 y pMSCV/18E6 .....                                                 | 36 |
| 8.2 Clonación de 18E6 y 11E6 en el vector pGEM-T Easy.....                                                       | 38 |
| 8.3 Generación de los vectores de expresión pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6 .....                                        | 40 |
| 8.4 Actividad de p53 y caspasa 3 en células C33A transfectadas con pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6.....                  | 42 |
| 8.5 Determinación de la viabilidad celular en C33A transfectadas con los plásmidos pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6 ..... | 43 |
| 8.6 Determinación de la migración celular en C33A transfectadas con pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6.....                 | 45 |
| 9. DISCUSIÓN.....                                                                                                | 48 |
| 10. CONCLUSIONES .....                                                                                           | 53 |
| 11. PERSPECTIVAS .....                                                                                           | 54 |
| 12. BIBLIOGRAFÍA.....                                                                                            | 55 |
| 13. ANEXO .....                                                                                                  | 63 |

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Fig 1. Principales tipos de cáncer a nivel mundial.</b> Se muestra al cáncer cérvico uterino como la tercera causa de incidencia y mortalidad. Modificado de Ferlay 2013.....                                                                                                                                                                                                                                            | 10 |
| <b>Fig 2. Organización del genoma del VPH.</b> Una molécula circular de doble cadena que se divide en 3 regiones: la región larga de control (LCR), los genes tempranos E1-E6 y la región tardía con los genes L1 y L2. Tomado de Saavedra 2006.....                                                                                                                                                                        | 13 |
| <b>Fig 3. Estructura de la oncoproteína E6.</b> Se esquematizan las estructuras denominadas dedos de zinc y los sitios de unión asociados a la ubiquitin ligasa E6AP y a la proteína supresora de tumores p53. Modificado de Lizano 2009.....                                                                                                                                                                               | 14 |
| <b>Fig 4. Mecanismo de degradación de p53 durante la infección por VPH.</b> En células no infectadas la degradación del supresor de tumores esta mediado por Mdm2 mientras que en células infectadas, la oncoproteína E6 se asocia a E6AP e inhibe la acción de p53 por ubiquitinación. Tomado de Saavedra 2006.....                                                                                                        | 15 |
| <b>Fig 5. Ciclo de vida del VPH de alto riesgo en epitelio estratificado.</b> La zona de entrada del virus ocurre en lesiones del epitelio y la expresión continua de las oncoproteínas E6 y E7 favorece la proliferación celular y el mantenimiento del genoma. Los genes tardíos L1 y L2 codifican para las proteínas de la cápside por ello se expresan en capas externas del epitelio. Modificado de Doorbar 2012. .... | 21 |
| <b>Fig 6. Diagrama general de la estrategia utilizada para verificar la secuencia de los genes 11E6 y 18E6.</b> A partir de oligonucleótidos localizados en la región central del gen se puede conocer la secuencia de los extremos y comparar el resultado con la secuencia consenso de NCBI. ....                                                                                                                         | 25 |
| <b>Fig 7. Vector de clonación GEM-T Easy.</b> En este vector se ligaron los ORF's de los genes 11E6 y 18E6. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 27 |
| <b>Fig 8. Vector pEGFP-N1.</b> Utilizado en la subclonación de los ORF'S de 11E6 y 18E6 debido a que cuenta con sitios de restricción en común con pGEM-T Easy lo que nos permite realizar una ligación sitio dirigida. ....                                                                                                                                                                                                | 29 |
| <b>Fig 9. Esquematización de la estrategia utilizada para subclonar los ORF's de los genes E6 en pEGFP-N1.</b> Fueron elegidos los sitios de restricción PstI y Apal encontrados tanto en pGEM-T Easy y pEGFP-N1 para realizar las construcciones pEGFP11E6 y pEGFP18E6. Las anotaciones 5' o 3' hacen referencia a la orientación de los insertos E6 con respecto a los sitios de restricción. ....                        | 30 |
| <b>Fig 10. Alineamiento de las secuencias consenso de HPV11E6 y HPV18E6 y los resultados de la secuenciación de los ORF's 11E6 y 18E6.</b> Al comparar ambas secuencias se observa una mutación en el codón de término de la traducción de los genes secuenciados debido a que se encuentran optimizados para la construcción de proteínas de fusión.....                                                                   | 37 |
| <b>Fig 11. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de los ORF's de 11E6 y 18E6.</b> En los carriles 2 y 3 se observan las bandas correspondientes al peso molecular de cada gen: 11E6 (453 pb) y 18E6 (477 pb) amplificados a partir de los plásmidos pMSCV para su posterior ligación en pGEM-T Easy. ....                                                                                                 | 38 |

**Fig 12. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones mediante PCR pf de los plásmidos pGEM11E6 y pGEM18E6.** A) En el carril 2 y 3 se muestran las bandas correspondientes al peso molecular esperado de los ORF'S de 11E6 y 18E6 amplificados con los oligonucleótidos M13 Fw, 11E6 Rv y 18E6 Rv. B) Esquema de la estrategia utilizada para verificar la orientación de los insertos E6. ....39

**Fig 13. Electroforesis en geles de agarosa de las digestiones enzimáticas con PstI y ApaI de pGEM11E6, pGEM18E6 y pEGFP-N1 para realizar la construcción de los vectores de expresión pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6.** A) Los carriles 2 y 3 corresponden a los ORF'S 11E6 y 18E6 liberados del vector de clonación pGEM-T Easy B) En los carriles 2 y 3 se observa el plásmido EGFP-N1 digerido para su ligación con los ORF's liberados .....40

**Fig 14. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de los ORF's de 11E6 y 18E6 contenidos en los vectores pEGFP-11E6 y pEGFP18E6.** Se utilizaron los oligonucleótidos CMV Fw, 11E6 Rv y 18E6 Rv, en los carriles 2 y 3 se muestran las bandas correspondientes a los pesos moleculares esperados de los insertos (alrededor de 600 pb) con lo que se corrobora la construcción de los vectores de expresión que serían transfectados en células C33A negativas para VPH. ....41

**Fig 15. Western Blot y densitometrías de p53 y caspasa 3.** A) Se observa la disminución de las proteínas p53 y caspasa 3 en las células que expresaban los ORF's de los genes de alto y bajo riesgo, comparadas con células transfectadas con EGFP-N1 (MOCK) y C33A sin transfectar. B) y C) Las densitometrías de la expresión relativa de p53 y caspasa 3 nos indican que los oncogenes virales 11E6 y 18E6 ejercen actividad inhibitoria sobre éstas proteínas implicadas en la supresión de tumores e inhibición de la apoptosis. n=3 .....43

**Fig 16. Experimento de MTT de células C33A transfectadas.** Las células transfectadas con el plásmido que contenía el ORF de 18E6 mostraron un potencial proliferativo mayor con respecto al grupo con el gen de bajo riesgo 11E6 y los grupos control debido a que 18E6 es una oncoproteína viral de alto riesgo, los grupos C33A, MOCK y 11E6 no muestran diferencias significativas entre sí. Los datos fueron analizados estadísticamente con ANOVA  $p < 0.5$  y prueba de Tukey. N=3. ....44

**Fig 17. Análisis de migración de células C33A transfectadas con los plásmidos de alto y bajo riesgo.** Las células transfectadas con los plásmidos de alto y bajo riesgo mostraron un potencial proliferativo a partir de las 24 horas; comparadas con células C33A sin transfectar y transfectadas con pEGFP-N1, estos últimos grupos no presentaron diferencias significativas entre sí. Las imágenes se analizaron con Image J. n=3 .....46

**Fig 18. Análisis del experimento de scratch evaluado en 2 diferentes tiempos 8 y 24 horas.** Se observa una disminución en el área de la herida correspondiente a las células transfectadas con la oncoproteína 18E6 de alto riesgo a partir de las 24 horas posteriores a la realización de la herida, en comparación con los grupos transfectados con MOCK, 11E6 y células C33A sin transfectar. n=3. ....47

**Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados a partir de los ORF's de las secuencias consenso de 11E6 y 18E6.** La posición de cada oligo está dada de acuerdo al plásmido o inserto donde se diseñó la secuencia. ....26

**Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios, utilizados en el ensayo de Western Blot.** 35

## 1. RESÚMEN

El Cáncer Cervico Uterino (CaCu) ocupa uno de los primeros lugares como causa de muerte por cáncer a nivel mundial y se relaciona con la infección por Virus de Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo. Tan solo en México se registraron más de 13,000 nuevos casos en 2012 de los cuales aproximadamente 4,000 de éstos casos fueron decesos por este tipo de enfermedad.

Los papillomavirus son pequeños virus de ADN de doble cadena que de acuerdo a su potencial oncogénico se clasifican en tipos de alto riesgo entre los que destacan VPH-16 y VPH-18 y los de bajo riesgo como VPH-11 y VPH-6, que corresponden a los tipos virales más comunes. Estos virus, en general, contienen 8 genes de los cuales destaca en importancia el gen E6. Éste codifica para una oncoproteína viral que contribuye a la transformación celular ya que se expresa en etapas tempranas a la infección y se asocia a un sinnúmero de reguladores celulares importantes en el control de procesos biológicos como: apoptosis, proliferación celular, transcripción de oncogenes y regulación negativa de genes supresores de tumor. Debido a la importancia de expresión continua del gen E6 para la progresión del CaCu, es necesario conocer a detalle los efectos de la oncoproteína en las células del hospedero. En este trabajo, se transfectaron células C33A, derivadas de cáncer cervical, negativas para VPH con plásmidos que contenían los marcos de lectura abiertos de genes E6 de HPV 18 y 11, de alto y bajo riesgo, respectivamente.

Encontramos un efecto diferencial en la expresión de proteínas importantes para el desarrollo celular, tales como p53 y caspasa 3, además de diferencias en la migración y proliferación celular que son asociadas a la represión de otros genes blanco. De esta forma, se desarrolló un modelo *in vitro* que permite analizar las diferencias entre las alteraciones moleculares ocasionadas por diferentes tipos de VPH lo cual nos ayudará a entender mejor esta enfermedad.

## 2. INTRODUCCIÓN

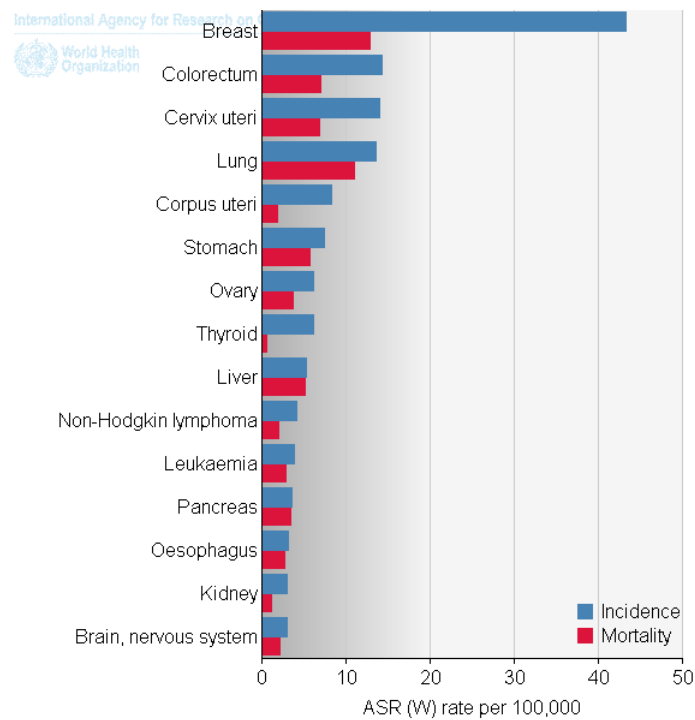
### 2.1 Cáncer

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades, comprende diversas características biológicas adquiridas por las células durante el desarrollo de tumores humanos conocidas como características distintivas del cáncer o “*Hallmarks of cancer*” y las constituyen: el crecimiento anormal de células con la capacidad de mantener la señalización de proliferación, la evasión de factores supresores del crecimiento, resistencia a señales de muerte celular, lo que permite la inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis, y la activación de la invasión y metástasis, además de características emergentes como la evasión de la respuesta inmune dentro de lo que destaca el estado inflamatorio de las lesiones premalignas y malignas, la inestabilidad del genoma y la reprogramación del metabolismo energético (Hanahan & Weinberg, 2011).

Al ser una de las principales causas de muerte en todo el mundo, con más de 8 millones de fallecimientos tan solo en 2012, el cáncer representa un problema importante en el sector salud, pues una parte de la población presenta algún factor de riesgo, como el consumo de tabaco, alcohol, la dieta poco saludable y la inactividad física (Jemal et. al, 2011). Las infecciones crónicas tales como hepatitis B, hepatitis C, se encuentran también entre los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer, de acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) las muertes por cáncer representan la primer causa de muerte a

nivel mundial y cerca del 70% de los decesos asociados a esta enfermedad se dan en los países en vías de desarrollo (de Martel et. al, 2013).

## WORLD



**Fig 1. Principales tipos de cáncer a nivel mundial.** Se muestra al cáncer cérvico uterino como la tercera causa de incidencia y mortalidad. Tomado de Ferlay 2013.

### 2.2 Cáncer cérvico uterino

A nivel mundial, el CaCU se encuentra entre las neoplasias más frecuentes en las mujeres, con alrededor de 200 000 muertes anualmente, además de ocupar la tercera posición en incidencia con alrededor de 500 000 nuevos casos, precedido por cáncer de mama y colorrectal, con tasas de incidencia y mortalidad más altas (Figura 1).

En México, anualmente se diagnostican más de 13 000 nuevos casos, de los cuales más de 4 000 fueron decesos y se estima que la mayoría de los casos de CaCU aparecen en mujeres con edades de entre 15 y 44 años (Ferlay, 2013).

Hace más de 30 años se estableció que la infección por el Virus de Papiloma Humano (VPH) era el agente causal del CaCU, por lo que éste es, hasta el momento, el único agente etiológico asociado a ésta neoplasia (zur Hausen 1977). Sin embargo, el VPH es una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de CaCU, por lo que el desarrollo del cáncer cervical depende también de otros factores de riesgo como tabaquismo, actividad sexual a temprana edad, multiparidad, uso constante de anticonceptivos orales, entre otros (Burk et.al, 1996).

El VPH es la enfermedad de transmisión sexual más común en el mundo (Baseman & Koutsky, 2005); de hecho se estima que más de la mitad de los adultos sexualmente activos tendrá contacto con este virus en algún momento de su vida. En la mayoría de los casos (90%) la infección es transitoria, asintomática y desaparece en un periodo breve de 1 a 3 años, sin embargo es persistente en una pequeña fracción de la población (5%) quienes tienen mayor probabilidad de desarrollar CaCU. Adicionalmente, la infección por VPH se asocia con cáncer de vulva, pene, ano y ciertos tipos de tumores de cabeza y cuello (Manzo-Merino et, al. 2013).

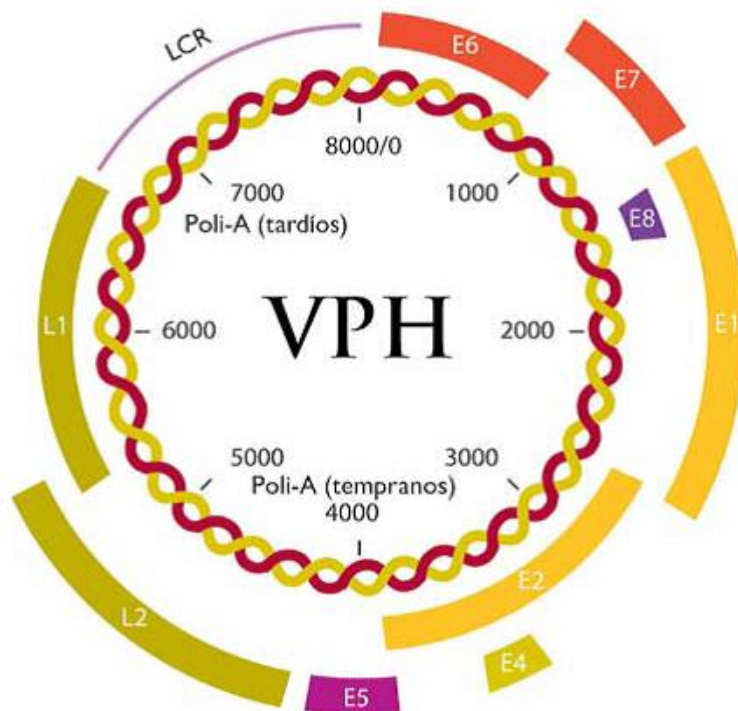
Más de 100 tipos virales se han descrito hasta este momento y aproximadamente 40 de éstos son causantes de infección a la mucosa genital y se clasifican en tipos de alto y bajo riesgo de acuerdo a su capacidad oncogénica (zur Hausen, 2009). Los virus de alto riesgo oncogénico tales como VPH16 y VPH18 son causantes de más del 90% de lesiones que progresaran a la malignidad; el tipo 16 es el más importante para el desarrollo de neoplasias, detectado en más del 50% de ellas, sin embargo el VPH18 se encuentra en el 18% de los casos y es capaz de transformar células del epitelio estratificado y mantener el genotipo maligno, por ello es la segunda causa en la formación de tumores asociados a VPH (Kaufmann et al., 2002).

Los Virus de papiloma humano de bajo riesgo tales como VPH6 y VPH11 han sido ampliamente estudiados ya que son los tipos más comunes y causan verrugas genitales o condilomas, aunque ocasionalmente en individuos inmunodeficientes se presentan casos de cáncer asociados a papilomatosis (Doorbar et al., 2012).

En la actualidad se han desarrollado métodos para el diagnóstico temprano que involucran a la histopatología y métodos citológicos como la tinción de Papanicolaou así como el uso de métodos moleculares para la detección de VPH en muestras clínicas. Hasta el momento se han desarrollado dos vacunas profilácticas; una bivalente, VPH 18 y 16 y otra tetravalente 16, 18, 6 y 11 (Koutsky et al., 2002).

### 2.3 VPH

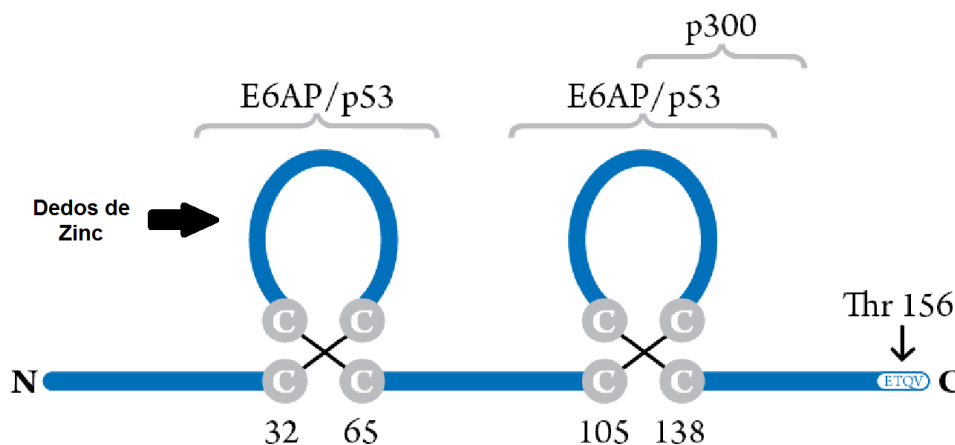
Los papillomavirus son virus desnudos y pequeños de aproximadamente 55 nm de diámetro, con un genoma circular de doble cadena de DNA aproximadamente de 8 kb (Fig 2) y se divide en 3 regiones: una Región Larga de Control (LCR por sus siglas en ingles), una región codificante para las proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y la región tardía donde se encuentran codificados los genes L1 y L2 (Howie, Katzenellenbogen, & Galloway, 2009).



**Fig 2. Organización del genoma de VPH.** Una molécula circular de doble cadena que se divide en 3 regiones: la región larga de control (LCR), los genes tempranos E1-E6 y la región tardía con los genes L1 y L2. Tomado de Saavedra 2006.

### 2.3.1 La oncoproteína E6

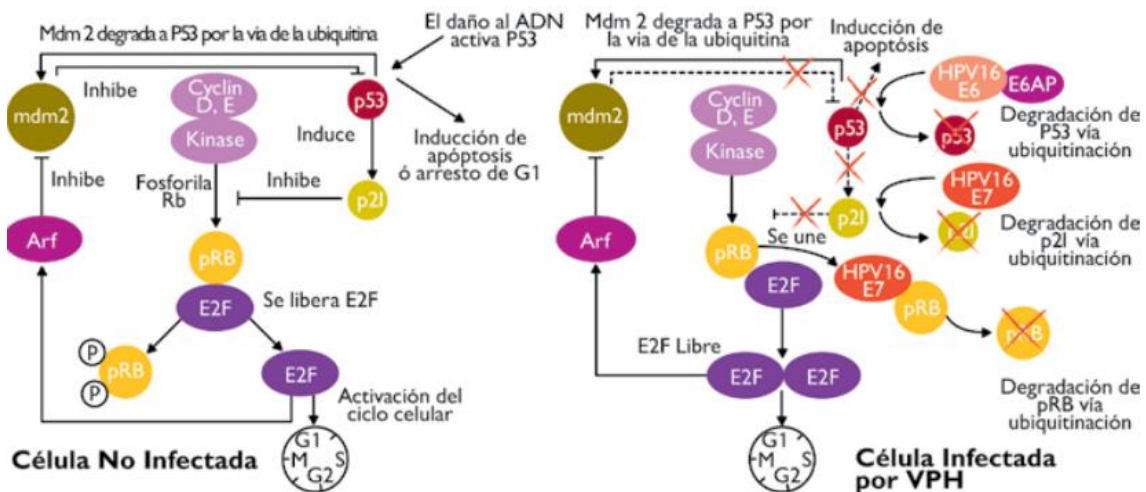
Todos los Papilomavirus humanos codifican la proteína E6, que se expresa en etapas tempranas de la infección y contribuye al desarrollo de tumores metastáticos logrando el establecimiento del genotipo viral (Doorbar, 2006). Ésta proteína, consta de 150 aminoácidos y se caracteriza un dominio CX<sub>2</sub>C-X<sub>29</sub>CX<sub>2</sub>C denominado dedos de zinc (Fig 3) que se encuentra conservado en los VPH de alto riesgo y se une a distintos blancos celulares, lo que le permite regular la diferenciación celular, inhibir la apoptosis e incluso bloquear la respuesta inmune (Vande Pol & Klingelutz, 2013).



**Fig 3. Estructura de la oncoproteína E6.** Se esquematizan las estructuras denominadas dedos de zinc y los sitios de unión asociados a la ubiquitin ligasa E6AP y a la proteína supresora de tumores p53. Modificado de Lizano 2009.

Una de las interacciones mejor estudiadas es la que se lleva a cabo entre E6 y la proteína supresora de tumores p53, que funciona como un factor de transcripción que controla la estabilidad genética y previene el cáncer. Además de promover arresto celular, apoptosis y senescencia, la inactivación de esta proteína es un paso crítico en la tumorigénesis (Golubovskaya & Cance, 2013).

En la figura 4 se muestra que en células normales, no infectadas los niveles de p53 son regulados por una ubiquitin ligasa E3 conocida como Mdm2; sin embargo durante la infección por VPH, ésta interacción se ve interrumpida ya que E6 es capaz de formar un complejo con una proteína asociada denominada E6-AP, una ubiquitin ligasa E3 que induce la degradación de p53 (Scheffner, Huibregtse, Vierstra, & Howley, 1993) ya sea reduciendo la vida media del supresor de tumores de 3 horas a 20 minutos, o bien a la proteína en el citoplasma, bloqueando su translocación al núcleo e inhibiendo su función como factor de transcripción (Mantovani & Banks, 1999).



**Fig 4. Mecanismo de degradación de p53 durante la infección por VPH.** En células no infectadas la degradación del supresor de tumores esta mediado por Mdm2 mientras que en células infectadas, la oncoproteína E6 se asocia a E6AP e inhibe la acción de p53 por ubiquitinación. Tomado de Saavedra 2006.

La importancia de p53 como supresor de tumores se ilustra en la prevalencia de mutaciones en TP53 (el gen humano que codifica a p53) ya que se encuentra mutado en más del 50% de los casos de cáncer en general (Polager & Ginsberg, 2009).

Tanto E6 de alto como de bajo riesgo son capaces de interactuar con p53 ya que ambas proteínas se unen al extremo C-terminal de p53; sin embargo sólo E6 de alto riesgo se une a la región núcleo de p53 facilitando así el reconocimiento y asociación con E6-AP y ejerciendo una regulación negativa sobre el factor de transcripción, esto se debe a las diferencias en el C-terminal entre las proteínas de alto y bajo riesgo (Li & Coffino, 1996).

Una característica en el desarrollo de neoplasias es el de la proliferación celular descontrolada debido a la necesidad del virus por replicar su genoma constantemente utilizando la maquinaria del hospedero, aunque el genoma del VPH consta de alrededor de 8 kb, ninguno de sus genes codifica para proteínas capaces de replicar su propio ADN directamente, es por ello que la expresión continua de las oncoproteínas E6 y E7 es necesaria para provocar una expansión en la población de células competentes en las que se reactiva la maquinaria de replicación del ADN de la célula huésped y permite la amplificación del genoma viral (Thomas et al., 2008).

La inhibición de la muerte celular programada es un paso importante en el establecimiento del fenotipo maligno, para ello E6 interviene tanto en la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis, en la vía extrínseca, E6 Interactúa con TNFR-1, FADD y caspasa 8 e inhibe la apoptosis mediada por los ligandos Fas y TRAIL uniéndose al adaptador FADD y al efector de caspasas (Filippova, Song, Connolly, Dermody, & Duerksen-Hughes, 2002) lo que ejerce un efecto negativo en la señalización de la apoptosis facilitando la proliferación celular y evadiendo la muerte celular programada.

Mientras que en la vía intrínseca, E6 degrada a una única proteína proapoptótica conocida como Bak por la vía del proteasoma, y que es parte importante de la activación de la apoptosis ya que en respuesta a señales de muerte celular, Bak favorece la formación de poros en la mitocondria y la subsecuente liberación de citocromo C activando caspasas que son parte fundamental del apoptosoma por ejemplo caspasa 3 y 9, estableciendo la capacidad oncogénica de E6 y la importancia en la expresión durante el ciclo viral del VPH (Jackson, Harwood, Thomas, Banks, & Storey, 2000).

Aunque se ha demostrado que la acción de E6 en los VPH de alto riesgo es suficiente para la inducción de la transformación y progresión del ciclo celular, es necesaria la participación conjunta de la oncoproteína E7, ya que desempeña un papel importante en la unión a proteínas que controlan la replicación celular (Münger et al., 2004).

### 2.3.2 La oncoproteína E7

El potencial oncogénico de la oncoproteína E7 reside en su capacidad transformante debido a que se une a pRB (proteína del retinoblastoma), misma que regula la replicación celular mediante la unión de factores de transcripción E2F que, a su vez, regulan el inicio de la fase S del ciclo celular. En células normales, pRB es controlada por los complejos CDK4: donde la fosforilación de pRB libera los factores de transcripción E2F, provocando la progresión del ciclo celular.

En presencia de E7 se forma un complejo E7-pRB que evita la unión pRB-E2F y como resultado de la liberación de E2F se expresa ciclina E, que es importante en la progresión celular, ya que su expresión evita el *checkpoint* de la transición G1/S, dando continuidad al ciclo celular y favoreciendo una proliferación descontrolada (Dyson, 1998).

La expresión de E7 también promueve immortalización celular por medio de la unión a histonas des-acetilasas (HDACs), permitiendo la transcripción dependiente de E2F y potenciando la transformación celular (Brehm et al., 1999a). Las diferencias funcionales entre las oncoproteínas E6 y E7 conllevan a una asociación de características que promueven el sostenimiento del fenotipo viral por ello es necesaria la expresión conjunta de estas proteínas para favorecer el desarrollo de neoplasias malignas y el establecimiento de tumores.

### 2.3.3 Los genes E1-E5

Una vez en la célula huésped, los genes E1 y E2 juegan un papel importante en la maquinaria de replicación viral ya que estos genes son codificados y expresados inicialmente, formando un complejo que se une al origen de replicación y coopera en el reclutamiento de polimerasas de la célula hospedera que serán necesarias para la replicación del genoma. Mientras que el gen E1 actúa como helicasa, desenrollando el DNA adyacente al origen de replicación, E2 codifica proteínas que inhiben la transcripción de genes tempranos y aumentan la transcripción de genes implicados en la internalización del genoma viral (Gillitzer, Chen, & Stenlund, 2000).

La secuencia codificante de la proteína E4 se encuentra dentro del ORF del gen E2 y se expresa durante las etapas tardías del ciclo viral, en 2002 se demostró que el transcrito procesado de E1^E4 de VPH 16 causa el arresto del ciclo celular en la fase G2 del ciclo celular en células HeLA y SiHa, el hecho de que ambas proteínas puedan inhibir el ciclo celular sugiere una acción conjunta durante el ciclo viral, además E4 es capaz de inhibir la transcripción de los genes virales, regulando los niveles del factor de transcripción E2 dependiendo de las concentraciones de la proteína E1, lo que facilitaría la amplificación del genoma viral y la expresión de las proteínas tempranas (Davy et al., 2002)

Aunque el papel del gen E5 en la transformación celular esta poco entendido, uno de sus efectos conocidos es sobre el potencial de inmortalización de las proteínas E6, E7 y desregulación de la comunicación intercelular, lo que lleva a la re-estructuración del epitelio normal y por lo tanto diferenciación (Kivi, Greco, Auvinen, & Auvinen, 2008).

#### 2.3.4 Los genes L1 y L2

Conocidos como genes tardíos debido a que se expresan en etapas posteriores a la infección L1 y L2 codifican las proteínas estructurales, que al ensamblarse, forman una cápside icosaédrica conformada por 72 capsómeros: alrededor de 360 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2. Recientemente se ha propuesto que las proteínas L2 tienen una función en la transferencia del genoma del VPH desde el citoplasma hacia el núcleo de queratinocitos mitóticos, ambas proteínas desempeñan un papel importante en la infección del virus (Nguyen, Ramírez-Fort, & Rady, 2014).

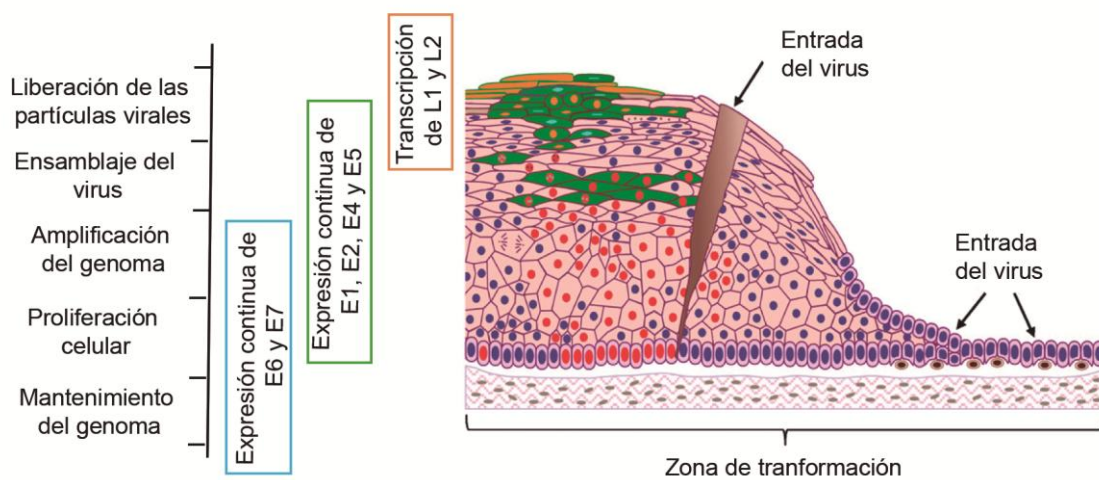
### 2.3.5 La región larga de control (LCR)

Esta región concentra elementos regulatorios en *cis* que gobiernan la expresión génica y no tiene marcos de lectura abiertos (ORF's), contiene 3 regiones definidas como: un promotor temprano que solo es activo en células de cáncer cervical o queratinocitos, un amplificador de alrededor de 230 pb que se encuentra entre dos sitios de unión a E2 y se encuentra flanqueado por L1 y E6 y una región 5' con sitios de termino de transcripción y de poliadenilación así como elementos regulatorios que actúan en la maduración de transcritos de RNA mensajero (RNAm) (O'Connor, Chan, & Bernard, 1995).

## 2.4 Ciclo de vida del VPH

Los viriones de VPH tienen un tropismo específico en células de la zona de transformación del cuello uterino, en el epitelio columnar del endocérnix y en el epitelio escamoso del ectocérnix. Las partículas infecciosas pueden entrar por una abertura ocasionada por una lesión o microtraumas (Fig 5) y la entrada del virus en las células del hospedero esta mediada por la presencia de proteoglicanos de sulfato de heparina presentes en la membrana plasmática, además se requiere la presencia de receptores secundarios como la integrina  $\alpha 6$  asociada a las integrinas  $\beta 4$  y  $\beta 1$  para una infección eficiente (McMillan, Payne, Frazer, & Evander, 1999). La internalización se da por endocitosis y el transporte del genoma es vía caveolar por vesículas revestidas de clatrina a través del retículo endoplasmico liso. Este microambiente facilita la infección viral (Day, Lowy, & Schiller, 2003).

Una vez internalizado el genoma del virus es replicado de forma episomal en un bajo número de copias. Si la zona metaplásica del cuello del útero se infecta con el VPH, la división celular, la migración lateral, y la diferenciación glandular pueden proporcionar un conducto para que el VPH pueda ser transportado a través de la mucosa endocervical y migrar hacia las capas superiores del epitelio estratificado (Chow, Broker, & Steinberg, 2010).



**Fig 5. Ciclo de vida del VPH de alto riesgo en epitelio estratificado.** La zona de entrada del virus ocurre en lesiones de epitelio y la expresión continua de las oncoproteínas E6 y E7 favorece la proliferación celular y el mantenimiento del genoma. Los genes tardíos L1 y L2 codifican para las proteínas de la cápside por ello se expresan en capas externas del epitelio. Modificado de Doorbar 2012.

En los VPH de alto riesgo, la proteína L2 forma complejos con DNA, asegurando la entrada del genoma viral hacia el núcleo, mientras que la proteína L1 es retenida en el endosoma y sujeta a degradación lisosomal (Sapp & Bienkowska-Haba, 2009). Al trasladarse el genoma viral al núcleo existe una expresión continua de las oncoproteínas E5, E6 y E7 que estimulan la proliferación celular, supervivencia a señales pro-apoptóticas y modulación de la diferenciación de queratinocitos además de conducir el proceso de la

amplificación del genoma, que ocurre en las capas superiores, donde aumenta la actividad transcripcional de promotores que se encuentran en el marco de lectura de E7 (Brehm et al., 1999).

El empaquetamiento de las partículas virales ocurre en las capas superiores del epitelio, donde las células infectadas son descamadas y la progenie viral es liberada dando lugar a una nueva infección (zur Hausen, 2002; Lizano-Soberón et al., 2009),

El virus de papiloma puede permanecer estable extracelularmente debido a que es resistente a la desecación lo que permite la transmisión a otros individuos por vía sexual. Por ello, es capaz de mantener una infección productiva durante mucho tiempo, así mismo las infecciones relacionadas con VPH se han vuelto más comunes y el riesgo de adquirir el virus es de alrededor del 80% en individuos sexualmente activos (Doorbar 2013).

Actualmente el desarrollo de herramientas moleculares para el estudio de los genes que constituyen al VPH va en aumento, diversos estudios toman como referencia el uso de vectores plasmídicos ya sea para el silenciamiento o la expresión de genes debido a la capacidad que tienen para reproducirse independientemente del ADN cromosomal y a la facilidad de manipulación para la inserción de secuencias, por ello es necesario la aplicación de estas herramientas y la generación de modelos de estudio que nos acercan conocer a detalle el proceso de establecimiento de la tumorigénesis relacionada con el VPH.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La prevalencia por infecciones y desarrollo de cáncer por VPH va en aumento, donde uno de los factores clave en el desarrollo de neoplasias es la expresión de la oncoproteína E6 codificada en el genoma viral y que es parte fundamental del potencial oncogénico ya que inhibe los mecanismos de reparación de errores, inhibición de la apoptosis y favorece la proliferación de las células infectadas. Para comprender los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de neoplasias asociadas a la infección por el virus, es necesario conocer a fondo las funciones de esta oncoproteína que se expresa en etapas tempranas de la enfermedad, por medio de la generación de modelos de estudio *in vitro* y el desarrollo de plásmidos de expresión.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las oncoproteína E6 del VPH de alto riesgo favorece la proliferación celular en queratinocitos infectados por este virus. La transfección de células C33A con un plásmido de expresión 18E6 de alto riesgo presentará un mayor potencial de migración y proliferación comparado con células transfectadas con un plásmido 11E6 de bajo riesgo.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la proliferación y migración de células C33A transfectadas con los plásmidos de expresión pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6.

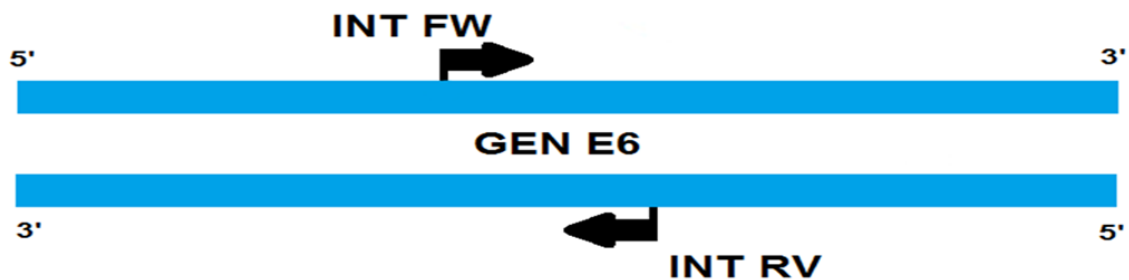
#### **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Clonación de las oncoproteínas 18E6 y 11E6 en un vector plasmídico.
- 2) Generar vectores de expresión pEGFP-N1 con los ORF`s 11E6 y 18E6.
- 3) Transfección de los vectores de expresión pEGFP-N1 con los ORF`s 11E6 y 18E6 en células C33A.
- 4) Determinar el nivel de expresión de las proteínas p53 y caspasa 3 en células C33A transfectadas con los ORF´s 11E6 y 18E6.
- 5) Realizar ensayos de migración y proliferación en células C33A transfectadas con los ORF´s 11E6 y 18E6.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Verificación de las secuencias de los genes 11E6 y 18E6

Los plásmidos pMSCV/11E6 ID: 37873 y pMSCV/18E6 ID: 37884 fueron adquiridos en ADDGENE®. Para verificar la secuencia de los genes se utilizaron los oligonucleótidos 11E6IntFw, 11E6IntRv y 18E6IntFw, 18E6IntRv (Tabla1) empleando el kit Dye Terminator Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer). La secuencia se realizó a través del software ABI PRISM 3130xl GENETIC Analyzer System (Applied Biosystems) en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la UBIPRO en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Esta estrategia generó dos lecturas divergentes a partir de la región central de cada ORF, lo que permitió conocer la secuencia de los extremos (Fig 6).



**Fig 6. Diagrama general de la estrategia utilizada para verificar la secuencia de los genes 11E6 y 18E6.** A partir de oligonucleótidos localizados en la región central del gen se puede conocer la secuencia de los extremos y comparar el resultado con la secuencia consenso de NCBI.

Las dos lecturas obtenidas de cada ORF se alinearon para obtener la secuencia completa y compararla con las secuencias reportadas en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI por sus siglas en inglés) HPV11 (ID: M14119.1) y HPV18 (ID: X05015.1). Todas las secuencias se analizaron con ayuda del software CLC SequenceViewer 7 (CLC Bio).

| Nombre    | Secuencia 5' 3'                 | Posición  | Plásmido o Inserto |
|-----------|---------------------------------|-----------|--------------------|
| 11E6Fw    | ATG GAA AGT AAA GAT GCC TC      | 1-20      | 11E6               |
| 11E6Rv    | TTA GGG TAA CAA GTC TTC CA      | 434-453   |                    |
| 11E6IntFw | AAC TTT CCC TTT GCA GCG TG      | 172-191   |                    |
| 11E6IntRv | TCC AGC AGT GTA AGC AAC GA      | 405-424   |                    |
| 18E6Fw    | ATG GCG CGC TTT GAG GAT CC      | 1-20      | 18E6               |
| 18E6Rv    | TTA TAC TTG TGT TTC TCT GCG TCG | 454-477   |                    |
| 18E6IntFw | ATT AAT AAG GTG CCT GCG GT      | 303-322   |                    |
| 18E6IntRv | ATA GTG CCC AGC TAT GTT GT      | 383-402   |                    |
| M13Fw     | GTT TTC CCA GTC ACG AC          | 2949-2972 | pGEM-T Easy        |
| CMV Fw    | CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG     | 519-539   | pEGFP-N1           |

**Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados a partir de los ORF's de las secuencias consenso de 11E6 y 18E6.** La posición de cada oligo está dada de acuerdo al plásmido o inserto donde se diseñó la secuencia.

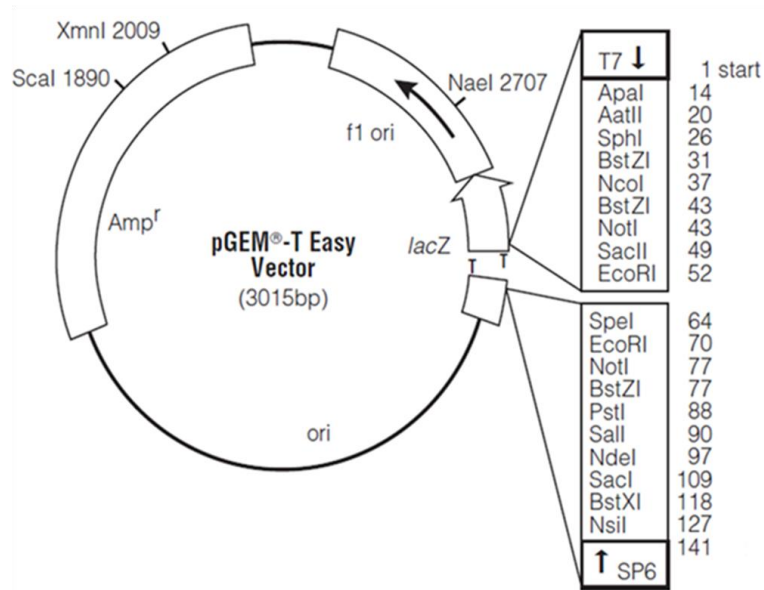
## 7.2 Construcciones

### 7.2.1. Clonación en el vector pGEM-T Easy

A partir de los plásmidos pMSCV/11E6 y pMSCV/18E6, se amplificaron los ORF's de 11E6 Y 18E6, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final (por sus siglas en inglés, PCR-pf), con los oligonucleótidos 11E6Fw-11E6Rv y 18E6Fw-18E6Rv (Tabla 1) en las siguientes condiciones: 92°C-5 min

de desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 95°C-20 seg de desnaturalización, 55°C-20 s de alineamiento y 72°C- 40 s de extensión, con una elongación final de 72°C de 7 min. Se purificaron los productos de PCR a partir de un gel de agarosa al 1.5% con el kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen # 28704) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El vector pGEM®-T Easy (Promega #A1360) tiene la capacidad de ligar y clonar productos resultantes de la PCR, debido a los extremos T romos con los que cuenta y que son complementarios a los extremos A de 11E6 y 18E6 resultantes de la actividad transferasa terminal de la Taq polimerasa utilizada en la reacción de PCRpf, para la ligación de los ORF's de 11E6 y 18E6 en pGEM se utilizo el kit pGEM®-T Easy Vector System (Fig 7) siguiendo las instrucciones del fabricante (brevemente: ~200 ng de DNA de cada inserto, en 1 µg de plásmido con 2U de enzima T4 DNA ligasa y Buffer DNA ligasa 1X).



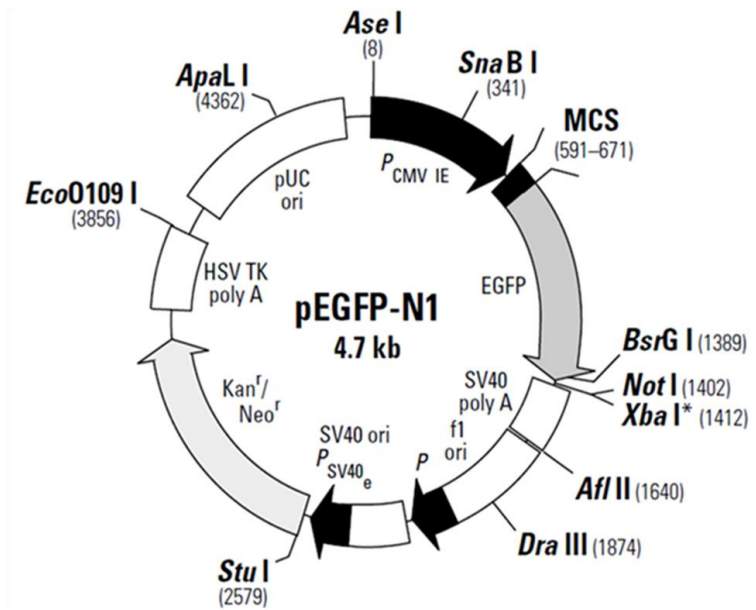
**Fig 7. Vector de clonación GEM-T Easy.** En este vector se ligaron los ORF's de los genes 11E6 y 18E6.

Para seleccionar los vectores que contenían los marcos abiertos de 11E6 y 18E6, se prepararon bacterias JM109 (Promega #L2001) competentes con el método de cloruro de calcio (Cohen, 1972) y se transformaron con los productos de la ligación pGEM11E6 y pGEM18E6.

Se seleccionaron los plásmidos pGEM11E6 y pGEM18E6 que tuvieran una orientación 5' a 3' de los ORF's de 11E6 y 18E6 respecto a los sitios de restricción de las enzimas Pst I y Apa I de pGEM-T Easy. Para ello se realizó una reacción de PCR de colonia usando los oligonucleótidos M13Fw, 11E6 Fw y 18E6 Fw (Tabla 1) con las condiciones de amplificación antes mencionadas, la purificación de los plásmidos mediante Miniprep por lisis alcalina se realizó con el kit QIAprep® Spin Miniprep kit (Qiagen #27104) a partir de cultivos de 16 h en medio Luria Bertani (LB) con (100 µg/ml) de ampicilina.

#### **7.2.2. Subclonación en el vector pEGFP-N1**

El vector pEGFP-N1 (Clontech #6085-1, GenBank #U55762) codifica para una variante de la proteína GFP y ha sido optimizado para expresarse con eficiencia en células de mamíferos (Fig 7) además de contar con un gen que confiere resistencia a kanamicina en *E. coli*.

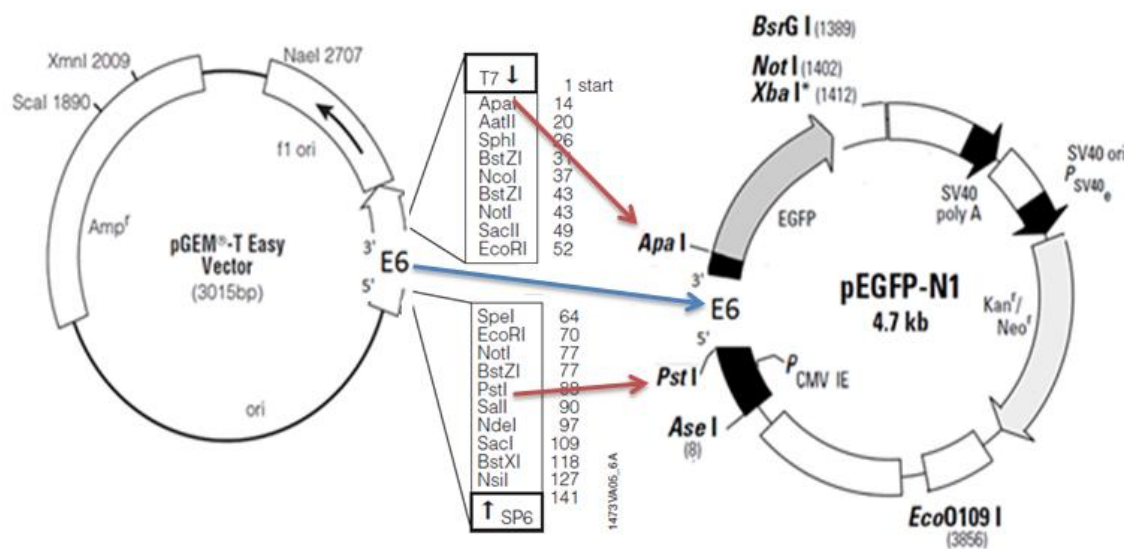


**Fig 8. Vector pEGFP-N1.** Utilizado en la subclonación de los ORF'S de 11E6 y 18E6 debido a que cuenta con sitios de restricción en común con pGEM-T Easy lo que nos permite realizar una ligación sitio dirigida.

Tanto el vector pGEM-T Easy como pEGFP-N1 cuentan con dos sitios de restricción en común, para las enzimas *Pst* I y *Apa* I que generan extremos cohesivos necesarios para realizar una ligación sitio-dirigida de los insertos liberados de pGEM-T Easy en el vector pEGFP-N1 (Fig 9).

Los plásmidos pGEM11E6 y pGEM18E6 fueron digeridos con *Pst* I (NEB #R0114) y *Apa* I (NEB #R0140S), para liberar los ORF's de los genes de interés; el vector pEGFP-N1 fue digerido con las mismas enzimas para generar los extremos complementarios a los insertos 11E6 y 18E6 digeridos. Las digestiones enzimáticas se realizaron de manera secuencial, purificando mediante fenol-cloroformo después de la primera digestión.

Para cada digestión, se usaron 500 ng de plásmido, buffer de reacción 1x y 50U de *Apa* I y 20U de *Pst* I, respectivamente, en un volumen de 20 µl. Los ORF's 11E6 y 18E6 liberados así como el vector pEGFP-N1 digerido fueron purificados a partir de un gel de agarosa al 1.5% con QIAquick® Gel Extraction Kit.



**Fig 9. Esquemización de la estrategia utilizada para subclonar los ORF's de los genes E6 en pEGFP-N1.** Fueron elegidos los sitios de restricción *Pst*I y *Apa*I encontrados tanto en pGEM-T Easy y pEGFP-N1 para realizar las construcciones pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6. Las anotaciones 5' y 3' hacen referencia a la orientación de los insertos E6.

La ligación de 11E6 y 18E6 en el vector pEGFP-N1 se realizó a razón de 3:1 moléculas respectivamente (Dugaiczyk, 1975) en un volumen final de 20 µl con Buffer de ligasa 1X y 1 U de T4 DNA Ligase (Promega #M180A). En seguida, se transformaron bacterias *E. coli* JM109 con el resultado de la ligación antes mencionada; las bacterias transformadas se sembraron en agar sólido con kanamicina (50 µg/ml) y fueron incubadas a 37°C toda la noche.

Con el objetivo de corroborar la presencia de los insertos 11E6 y 18E6 en el vector pEGFP-N1, se tomaron colonias de pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6, las cuales fueron amplificadas mediante PCRpf con los oligonucleótidos CMV Fw, 11E6Rv y 18E6Rv (Tabla 1) con las condiciones de amplificación antes mencionadas. Se seleccionaron las colonias que contenían el inserto para la preparación del plásmido a transfectar.

Finalmente, se hicieron maxi preparaciones de los plásmidos con las construcciones pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6, mediante Zyppy™ Plasmid Maxiprep Kit (Zymo #D4028), a partir de 150 ml de cultivo líquido en medio LB adicionado con kanamicina (50 µg/ml) en incubación a 37°C toda la noche.

Los plásmidos pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6 purificados fueron utilizados en los experimentos de transfección.

### **7.3 Cultivo Celular**

Para los experimentos de transfección se utilizó la línea celular C33A (ATCC® CRMHTB31™), la cual fue proporcionada por el laboratorio de Oncogenómica del Instituto Nacional de Cancerología (INCan). La línea C33A de queratinocitos, aislada de cáncer de cérvix negativo para papiloma, fue cultivada en medio Eagle modificado de Dulbecco/-F-12 (DMEM F-12) de GIBCO®; suplementado con suero fetal bovino inactivado (SFB) al 10%, de Corning-Cellgro®. Esta línea celular fue sembrada en cajas petri de 100 X 15 mm para cultivo de tejidos y se mantuvo en una incubadora Thermo scientific Series 8000WJ, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

El cambio de medio se realizó cada tercer día hasta que las células alcanzaran una confluencia del 80%. Para realizar los ensayos, la línea celular C33A fue cosechada con 1 ml de Tripsina 2.5% (10X) de Caisson Lab y centrifugadas a 1500 rpm durante 4 minutos.

#### **7.4 Transfección**

Con el objetivo de introducir los plásmidos pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6 para la expresión de los genes de interés en C33A, se realizaron transfecciones utilizando Lipofectamine ® 2000 (Invitrogen #12566-014). Brevemente, se prepararon dos mix: 1) Opti-MEM + Lipofectamina y Plus reagent, el cual fue incubado a temperatura ambiente por 5 minutos; 2) Opti-MEM y DNA de cada plásmido: pEGFP-11E6, pEGFP-18E6 y pEGFP-N1. Se mezclaron ambos mix y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente, para permitir la formación de complejos lipídicos con el DNA; posteriormente se adicionó la mezcla de transfección por goteo a las células C33A y se dejó en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **7.5 Ensayos de viabilidad celular**

Se realizó un experimento de MTT con el objetivo de conocer las diferencias entre el número de células viables debido a la acción de las enzimas oxidoreductasas capaces de reducir el MTT en su forma insoluble Formazan de color púrpura en células C33A transfectadas con los plásmidos de alto y bajo riesgo. Se sembraron en placas de 96 pozos de 10,000 células C33A por cada pozo y se transfectaron con los plásmidos pEGFP-11E6, pEGFP-18E6 y pEGFP-N1 sin inserto como control.

Después de 72 horas post-transfección, se llevó a cabo el ensayo de proliferación con el reactivo MTT-Formazan (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio, Santa Cruz Biotechnology #215399) de acuerdo a las instrucciones del fabricante a una concentración de 5 mg/ml. Los datos obtenidos fueron analizados con ANOVA de una sola vía y prueba de Tukey ( $p < 0.5$ ).

## **7.6 Ensayos de migración celular**

En placas de 6 pozos se sembraron 500,000 células C33A por pozo, las cuales fueron transfectadas con los plásmidos pEGFP-11E6, pEGFP-18E6 y pEGFP-N1 sin inserto como control. Después de 24 horas post-transfección se realizó el ensayo *In vitro scratch assay* (Liang, 2007) que consiste en generar una “herida” en la monocapa celular con el objetivo de evaluar el potencial de migración en células C33A transfectadas con los plásmidos pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6. Estas fueron comparadas con 2 grupos control: un grupo de células sin transfectar y otro grupo transfectado con pEGFP-N1. Posterior a la realización de la “herida” todos los grupos fueron evaluados a 8 y 24 horas respectivamente, mediante visualización en un microscopio invertido. Los datos obtenidos fueron analizados con el software Image J.

Los volúmenes correspondientes a los reactivos utilizados en las transfecciones se muestran en el anexo 1.

### **7.7 Western Blot**

Para evaluar la actividad de p53 y caspasa 3 en células C33A transfectadas con pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6 se realizó *Western Blot* a partir de placas de 6 pozos con 500,000 células por pozo. Se realizó la extracción de proteínas 72 horas post-transfección con los plásmidos pEGFP-11E6, pEGFP-18E6 y pEGFP-N1 y células C33A sin transfectar, mediante el kit RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz Biotechnology #sc-24948) adicionado con inhibidor de proteasas Complete 1X de ROCHE. La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica colorimétrica de Bradford (Bradford, 1976), de la marca SIGMA, empleando un espectrofotómetro de placas Epoch Microplate Spectrophotometer de Biotek®.

En geles de poliacrilamida al 12% (PAGE) en el equipo Mini-Protean Tetra System (BioRad) a 80 volts por 2 horas, se separaron 50 µg de proteínas de cada una de las extracciones, diluidas en Laemmli Buffer 1X. En seguida, las proteínas fueron transferidas a una membrana de *Polifluoruro de Vinilideno* (PDVF, por sus siglas en ingles), para ello se empleo un equipo de transferencia semi-seca Trans-Blot Turbo (BioRad) bajo el protocolo estándar: a 20 volts y 1 mA durante 30 minutos. La membrana con las proteínas se lavó con Tris Buffer Salino 1X y Tween 20 al 0.5% (TBS-Tween). Con el objetivo de bloquear los sitios de unión que quedaron libres tras la transferencia para que el anticuerpo pueda unirse sólo a su antígeno específico, la membrana se bloqueó durante 2 horas con leche libre de grasa al 5% en TBS-Tween a temperatura ambiente. Se incubó la membrana durante toda la noche a 4°C con anticuerpo primario (Ab) correspondiente: p53 ó caspasa 3 a una dilución de 1:500; se empleó  $\beta$ -actina como control de carga a una dilución 1:2000.

Todos los Ab's empleados fueron de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology (Tabla 2)

| Anticuerpo           | No. de Catalogo |
|----------------------|-----------------|
| Anti-p53             | Sc-126          |
| Anti-Caspasa 3       | Sc-7148         |
| Anti- $\beta$ Actina | Sc-47778        |
| Anti-mouse-HRP       | Sc-2371         |
| Anti-Rabbit-HRP      | Sc-2370         |

**Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios, utilizados en el ensayo de Western Blot.**

Después de la incubación en Ab primario la membrana fue incubada con Ab secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) de Santa Cruz Biotechnology (Tabla 2) durante 2 horas a temperatura ambiente a una dilución 1:2000. Después del lavado con TBS, la membrana fue visualizada por medio de una reacción quimioluminiscente usando el kit de detección SuperSignal West Femto Máximo Sensitivity Substrate (Thermo Scientific #34094). La detección de los inmunocomplejos se realizó con el equipo digitalizador C-Digit Blot Scanner y empleando el software ImageStudio, ambos de (Li-COR).

Todos los ensayos descritos fueron realizados por triplicado y de manera independiente.

## **8. RESULTADOS**

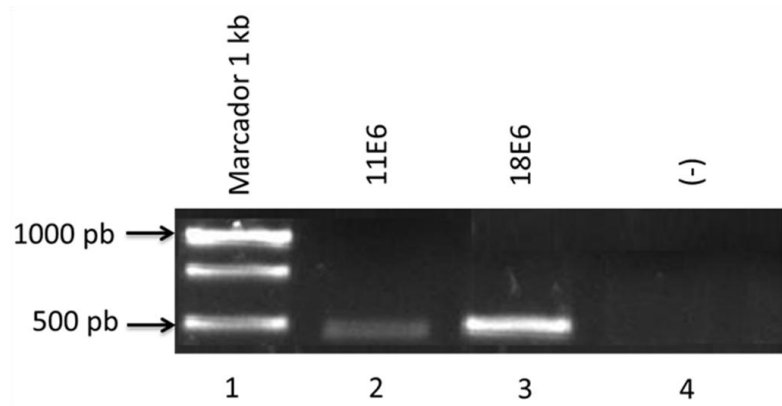
### **8.1 Secuenciación de los plásmidos pMSCV/11E6 y pMSCV/18E6**

Una vez obtenidas las secuencias de los plásmidos pMSCV/11E6 y pMSCV/18E6, se compararon con las secuencias de los genes de interés 11E6 y 18E6 reportadas en NCBI. En la figura 10 se muestran los resultados de los alineamientos entre las secuencias consenso y los genes de interés donde se observa la presencia de una mutación en el codón de término de la traducción en las secuencias encontradas en pMSCV/11E6 y pMSCV/18E6, ya que éstos plásmidos en particular están optimizados para generar transcritos de proteínas de fusión. Sin embargo, nuestras construcciones si cuentan con el codón de término de la traducción debido a que los oligonucleótidos de 11E6 Rv y 18E6 Rv lo incluyen (Tabla 1).



## 8.2 Clonación de 18E6 y 11E6 en el vector pGEM-T Easy

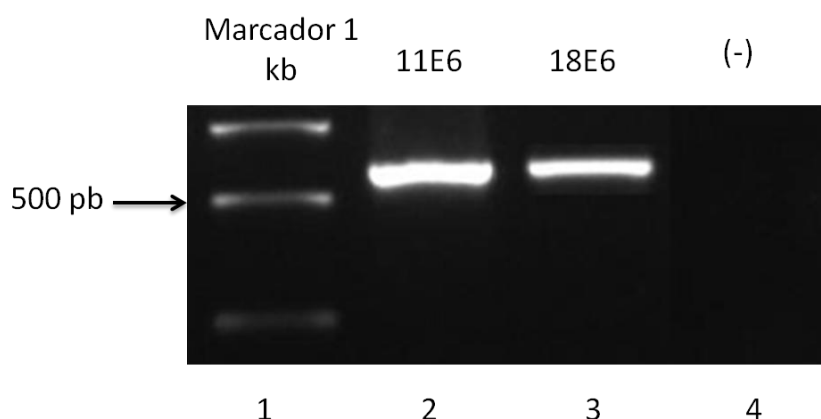
Una vez verificada la secuencia los ORF's de 11E6 y 18E6 se realizó una amplificación por PCRpf a partir de los plásmidos pMSCV/11E6 y pMSCV/18E6. El resultado de la reacción se muestra en la figura 11 donde se observan bandas correspondientes a los pesos moleculares de los genes de interés: 453 pb para 11E6 y 477 pb para 18E6.



**Fig 11. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de los ORF's de 11E6 y 18E6.** En los carriles 2 y 3 se observan las bandas correspondientes al peso molecular de cada gen: 11E6 (453 pb) y 18E6 (477 pb) amplificados a partir de los plásmidos pMSCV para su posterior ligación en pGEM-T Easy.

Los productos de la reacción de PCRpf fueron purificados y ligados en el vector de clonación pGEM-T Easy. Con el resultado de las reacciones de ligación pGEM11E6 y pGEM18E6 se realizó la transformación de bacterias competentes y la selección de clones que contenían los ORF's de 11E6 y 18E6 ligado en pGEM-T Easy con una orientación 5' a 3' respecto al sitio de restricción PstI. Lo anterior con el motivo de aislar aquellos plásmidos que una vez digeridos con las enzimas de restricción PstI y Apal generaran los extremos complementarios necesarios en la construcción de los plásmidos de expresión pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6 (Ver Fig 9).

Para corroborar la orientación de los insertos de 11E6 y 18E6, se realizó una amplificación PCRpf con los oligonucleótidos 11E6 Fw, 18E6 Fw y M13 Fw (Tabla 1). Este último se une al vector pGEM-T Easy en la región adyacente al sitio de multiclonación. Este experimento indica la orientación de los ORF's en el vector.

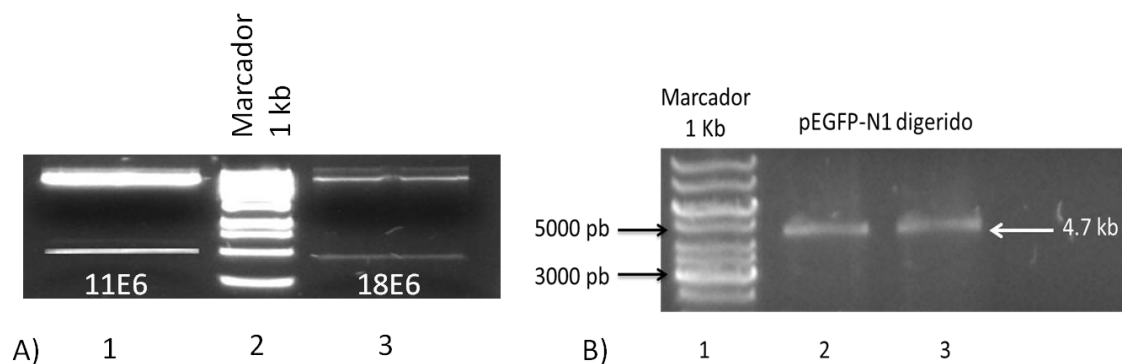


**Fig 12. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones mediante PCR pf de los plásmidos pGEM11E6 y pGEM18E6.** En el carril 2 y 3 se muestran las bandas correspondientes al peso molecular esperado de los ORF'S de 11E6 (540 pb) y 18E6 (560 pb) amplificados con los oligonucleótidos M13 Fw, 11E6 Rv y 18E6 Rv.

La amplificación mostrada en la figura 12 indica que los ORF's de 11E6 y 18E6 tienen una orientación 5' a 3' respecto a los sitios de restricción PstI-ApaI en el vector pGEM-T Easy. Finalmente, se realizaron mini preparaciones de los plásmidos pGEM11E6 y pGEM18E6.

### 8.3 Generación de los vectores de expresión pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6

Para liberar a los ORF's 11E6 y 18E6 del vector de clonación, fue necesario realizar la doble digestión con las enzimas de restricción PstI y Apal de los vectores de pGEM11E6 y pGEM18E6 previamente analizados. El vector pEGFP-N1 se digirió con las mismas enzimas para generar los extremos complementarios correspondientes. Finalmente, 11E6 y 18E6 liberados fueron ligados en pEGFP-N1, generando dos vectores: pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6.

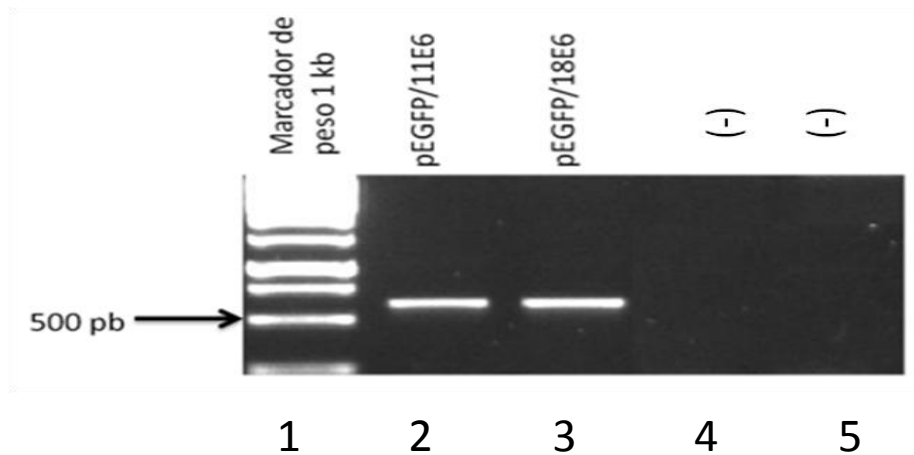


**Fig 13. Electroforesis en geles de agarosa de las digestiones enzimáticas con PstI y Apal de pGEM11E6, pGEM18E6 y pEGFP-N1 para realizar la construcción de los vectores de expresión pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6.** A) Los carriles 1 y 3 corresponden a los ORF'S 11E6 y 18E6 liberados del vector de donación pGEM-T Easy B) En los carriles 2 y 3 se observa el plásmido EGFP-N1 digerido para su ligación con los ORF's liberados.

En la figura 13 A) se muestran los insertos liberados de 11E6 y 18E6 y en B) podemos ver a pEGFP-N1 digerido ya que se observa como una sola banda correspondiente a un peso molecular aproximado de 4.7 kb.

Posteriormente se realizó la purificación de ambos fragmentos y del plásmido lineal pEGFP-N1 para su ligación. En seguida, se transformaron bacterias competentes con ambas ligaciones. Se verificó la presencia de los insertos 11E6 y 18E6 en el vector pEGFP-N1 mediante PCRpf con los oligonucleótidos CMV Fw, 11E6Rv y 18E6Rv.

En la figura 14 se muestran las amplificaciones de los insertos 11E6 y 18E6 con el peso molecular esperado: 550pb para 11E6 y 570pb para 18E6.



**Fig 14. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de los ORF's de 11E6 y 18E6 contenidos en los vectores pEGFP-11E6 y pEGFP18E6.** Se utilizaron los oligonucleótidos CMV Fw, 11E6 Rv y 18E6 Rv, en los carriles 2 y 3 se muestran las bandas correspondientes a los pesos moleculares esperados de los insertos (alrededor de 600 pb) con lo que se corrobora la construcción de los vectores de expresión que serían transfectados en células C33A negativas para VPH.

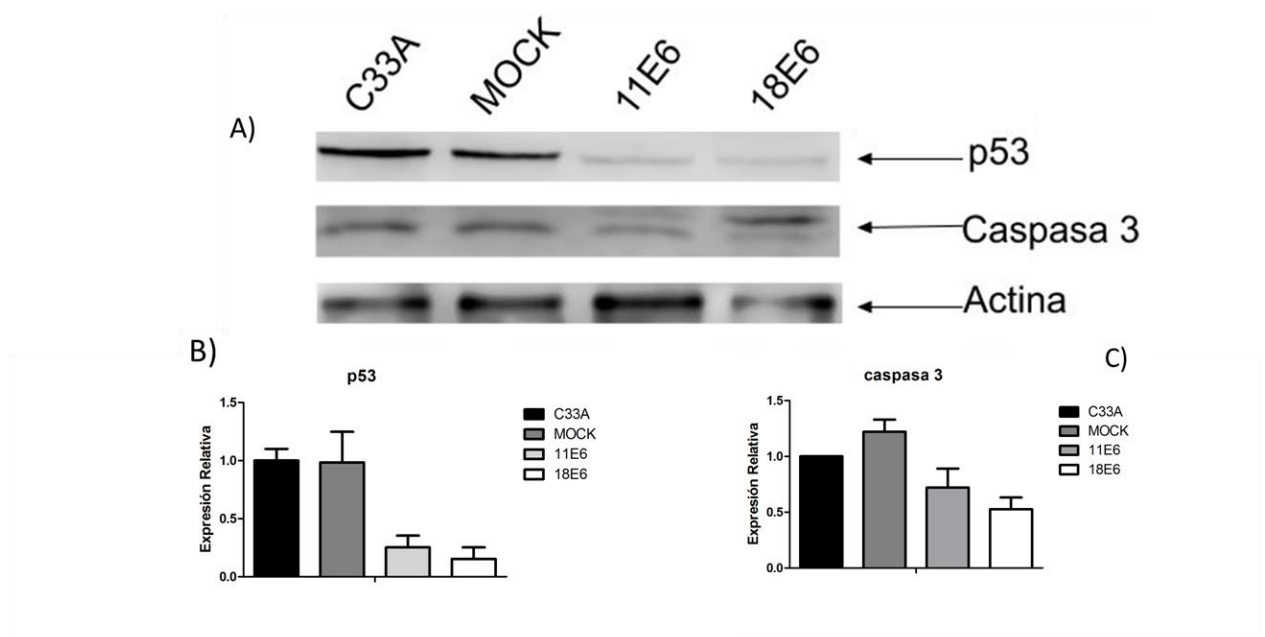
Una vez realizado el análisis, se hicieron maxi preparaciones de las construcciones pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6; con éstos plásmidos se transfectaron células C33A negativas para VPH y se evaluaron parámetros tales como expresión de proteínas asociadas a blancos moleculares de E6 y determinar diferencias entre la proliferación y migración celular.

#### **8.4 Actividad de p53 y caspasa 3 en células C33A transfectadas con pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6**

La proteína supresora de tumores p53 es un blanco directo de la degradación mediada por las oncoproteínas E6 de alto riesgo, por ello el determinar la actividad del supresor de tumores nos indica por lo tanto si los genes de interés se encuentran expresado en las células C33A transfectadas.

En la Figura 15 A) se muestran los resultados de Western Blot donde las células transfectadas con E6 de alto y bajo riesgo mostraron una disminución en la expresión de la proteína supresora de tumores p53, comparadas con los grupos control: C33A sin transfectar y MOCK (plásmido sin inserto).

La evaluación de la expresión de caspasa 3 que se encuentra involucrada en la respuesta apoptótica es necesaria para conocer la inactividad de la muerte celular programada en C33A transfectadas con los plásmidos de alto y bajo riesgo (Fig 15 A) donde la disminución en la expresión de caspasa 3 en células que expresaban el genotipo maligno de E6 se asocia a la inactivación de la apoptosis, favoreciendo así el fenotipo neoplásico. De acuerdo al análisis densitométrico (Fig15 B) aquellas células transfectadas con 18E6 mostraron una reducción de hasta el 75% de la expresión de p53 con respecto a 11E6 y los grupos control, es decir que ejercían un mayor potencial inhibitorio sobre el blanco celular asociado a actividad de E6 lo que nos demuestra que las oncoproteínas de alto y bajo riesgo se encuentran expresadas en éste sistema celular, esto se observó también en la densitometría correspondiente a caspasa 3 donde se muestra una disminución de hasta el 50% de esta proteína en células transfectadas con el plásmido 18E6 lo que nos indica que la respuesta apoptótica disminuye en C33A transfectadas.

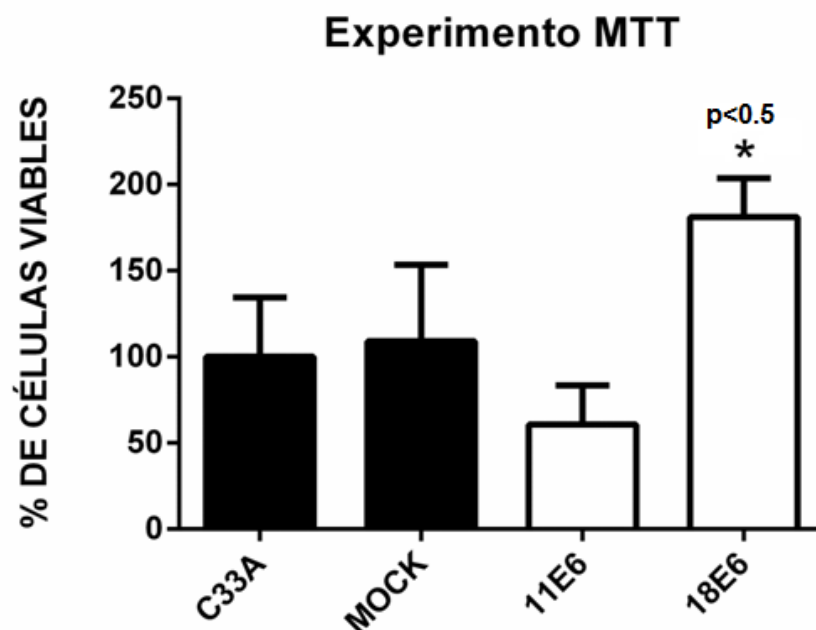


**Fig 15. Western Blot y densitometrías de p53 y caspasa 3.** A) Se observa la disminución de las proteínas p53 y caspasa 3 en las células que expresaban los ORF's de los genes de alto y bajo riesgo, comparadas con células transfectadas con EGFP-N1 (MOCK) y C33A sin transfectar. B) y C) Las densitometrías de la expresión relativa de p53 y caspasa 3 nos indican que los oncogenes virales 11E6 y 18E6 ejercen actividad inhibitoria sobre éstas proteínas implicadas en la supresión de tumores e inhibición de la apoptosis. n=3.

### 8.5 Determinación de la viabilidad celular en C33A transfectadas con los plásmidos pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6

Los ensayos de viabilidad nos muestran la acción que ejercen las oncoproteínas de alto y bajo riesgo sobre células C33A y demostrar que E6 de alto riesgo favorece la viabilidad celular.

El porcentaje de células viables (Fig 16) fue 1.7 mayor en las C33A transfectadas con 18E6 de alto riesgo comparado con los grupos control y de 3.4 veces mayor que el de las células transfectadas con 11E6 de bajo riesgo. Este resultado muestra que la expresión de la oncoproteína 18E6 de alto riesgo favorece la proliferación celular en células C33A, no así la de 11E6.



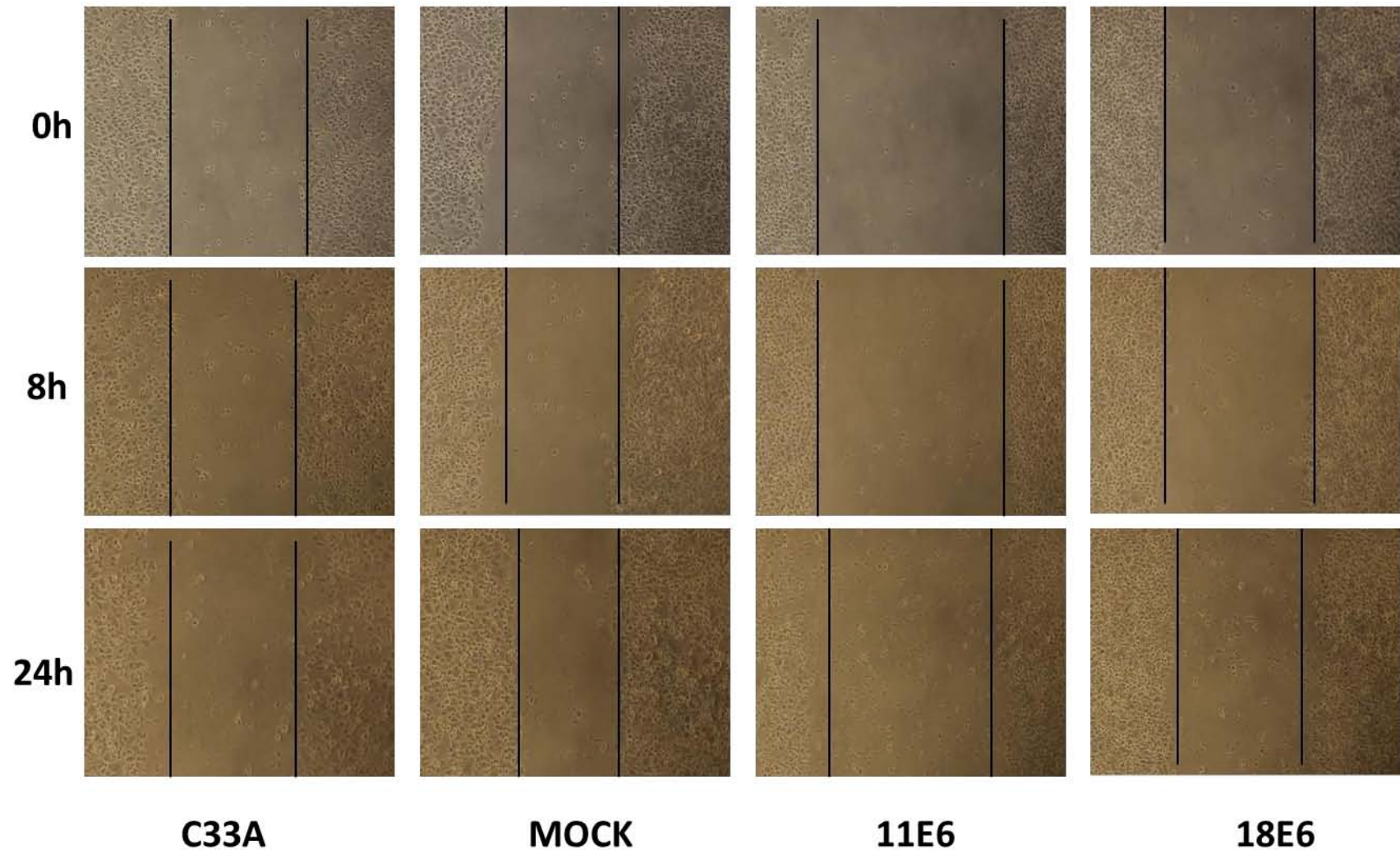
**Fig 16. Experimento de MTT de células C33A transfectadas.** Las células transfectadas con el plásmido que contenía el ORF de 18E6 mostraron un potencial proliferativo mayor con respecto al grupo con el gen de bajo riesgo 11E6 y los grupos control debido a que 18E6 es una oncoproteína viral de alto riesgo, los grupos C33A, MOCK y 11E6 no muestran diferencias significativas entre sí. Los datos fueron analizados estadísticamente con ANOVA  $p < 0.5$  y prueba de Tukey.  $N=3$ .

Estadísticamente los grupos C33A, MOCK y 11E6 no muestran diferencias significativas, sin embargo se observa una tendencia en la disminución del porcentaje de células en 11E6, por lo que es necesario realizar experimentos adicionales para explicar el fenómeno.

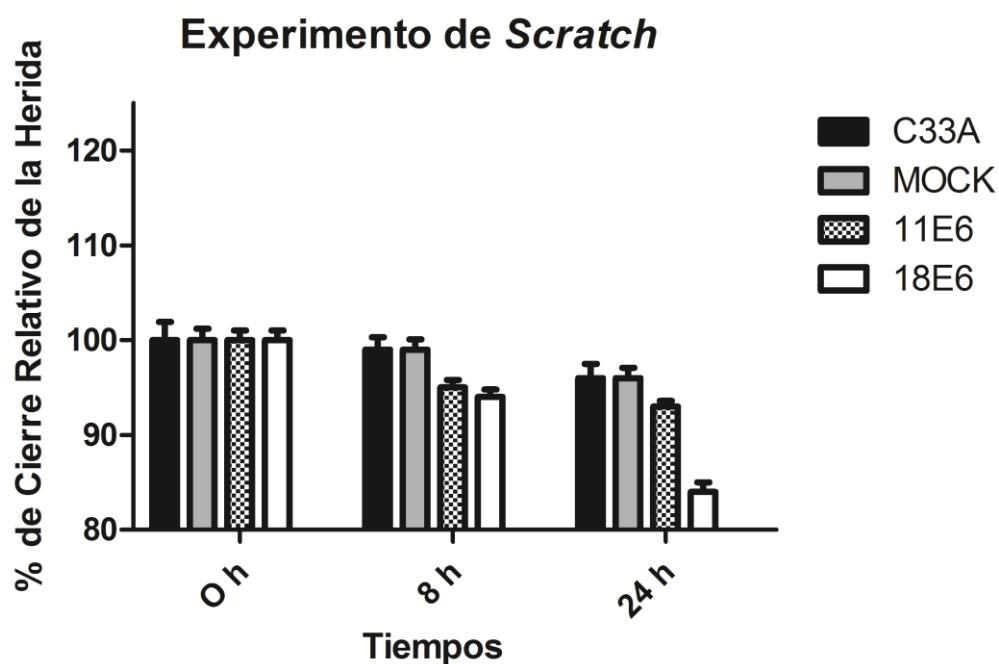
### **8.6 Determinación de la migración celular en C33A transfectadas con pEGFP-11E6 y pEGFP-18E6**

Por último se realizaron experimentos de “scratch” para conocer las diferencias en la migración de células transfectadas con E6 de alto y bajo riesgo en comparación con el grupo MOCK y las células sin transfectar. A partir de la realización de la herida sobre la monocapa celular, se monitoreo la migración celular a dos diferentes tiempos (8 y 24 horas) en todos los grupos (Fig 17).

La figura 18 demuestra que la oncoproteína 18E6 mantiene diferencias significativas a partir de las 24 horas posteriores a la “herida”, debido a que pudo observarse un aumento en la migración comparado con los grupos C33A, MOCK y 11E6.



**Fig 17. Análisis de migración de células C33A transfectadas con los plásmidos de alto y bajo riesgo.** Las células transfectadas con los plásmidos de alto y bajo riesgo mostraron un potencial proliferativo a partir de las 24 horas; comparadas con células C33A sin transfectar y transfectadas con pEGFP-N1, estos últimos grupos no presentaron diferencias significativas entre sí. Las imágenes se analizaron con Image J. n=3.



**Fig 18. Análisis del experimento de scratch evaluado en 2 diferentes tiempos 8 y 24 horas.** Se observa una disminución en el área de la herida correspondiente a las células transfectadas con la oncoproteína 18E6 de alto riesgo a partir de las 24 horas posteriores a la realización de la herida, en comparación con los grupos transfectados con MOCK, 11E6 y células C33A sin transfectar. n=3.

Estos experimentos muestran que el sistema utilizado para la expresión de las oncoproteínas E6 permite observar la viabilidad y migración celular, lo que nos da una herramienta para el estudio *in vitro* de las mismas. Es necesario realizar experimentos posteriores para evaluar la inhibición de señales de crecimiento, invasión y apoptosis que son los eventos que comprenden el desarrollo de neoplasias malignas, constituyendo de este modo un modelo de estudio para futuros proyectos.

## 9. DISCUSIÓN

El potencial proliferativo del VPH está dado por la acción de la oncoproteína E6 que se expresan conjuntamente con la oncoproteína E7 a través del ciclo viral, lo que favorece la migración e inmortalización de células queratinocíticas, estableciendo un fenotipo maligno (Doorbar et al., 2012). Dada la importancia del cáncer cervical, es necesario contar con modelos de estudio que nos ayuden a conocer las implicaciones de la expresión de E6 en etapas tempranas de la infección por VPH así como la identificación de marcadores moleculares que nos permitan comprender a profundidad las diferencias entre los VPH de alto y bajo riesgo oncogénico.

En este estudio se transfectaron células C33A negativas para VPH con plásmidos de expresión que contenían los ORF's de los genes VPH-18E6 y VPH-11E6, de alto y bajo riesgo respectivamente. Se observó una expresión diferencial de la proteína supresora de tumores p53 así como de caspasa 3 en células transfectadas con 11E6 y 18E6 en comparación con células que no habían sido transfectadas y células transfectadas con el vector pEGFP-N1.

Aunque ambas oncoproteínas virales son capaces de interactuar con el supresor de tumores p53 en su extremo C-terminal, sólo E6 de alto riesgo se une a la región núcleo de p53 facilitando el reconocimiento y degradación del supresor de tumores por la vía del proteasoma, silenciando de este modo el mecanismo reparador de errores lo que favorece el establecimiento de la infección viral y el desarrollo de adenocarcinomas (Li and Coffino 1996).

Adicionalmente E6 de bajo riesgo también inhibe la transactivación de p53, mediante un dominio de unión, conservado en los genes E6 de los distintos tipos de VPH, que interactúan con la histona acetiltransferasa p300 lo que impide la transcripción dependiente de la cromatina del supresor de tumores y por lo tanto inhibe su expresión (Thomas and Chiang, 2005).

Los datos de nuestro estudio son complementarios con éstos, ya que tanto las células transfectadas con E6 de alto como de bajo riesgo tuvieron una disminución de hasta el 75% en los niveles de la proteína supresora de tumores p53 en comparación con los grupos control: C33A (células sin transfectar) y MOCK (plásmido pEGFP-N1 que no contenía ningún ORF de E6) lo que nos demuestra la relación directa que existe entre la expresión de las oncoproteínas E6 del VPH y su principal blanco molecular p53 (Scheffner et al., 1993). Ésta relación fue documentada recientemente en estudios *in vitro* en células que expresaban constitutivamente el genotipo VPH16, donde el silenciamiento del gen E6 con siRNA's específicos restablece la expresión de la proteína supresora de tumores p53 (Li et al., 2013).

Otra consecuencia de la expresión de las oncoproteínas E6 es la inhibición de la apoptosis, como se mencionó anteriormente el establecimiento del fenotipo maligno inducido por el VPH aumenta la transformación celular y por lo tanto las células infectadas se vuelven resistentes al arresto celular y a la muerte celular programada (Li et al., 2005).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este proyecto se puede observar que la disminución de la expresión de caspasa 3 está relacionada con la expresión de las oncoproteínas E6 ya que el análisis de los datos obtenidos por Western

Blot y las densitometrías, nos demuestran que existen diferencias significativas entre las células transfectadas con 18E6 y 11E6 lo que nos indica la inhibición de la muerte celular programada en este sistema celular. Cabe resaltar que ésta inhibición puede ocurrir a nivel de cualquiera de las dos vías de apoptosis: a través de la vía intrínseca o extrínseca, debido a que caspasa 3 juega un papel importante como parte del apoptosoma, en el que confluyen ambas vías (Zimmermann et al., 2001)

En 2006 Vogt y colaboradores demostraron que el silenciamiento de 18E6 en células HeLa de cáncer y positivas para VPH18, restablecía la señalización de la vía intrínseca. El planteamiento de este grupo de trabajo es que en la infección por VPH, la retención de la proteína proapoptótica Bax en el citoplasma esta mediada por la expresión de 18E6, evitando la liberación de citocromo C y por lo tanto la formación del apoptosoma (Vogt et al., 2006).

Adicionalmente a estos resultados Duerksen y colaboradores señalaron en 1999 que E6 también se encuentra implicado en la inhibición de Factor de Necrosis Tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) que en condiciones normales se encuentra ligado a un receptor de membrana llamado TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand, por sus siglas en inglés) y como consecuencia se desencadenan señales de respuesta apoptótica que funcionan en la inhibición de la tumorigénesis y la activación de la vía extrínseca de la apoptosis, (Vannuccini et al., 2005).

Estos trabajos nos dan dos antecedentes para la inhibición de la expresión de caspasa 3 ya sea por la vía intrínseca o extrínseca de la apoptosis. Aunque en ambos mecanismos no es necesaria la expresión de p53, este supresor de

tumores también está implicado en el bloqueo de la respuesta apoptótica, debido a que por ser un factor de transcripción, funciona en la activación de genes proapoptóticos, tales como Bax y Bid (Golubovskaya and Cance, 2013).

En los resultados obtenidos mediante los experimentos de MTT podemos observar que aquellas células transfectadas con 18E6 de alto riesgo tenían un mayor número de células viables en comparación con los 3 grupos restantes: C33A, MOCK y 11E6. Esto puede deberse, además, a que 18E6 en general promueve la actividad de telomerasas por la acción de dominios de unión a PDZ conservados en los tipos de alto riesgo donde se ha observado que la pérdida de éstos dominios deriva en la disminución de la proliferación (Massimi et al., 2004).

La expresión de 18E6 por sí misma puede promover el potenciamiento de la proliferación celular a diferencia de una oncoproteína de bajo riesgo como 11E6 que al ser transfectada no ocasionó diferencias significativas en comparación con los grupos control. La oncoproteína 11E6 no cuenta con dominios de unión a PDZ, lo que explica estas diferencias, además existen reportes de que la expresión conjunta de la oncoproteína E7 de VPH de bajo riesgo es necesaria para favorecer el sostenimiento del fenotipo maligno (Johung et al., 2007).

Adicionalmente se observa también en la gráfica correspondiente al ensayo de MTT que a pesar de que no existen diferencias significativas entre 11E6, C33A y MOCK, la tendencia de los datos apuntan a que la células transfectadas con 11E6 tiene una menor capacidad proliferativa con respecto a los grupos control. Como se ha mencionado anteriormente en los tipos de bajo riesgo, es

necesaria la participación de E7 para establecer el fenotipo maligno, ya que esta oncoproteína inhibe la actividad de la proteína del retinoblastoma (Rb) y por lo tanto disminuye la expresión de genes asociados a la proliferación celular tales como Ciclina D1 o  $\beta$ -catenina (Moody and Laimins, 2010).

Recientemente se ha propuesto la participación de E6 sobre un factor de inicio de la transcripción eIF4E, que se encuentra sobreexpresado en líneas de cáncer cervical, este comportamiento es inducido por la presencia de la oncoproteína y favorece la transcripción de mRNA's de c-myc, ciclina D1 y TGF- $\beta$  que participan en la proliferación y metástasis (Wang et al., 2013).

Por último los análisis correspondientes a migración celular demostraron que la oncoproteína 18E6 de alto riesgo muestra mayor potencial de cierre de la herida realizada en monocapa celular a las 24 horas posteriores a la transfección. De acuerdo a estudios realizados en 2013 por Shiau y colaboradores la expresión de metaloproteinasas está relacionada con la sobreexpresión de interleucina 8 (IL-8) a través de infección de virus de HPV16. Li y colaboradores en el 2013 demostraron en células SiHa que la inhibición del potencial oncogénico de HPV16-E6 normalizaba los niveles de proteínas proapoptóticas como Bcl2, del Factor Vascular de Crecimiento Endotelial (por sus siglas en inglés, VEGF) y la restauración de la maquinaria apoptótica. Estos datos son consistentes con nuestros resultados, debido a que sólo en células transfectadas con la oncoproteína E6 de alto riesgo se observó un aumento en la migración y proliferación

Estos experimentos constituyen en conjunto el establecimiento de un modelo de estudio *in vitro* para determinar el papel de las oncoproteínas virales en el

desarrollo de neoplasias, que nos ayuden a entender los mecanismos moleculares presentes en el desarrollo del cáncer.

Por otro lado es importante la generación de protocolos que a futuro funcionen en nuestro laboratorio para el conocimiento de marcadores moleculares potenciales y para el desarrollo de agentes terapéuticos dirigidos a esta enfermedad que es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo.

## **10. CONCLUSIONES**

- 1) La expresión de la oncoproteína 18E6, procedente de HPV de alto riesgo favorece la migración así como el aumento en la viabilidad de células C33A en comparación con células transfectadas con el gen de bajo riesgo 11E6.
- 2) El nivel de expresión de la proteína supresora de tumores p53 disminuye en células que expresan el gen E6 de alto y bajo riesgo debido a que p53 es un blanco molecular de ambas oncoproteínas. Adicionalmente la expresión de caspasa 3 se ve inhibida por las oncoproteínas 11E6 y 18E6 lo que favorece la viabilidad celular.
- 3) La generación del vector de expresión nos da una herramienta de estudio *in vitro* para el análisis *in vivo* de marcadores moleculares asociados al desarrollo de neoplasias.

## **11. PERSPECTIVAS**

Realizar la generación de expresión un modelo de cáncer cervical que exprese establemente las oncoproteínas E6 y E7 de alto y bajo riesgo, individualmente y en conjunto, con el fin de conocer la acción conjunta de éstas oncoproteínas virales en la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, importante en la transcripción de oncogenes que favorecen el establecimiento del fenotipo maligno. Estudios recientes demuestran que el silenciamiento del gen supresor de tumores p53 conlleva a la inhibición de la transcripción de mir-34, un microRNA que participa en la degradación de LRP6, APC, WNT1 y LEF1; genes importantes para la supresión de la actividad transcripcional del complejo  $\beta$ -catenina-TCF/LEF (Kim et al., 2011).

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Baseman, J.G., and Koutsky, L.A. (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 32 *Suppl 1*, S16–24.
- 2) Bradford M.M. 1976 A rapid sensitive method for the quantitation of micro quantities of protein. *Anal Biochem* 72:248
- 3) Brehm, A., Nielsen, S.J., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1999a). The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* 18, 2449–2458.
- 4) Burk R. D. Kelly P. Feldman J. (1996). Declining presence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex. Transm. Dis.* 23: 333-341.
- 5) Chow, L.T., Broker, T.R., and Steinberg, B.M. (2010). The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 118, 422–449.
- 6) Cohen S.N., Chang A.C.Y., and Hsu L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69:2110-2114
- 7) Davy, C.E., Jackson, D.J., Wang, Q., Raj, K., Masterson, P.J., Fenner, N.F., Southern, S., Cuthill, S., Millar, J.B.A., and Doorbar, J. (2002).

- Identification of a G2 Arrest Domain in the E1/E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16. *J. Virol.* 76, 9806–9818.
- 8) Day, P.M., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2003). Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 307, 1–11.
  - 9) de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. (2013). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology*. 13: 607-615
  - 10) Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin. Sci.* 110, 525.
  - 11) Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I.G., Stoler, M., Broker, T.R., and Stanley, M.A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5, F55–70.
  - 12) Doorbar, J. (2013). Latent papillomavirus infections and their regulation. *Current Opinion in Virology*, 3(4), 416–421  
doi:10.1016/j.coviro.2013.06.003.
  - 13) Duerksen-Hughes, P. J., Yang, J., & Schwartz, S. B. (1999). HPV 16 E6 Blocks TNF-Mediated Apoptosis in Mouse Fibroblast LM Cells. *Virology*, 264(1), 55–65. doi:[10.1006/viro.1999.9977](https://doi.org/10.1006/viro.1999.9977)
  - 14) Dugaiczyk, A., Boyer, H.W., and Goodman, H.M. 1975. Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.* 96:174-184.
  - 15) Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12, 2245–2262.

- 16)Filippova, M., Song, H., Connolly, J.L., Dermody, T.S., and Duerksen-Hughes, P.J. (2002). The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 21730–21739.
- 17)Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F.GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
- 18)Gillitzer, E., Chen, G., and Stenlund, A. (2000). Separate domains in E1 and E2 proteins serve architectural and productive roles for cooperative DNA binding. *EMBO J.* 19, 3069–3079.
- 19)Golubovskaya, V.M., and Cance, W.G. (2013). Targeting the p53 Pathway. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 22, 747–764.
- 20)Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- 21)Howie, H.L., Katzenellenbogen, R.A., and Galloway, D.A. (2009). Papillomavirus E6 proteins. *Virology* 384, 324–334.
- 22)Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L., and Storey, A. (2000). Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev.* 14, 3065–3073.

- 23)Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J. Ward E. y Forman D. (2011).  
Global CancerStatistics. CancerJournal of Clinicians.
- 24)Johung, K., Goodwin, E. C., & DiMaio, D. (2007). Human Papillomavirus  
E7 Repression in Cervical Carcinoma Cells Initiates a Transcriptional  
Cascade Driven by the Retinoblastoma Family, Resulting in Senescence.  
*Journal of Virology*, 81(5), 2102–2116. doi:[10.1128/JVI.02348-06](https://doi.org/10.1128/JVI.02348-06)
- 25)Kaufmann, A.M., Stern, P.L., Rankin, E.M., Sommer, H., Nuessler, V.,  
Schneider, A., Adams, M., Onon, T.S., Bauknecht, T., Wagner, U., et al.  
(2002). Safety and Immunogenicity of TA-HPV, a Recombinant Vaccinia  
Virus Expressing Modified Human Papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18  
E6 and E7 Genes, in Women with Progressive Cervical Cancer. Clin.  
Cancer Res. 8, 3676–3685.
- 26)Kivi, N., Greco, D., Auvinen, P., and Auvinen, E. (2008). Genes involved  
in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to  
HPV 16 E5 protein expression. Oncogene 27, 2532–2541.
- 27)Kim, N. H., Kim, H. S., Kim, N.-G., Lee, I., Choi, H.-S., Li, X.-Y., ...  
Weiss, S. J. (2011). p53 and miRNA-34 are Suppressors of Canonical  
Wnt Signaling. *Science signaling*, 4(197), ra71.  
doi:[10.1126/scisignal.2001744](https://doi.org/10.1126/scisignal.2001744)
- 28)Koutsky, L.A., Ault, K.A., Wheeler, C.M., Brown, D.R., Barr, E., Alvarez,  
F.B., Chiacchierini, L.M., and Jansen, K.U. (2002). A Controlled Trial of a  
Human Papillomavirus Type 16 Vaccine. N. Engl. J. Med. 347, 1645–  
1651.

- 29)Liang, Ann; Park; Jun-Lin Guan. 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nature Publishing. Vol 2 No2 P 329-333
- 30)Li, T.-T., Zhao, L.-N., Liu, Z.-G., Han, Y., & Fan, D.-M. (2005). Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 11(7), 931-937.
- 31)Li, X., and Coffino, P. (1996). High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J. Virol.* 70, 4509–4516.
- 32)Li, X., Li, Y., Hu, J., Wang, B., Zhao, L., Ji, K., ... Zhang, L. (2013). Plasmid-based E6-specific siRNA and co-expression of wild-type p53 suppresses the growth of cervical cancer in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 335(1), 242–250. doi:[10.1016/j.canlet.2013.02.034](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.034)
- 33)Lizano-Soberón, M., Carrillo-García, A., and Contreras-Paredes, A. (2009). Infección por virus del Papiloma Humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Lizano Al Cancerol.* 4, 205–216.
- 34)Mantovani, F., and Banks, L. (1999). Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical tumour derived cell lines. *Oncogene* 18, 3309–3315.
- 35)Manzo\_Merino. Thomas. Fuentes-Gonzales AM: Lizano M. Banks L. (2013) HPV E6 oncoprotein as a potential therapeutic target in HPV related cancer. *Expert Opin. Ther. Targets.* 17:11.

- 36)Massimi, P., Gammoh, N., Thomas, M., & Banks, L. (2004). HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*, 23(49), 8033–8039. doi:[10.1038/sj.onc.1207977](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207977)
- 37)McMillan, N.A.J., Payne, E., Frazer, I.H., and Evander, M. (1999). Expression of the  $\alpha 6$  Integrin Confers Papillomavirus Binding upon Receptor-Negative B-Cells. *Virology* 261, 271–279.
- 38)Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10(8), 550–560. doi:[10.1038/nrc2886](https://doi.org/10.1038/nrc2886)
- 39)Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K.M., Hayakawa, H., Nguyen, C.L., Owens, M., Grace, M., and Huh, K. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.* 78, 11451–11460.
- 40)Nguyen, H.P., Ramírez-Fort, M.K., and Rady, P.L. (2014). The biology of human papillomaviruses. *Curr. Probl. Dermatol.* 45, 19–32.
- 41)O'Connor, M., Chan, S.-Y., and Bernard, H.-U. (1995). Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. *Hum. Papillomaviruses* 21–40.
- 42)Polager, S., and Ginsberg, D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. *Nat. Rev. Cancer* 9, 738–748.

- 43) Saavedra, A. L., & Soberón, M. L. (2006). Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano. Retrieved from [http://ulaccam.org/upfiles/nota\\_archivo\\_\\_1383003956.pdf](http://ulaccam.org/upfiles/nota_archivo__1383003956.pdf)
- 44) Sapp, M., and Bienkowska-Haba, M. (2009). Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J.* 276, 7206–7216.
- 45) Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., and Howley, P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495–505.
- 46) Shiau, M.-Y., Fan, L.-C., Yang, S.-C., Tsao, C.-H., Lee, H., Cheng, Y.-W., ... Chang, Y.-H. (2013). Human papillomavirus up-regulates MMP-2 and MMP-9 expression and activity by inducing interleukin-8 in lung adenocarcinomas. *PloS One*, 8(1), e54423. doi:[10.1371/journal.pone.0054423](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054423).
- 47) Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., Harwood, C., Gardiol, D., Mantovani, F., Banks, L. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, 393(6682), 229-234. doi:[10.1038/30400](https://doi.org/10.1038/30400)
- 48) Thomas, M., Narayan, N., Pim, D., Tomaić, V., Massimi, P., Nagasaka, K., Banks, L. (2008). Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene*, 27(55), 7018–7030. doi:[10.1038/onc.2008.351](https://doi.org/10.1038/onc.2008.351)
- 49) Thomas, M.C., and Chiang, C.-M. (2005). E6 Oncoprotein Represses p53-Dependent Gene Activation via Inhibition of Protein Acetylation Independently of Inducing p53 Degradation. *Mol. Cell* 17, 251–264.

- 50)Vande Pol, S.B., and Klingelhutz, A.J. (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 445, 115–137.
- 51)Vannucchi, S., Chiantore, M. V., Fiorucci, G., Percario, Z. A., Leone, S., Affabris, E., & Romeo, G. (2005). TRAIL is a key target in S-phase slowing-dependent apoptosis induced by interferon- $\beta$  in cervical carcinoma cells. *Oncogene*, 24(15), 2536–2546. doi:[10.1038/sj.onc.1208403](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208403)
- 52)Vogt, M., Butz, K., Dymalla, S., Semzow, J., & Hoppe-Seyler, F. (2006). Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. *Oncogene*, 25(29), 4009–4015.
- 53)Wang, S., Pang, T., Gao, M., Kang, H., Ding, W., Sun, X., ... Hu, X. (2013). HPV E6 induces eIF4E transcription to promote the proliferation and migration of cervical cancer. *FEBS Letters*, 587(6), 690–697. doi:[10.1016/j.febslet.2013.01.042](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.042).
- 54)Zimmermann, K. C., Bonzon, C., & Green, D. R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*, 92(1), 57-70.
- 55)zur Hausen H. (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol*; 78:1–30.
- 56)Zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2, 342–350.
- 57)Zur Hausen, H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology* 384, 260–265.

**Transfección**

Caja de 6 pozos: 400 000 células por pozo

**1 Preparar dos mix**

| Mix 1         | Volumen por pozo (µL) |
|---------------|-----------------------|
| Opti-MEM      | 118                   |
| Lipofectamina | 5                     |
| Plus reagent  | 2                     |
| TOTAL         | 125                   |

Incubar 5 min temp ambiente

| Mix2                   | Volumen por pozo (µL) |
|------------------------|-----------------------|
| Opti-MEM               | 115                   |
| 2.5 µg DNA @ 250 ng/µL | 10                    |
| TOTAL                  | 125                   |

**2 Preparar transfection mix por pozo**

|       |     |
|-------|-----|
| Mix 1 | 125 |
| Mix 2 | 125 |
| TOTAL | 250 |

3 Incubar Transfection mix 10-15 min a temperatura ambiente

4 Agregar Transfection mix a las células

Caja de 96 pozos: 10 000 células por pozo

**1 Preparar dos mix**

| Mix 1         | Volumen por pozo (µL) |
|---------------|-----------------------|
| Opti-MEM      | 24.4                  |
| Lipofectamina | 0.5                   |
| Plus reagent  | 0.1                   |
| TOTAL         | 25                    |

Incubar 5 min temp ambiente

| Mix2                   | Volumen por pozo (µL) |
|------------------------|-----------------------|
| Opti-MEM               | 24                    |
| 100 ng DNA @ 100 ng/µL | 1                     |
| TOTAL                  | 25                    |

**2 Preparar transfection mix por pozo**

|       |    |
|-------|----|
| Mix 1 | 25 |
| Mix 2 | 25 |
|       | 50 |

3 Incubar Transfection mix 10-15 min a temperatura ambiente

4 Agregar Transfection mix a las células