



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de las proteínas E6 y E6*I de VPH-18 en la modulación de proteínas blanco de la vía de Wnt

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Leslie Olmedo Nieva

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Claudia González Espinoza
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM

Dra. Adriana Contreras Paredes
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM

MÉXICO, D. F. Noviembre, 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.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 6 |
| 1. EL CÁNCER CERVICOUTERINO..... | 6 |
| 1.1 <i>Epidemiología</i> | 7 |
| 1.2 <i>Factores de riesgo y vacunas</i> | 9 |
| 1.3 <i>Historia natural de la enfermedad</i> | 11 |
| 2. EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO..... | 13 |
| 2.1 <i>Clasificación del VPH</i> | 13 |
| 2.2 <i>Organización del VPH-18</i> | 14 |
| 2.3 <i>Ciclo de vida</i> | 15 |
| 3. LA ONCOPROTEÍNA E6..... | 19 |
| 3.1 <i>Funciones de la oncoproteína E6</i> | 19 |
| 3.2 <i>Procesamiento alternativo de E6</i> | 20 |
| 4. LA PROTEÍNA E6*1..... | 21 |
| 4.1 <i>Estructura y plegamiento de la proteína E6*1</i> | 22 |
| 4.2 <i>Funciones de la proteína E6*1</i> | 23 |
| 5. LA VÍA DE WNT: LIGANDOS Y RECEPTORES | 25 |
| 5.1 <i>Vía canónica de Wnt</i> | 26 |
| II. ANTECEDENTES | 28 |
| 1. LA VÍA DE WNT EN CÁNCER CERVICOUTERINO Y SU RELACIÓN CON E6 Y E6*1 | 28 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 29 |
| IV. HIPÓTESIS | 30 |
| V. OBJETIVOS | 31 |
| 1. OBJETIVO GENERAL | 31 |
| 1.1 <i>Objetivos particulares</i> | 31 |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| 1. MATERIAL BIOLÓGICO..... | 32 |
| 2. CULTIVO CELULAR | 32 |
| 3. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS..... | 32 |
| 4. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO | 33 |
| 5. EXTRACCIÓN DE RNA | 33 |
| 6. RETROTRANSCRIPCIÓN..... | 34 |
| 7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA | 34 |
| 8. EXTRACCIÓN DE DNA DE GEL DE AGAROSA | 34 |
| 9. CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS E6WT, E6SM Y E6*1 DE VPH-18 | 35 |
| 10. EXTRACCIÓN DNA PLASMÍDICO..... | 37 |
| 11. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 37 |
| 12. TRANSFECCIÓN..... | 37 |
| 13. WESTERN BLOT | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 14. GENERACIÓN DE CÉLULAS HEK293 CON EXPRESIÓN ESTABLE DE E6WT, E6SM Y E6*I | 39 |
| 15. INMUNOFLUORESCENCIA..... | 40 |
| VII. RESULTADOS | 41 |
| 1. CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS E6WT, E6SM Y E6*I DE VPH-18 EN EL VECTOR P3XFLAG-CMV-10 | 41 |
| 2. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS E6 Y E6*I EN CÉLULAS HEK293 | 46 |
| 3. DEGRADACIÓN DE P53 POR LA PROTEÍNA E6..... | 48 |
| 4. EFECTO DE LAS PROTEÍNAS E6 Y E6*I SOBRE BLANCOS DE LA VÍA DE WNT..... | 48 |
| 5. LOCALIZACIÓN DE B-CATENINA EN PRESENCIA DE E6WT, E6SM Y E6*I..... | 50 |
| VIII. DISCUSIÓN | 52 |
| IX. CONCLUSIONES | 58 |
| X. PERSPECTIVAS | 59 |
| XI. BIBLIOGRAFÍA..... | 60 |
| 1. ARTÍCULOS CONSULTADOS..... | 60 |
| 2. LIBROS CONSULTADOS | 75 |
| 3. PÁGINAS ELECTRÓNICAS CONSULTADAS..... | 75 |
| XII. ANEXOS | 76 |
| 1. AMORTIGUADORES Y MEDIOS DE CULTIVO PREPARADOS | 76 |
| 2. PROGRAMAS Y REACCIONES PARA RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR..... | 79 |
| 3. REACCIONES DE RESTRICCIÓN Y LIGACIÓN | 81 |
| 4. PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA..... | 82 |
| 5. ANTICUERPOS UTILIZADOS | 82 |
| 6. PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DEL MENSAJERO DE E6 DE VPH-18..... | 83 |
| 7. SITIO DE CLONACIÓN MÚLTIPLE DEL PLÁSMIDO P3XFLAG-CMV 10 | 83 |
| 8. TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA 2000 | 84 |
| 9. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS E6WT, E6SM Y E6*I CLONADOS EN P3XFLAG-CMV 10 | 85 |

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Marcela Lizano S oberón, que siempre estuvo al tanto del trabajo realizado. Agradezco su infinita paciencia y carácter para tomar decisiones importantes que enriquecieron el estudio en muchas formas. Agradezco también su confianza y bondad característica, que generaron una buena relación laboral y personal, punto importante en cualquier desarrollo intelectual.

A la Dra. Claudia González Espinoza, miembro de mi comité tutorial, que nos abrió en todo momento las puertas de su laboratorio, ofreciendo cada recurso que estaba en sus manos para asegurar el correcto desarrollo del proyecto. Nos brindó siempre ingeniosas opciones que llevaron a resultados obtenidos en el presente trabajo.

A la Dra. Adriana Contreras Paredes, miembro de mi comité tutorial, que me brindó su confianza y tiempo para revisar el trabajo cada vez que era necesario, compartiendo consejos y puntos de vista siempre acertados.

Al Candidato a Doctor Jesús Omar Muñoz Bello, que me enseñó infinitas cosas esenciales en el trabajo elaborado y que compartió conmigo análisis que siempre llevaron a discusiones fructíferas.

A todos los miembros de mi laboratorio, que brindaron en muchas ocasiones soluciones a distintos problemas a los que nos enfrentamos; sobre todo a Mariana Fuentes, Alfredo Amador, Elenae V. Ulloa y Sandy Velásquez, que hicieron amenos muchos momentos.

Al M. en C. Alfredo Ibarra Sánchez, que con gran entusiasmo, siempre apoyó el trabajo del equipo, brindando herramientas y consejos trascendentales, además de una amistad invaluable e incondicional.

A todo el grupo de trabajo de la Dra. González, que nos recibieron muy amablemente en su laboratorio, tratándonos como si fuéramos parte de su laboratorio. Por esto, agradezco a Marbella Chávez, Fabiola Guzmán, Jorge Iván, Karla Ramírez y a Don Armando.

A los miembros de mi comité de examen de titulación: Dra. Martha Robles, Dra. Elizabeth Langley, Dr. Luis Alonso Herrera, Dr. Jaime Berumen y Dr. Juan Luis Chávez, por tomar parte de su valioso tiempo para revisar este trabajo, y por sus comentarios que ayudaron a mejorarlo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que nos brindó el apoyo económico para llevar a cabo este trabajo PY 166808.

Al Programa de Apoyo para Estudios del Posgrado (PAEP), que me facilitó ayuda económica para la asistencia a dos congresos: uno nacional y otro internacional.

ABREVIATURAS

1. **β -TrCP.** Beta Transducina
2. **Af.** Africana
3. **Akt.** Ak Timoma (PKB-Proteína Cinasa B)
4. **AsAI.** Asiática Amerindia
5. **ATP.** Adenosil trifosfato
6. **ATCC.** American Type Culture Collection
7. **APC.** Adenomatous polyposis coli
8. **BAP.** Fosfatasa Alcalina Bacteriana
9. **Brg1.** Proteína Homóloga a Brahma 1
10. **BSA.** Albúmina de Suero Bovino
11. **CaCU.** Cáncer Cervicouterino
12. **CaMKII.** Cinasa D dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina II
13. **CBP.** Proteína de unión a CREB
14. **cdNA.** DNA complementario
15. **CK.** Proteína Cinasa
16. **CMV.** Citomegalovirus
17. **DED.** Dominio Efecto de Muerte
18. **Dlg.** Discs-large
19. **DNA.** Ácido desoxiribonucleico
20. **DO.** Densidad óptica
21. **Dvl.** Dishevelled
22. **E.** Europea
23. **E6AP.** Proteína Asociada a E6
24. **E6-AR.** E6 de VPH de alto riesgo
25. **E6SM.** E6 mutante en splicing
26. **E6WT.** E6 tipo natural
27. **EMEM.** Medio Mínimo Esencial de Eagle
28. **Fzd.** Frizzled
29. **GFR.** Receptor de factores de crecimiento
30. **GSK3 β .** Glicógeno Sintasa Cinasa 3 β
31. **HEK293.** Células de Riñón Embrionario 293
32. **HeLa.** Henrietta Lacks
33. **HS.** Heparán Sulfato
34. **HSIL.** Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado
35. **hTERT.** Telomerasa Reverse Transcriptasa Humana
36. **ICC.** Cáncer Cervical Invasivo
37. **IF.** Inmunofluorescencia
38. **IQGAP1.** Proteína de Activación similar a GTPasa Ras 1
39. **LB.** Luria-Broth
40. **LCR.** Región Larga de Control
41. **LEF.** Factor de Unión al Potenciador Linfocitario
42. **LRP.** Proteína Relacionada al Receptor de Lipoproteína
43. **LSIL.** Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado
44. **MAGI.** Guanilato cinasa asociada a membrana
45. **MAGUK.** Guanilato Cinasa Asociada a Membrana
46. **MCF7.** Fundación de Cáncer de Michigan 7

47. **MCS.** Sitio de Clonación Múltiple
48. **RNAm.** RNA mensajero
49. **mTOR.** Blanco de Rapamicina de los Mamíferos
50. **NCBI.** Centro Nacional para la Información Biotecnológica
51. **NFX1-91.** Factor de Transcripción Nuclear de Unión a X-box 1-91
52. **NIC.** Neoplasia Intraepitelial Cervical
53. **OM.** Medio OptiMem
54. **ORF.** Marco abierto de Lectura
55. **PBS.** Buffer de Fosfato Salino
56. **PBS-T.** Buffer de Fosfato Salino con Tween
57. **PCP.** Polaridad Celular Planar
58. **PCR.** Reacción en Cadena de la Polimerasa
59. **PDZ.** Región Homóloga a Discs-large
60. **pERK.** Kinasa del Retículo Endoplásmico tipo PKR
61. **PKA.** Proteína cinasa A
62. **PKC.** Proteína cinasa C
63. **Rb.** Proteína del Retinoblastoma
64. **RIPA.** Buffer para ensayo de radioinmunoprecipitación
65. **RNA.** Ácido Ribonucleico
66. **ROS.** Especies Reactivas de Oxígeno
67. **RT-PCR.** Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa
68. **SBF.** Suero Bovino Fetal
69. **SNX17.** Sorting Nexin 17
70. **TAZ.** Co-activador Transcripcional con motivo de unión PDZ
71. **TBE.** Tris/Borato/EDTA
72. **TBS.** Tris-tamponado salino
73. **TBS-T.** Tris-tamponado salino con Tween
74. **TCF.** Factor de Células T
75. **Tm.** Temperatura de Fusión
76. **VLP.** Partículas Tipo Virus
77. **VP.** Virus del Papiloma
78. **VPH.** Virus del Papiloma Humano
79. **VPH-AR.** Virus del papiloma Humano de alto riesgo
80. **VPH-BR.** Virus del papiloma Humano de bajo riesgo
81. **WB.** Western Blot
82. **Wnt.** Wingless-Int1
83. **YAP.** Proteína Asociada a Yes

I. INTRODUCCIÓN

1. El cáncer cervicouterino

El cérvix se localiza en la parte superior del conducto vaginal y debajo del útero, conectando ambas cavidades (**Fig. 1**). Puede dividirse en dos partes, el endocérvix, que se compone de epitelio columnar y está más próximo al útero, y el ectocérvix o exocérvix, que se acerca más al conducto vaginal y posee células escamosas. La unión entre los epitelios de ambas partes es llamada zona de transformación. Esta zona se encuentra en continuo cambio metafásico sobre todo en la pubertad y durante el primer embarazo, lo que ocurre después de la menopausia (**Eifel, et al., 2008**). El cáncer cervicouterino se desarrolla a partir de esta zona de unión entre ambos epitelios.

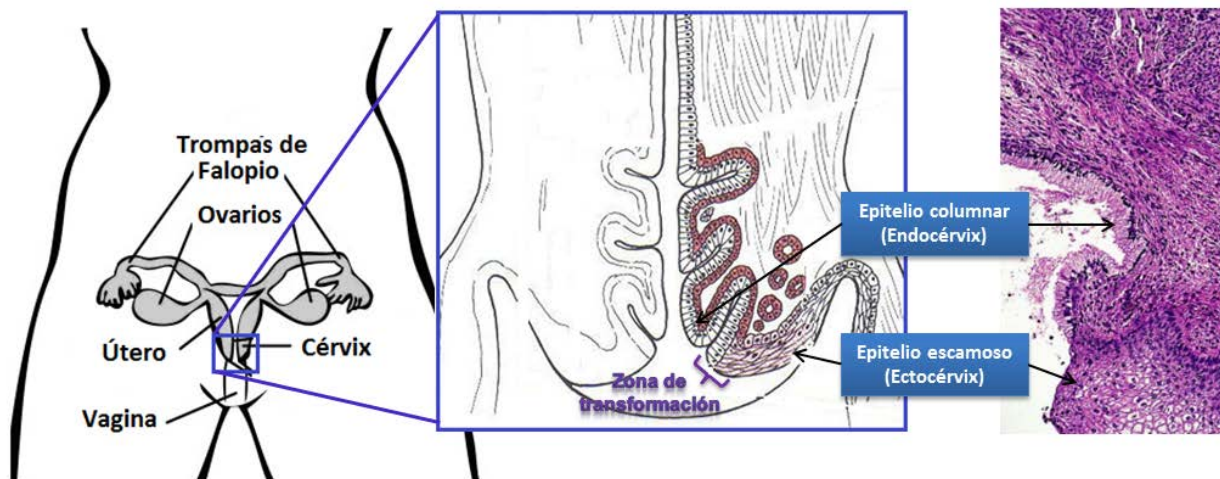


Figura 1. Localización y organización del cérvix. En la imagen se puede observar el lugar donde se ubica el cérvix en el aparato reproductor femenino, además de las partes que lo componen y los tipos de epitelio encontrados. Imagen modificada de http://www.womenshealthsection.com/content/art_images/gyno020d_1.jpg y <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003094-pdf.pdf>.

Los cánceres cervicales se han clasificado en dos principales tipos: carcinoma de células escamosas (entre el 80 y 90%), que se desarrolla en el epitelio escamoso del ectocérvix y adenocarcinoma, que se genera a partir de células glandulares productoras de mucosidad en el endocérvix. También se han observado cánceres cervicales poco comunes que se desarrollan en ambas células, a los que se llama adenoesquamosos (**American Cancer Society, 2014**). En México, de 135 mujeres atendidas en el INCan con cáncer cervical

invasivo, 78.5 % correspondían a carcinomas cervicales escamosos, 6.6 % a adenocarcinomas, 9.6 % a carcinoma adenoescamoso y 5.1 % a carcinomas no identificados (Lizano, *et al.*, 2006).

La transformación de las células normales en cancerosas no se da de manera súbita, se observa un desarrollo gradual a partir de cambios celulares pre-cancerosos. Más adelante se mencionan sistemas de clasificación utilizados para agrupar etapas en el desarrollo de la enfermedad.

Un punto a destacar, es que el cáncer cervical puede ser metastásico. Se ha encontrado metástasis a partir de cáncer cervical en muchas partes del cuerpo, por ejemplo en: cerebro (Erdis, 2014; Park, *et al.*, 2010; Amita, *et al.*, 2005), pulmón (Fodero, *et al.*, 2013; Lee, *et al.*, 2011), mama (Sabatier, *et al.*, 2012), piel (Ozdemir y Tuncbilek, 2009), corazón (Byun, *et al.*, 2013) hueso (Malek, *et al.*, 2012; Puranik, *et al.*, 2013; Thanappapasr, *et al.*, 2010) hígado (Nair y Pai, 2005; Yoshimura, *et al.*, 1999).

1.1 Epidemiología

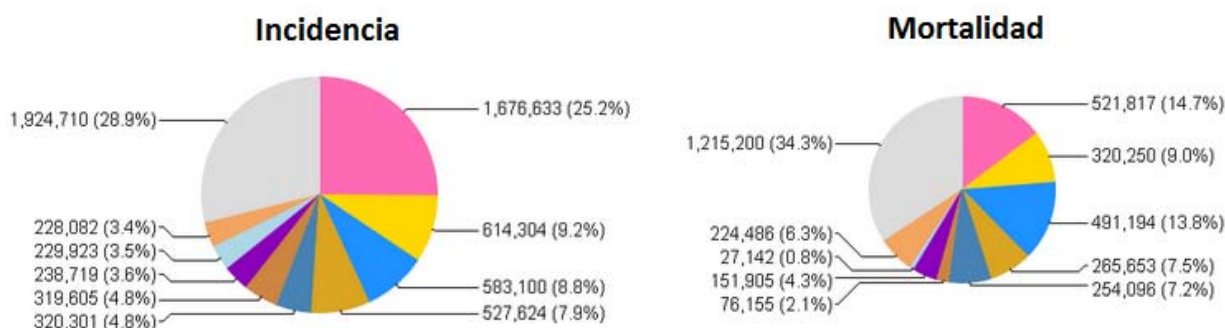
En el mundo, el cáncer cervicouterino o CaCU, ocupa el cuarto lugar en incidencia y en mortalidad por cáncer en mujeres (Fig. 2). En México, causa 4 769 muertes por año y es la segunda causa de decesos por neoplasias femeninas (GLOBOCAN, 2012).

En 2010 Bruni y colaboradores, publicaron un meta análisis que combina 194 estudios de 59 países alrededor del mundo (Bruni, *et al.*, 2010), donde observaron la infección por VPH en pacientes con citología normal de cérvix. En este estudio encontraron que el 11.7 % de las mujeres poseen una infección con algún tipo viral, siendo África y Latinoamérica las regiones con mayor proporción. Los tipos virales 16 y 18 fueron los más frecuentemente encontrados en todo el mundo, siendo el tipo 16 el más común y después el 18, siguiendo el 52, 31, 58, 39, 56 y 51 dependiendo del país.

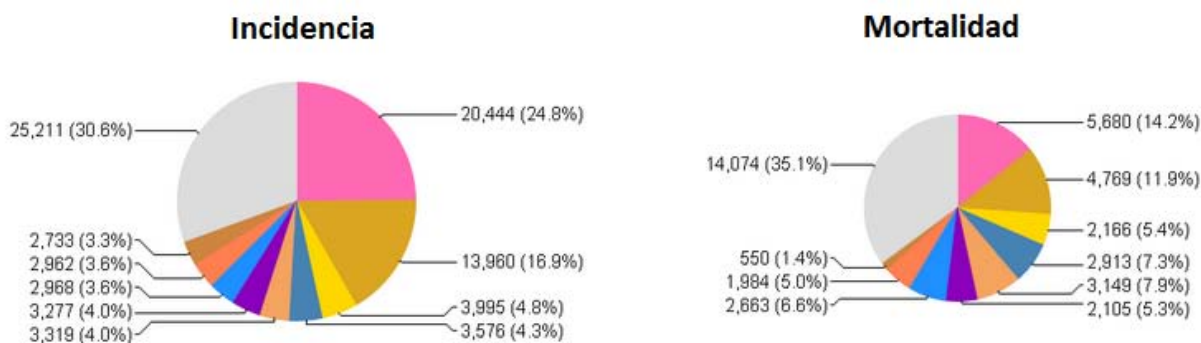
Otro meta análisis de este tipo fue desarrollado en 2013. En él se relacionan casos de cáncer cervical invasivo (ICC) con sus controles de citología normal alrededor del mundo. Los tipos virales 16 y 18 fueron localizados en más del 70 % de los casos de ICC. Haciendo un estudio

estadístico de “odds ratio” donde se tomó como grupo de comparación más oncogénico a los casos con VPH-16, se evaluó el potencial oncogénico de los otros tipos virales encontrados en los controles y casos. Finalmente se concluye que los tipos 18, 45, 69, 58, 31, 33, 34, 67, 39, 59, 73 y 52 siguen al tipo 16 en oncogenicidad de manera descendente (Bernard, et al., 2013).

Mundo



México



■ Mama ■ Colorectal ■ Pulmón ■ Cervicouterino ■ Estómago ■ Útero ■ Ovario ■ Tiroides ■ Hígado ■ Otros

Figura 2. Incidencia y mortalidad causada por distintos cánceres en México y el mundo. En los gráficos puede observarse en color mostaza la proporción representada por el cáncer cervicouterino. Imagen modificada de GLOBOCAN 2012.

En México, se analizó la infección por tipos virales de alto riesgo en neoplasias intraepiteliales cervicales y en cáncer invasivo, en poblaciones de San Luis Potosí y Guanajuato (López, et al., 2008). El estudio fue llevado a cabo en 437 pacientes,

observando que el 92 % estaba infectado con algún VPH de alto riesgo (VPH-AR). Los tipos virales identificados fueron 16, 18, 31, 33, 35, 52 y 58, siendo los primeros tres los más abundantes. Otro análisis llevado a cabo sólo para VPH 16 y 18, con muestras de lesiones escamosas intraepiteliales de alto y bajo grado (HSIL y LSIL), ICC y controles, del Instituto Nacional de Cancerología e IMSS, muestra que de los casos de ICC el 50.3 % son positivos a VPH 16 y 15.5 % a VPH 18, de las lesiones intraepiteliales el 35.6 % tienen tipo 16 y 7 % tipo 18, finalmente las muestras con citología normal presentan 9.1 % de los casos con VPH 16 y 2.8 % con VPH 18 (Lizano, *et al.*, 2006).

Englobando estos resultados y algunos otros publicados para poblaciones de distintos países (Moody y Laimins, 2010; Pillai, *et al.*, 2010; Wang, *et al.*, 2012; Baudu, *et al.*, 2014; Yousefzadeh, *et al.*, 2014; McDonald, *et al.*, 2014), se puede concluir que tanto en México como en el mundo, el tipo viral oncogénico más abundante es el 16, y que el tipo 18 es altamente prevalente en todos los continentes.

Ahora bien, dentro de los carcinomas escamosos, se encuentra al VPH-16, más que al VPH-18, mientras que en los adenocarcinomas se ha logrado observar una relación casi equitativa entre la presencia de ambos tipos virales. Después del tratamiento con quimioterapia, los adenocarcinomas presentan un menor porcentaje de sobrevivida a 5 años (55.6 %) que el que se observa en pacientes con cáncer cervical escamoso (80.1%) (Noh, *et al.*, 2014).

1.2 Factores de riesgo y vacunas

Se ha determinado que la infección persistente por el Virus del Papiloma Humano (VPH), es necesaria para el desarrollo del carcinoma cervical (De Villiers, *et al.*, 1981), encontrándose en el 99.7% de los casos (Walboomers, *et al.*, 1999). Existen factores de riesgo ligados al VPH que pueden ser determinantes para que se dé la evolución a cáncer cervicouterino. Algunos de estos factores son:

- **Promiscuidad.** Mientras más parejas sexuales tiene una mujer, o la pareja sexual de ésta, aumenta la probabilidad de infección por el VPH, y por lo tanto de desarrollar CaCU (Burk, *et al.*, 1996; Demers, *et al.*, 2012; Remschmidt, *et al.*, 2013).

- **Etnia.** Este factor podría deberse a predisposiciones genéticas para la infección del virus o a la distribución de los tipos virales de acuerdo a la región de la etnia ([Burk, et al., 1996](#); [Demers, et al., 2012](#))
- **Hábitos tabáquicos.** El hecho de fumar, tener un compañero que lo haga o ser fumador pasivo, aumenta las probabilidades de desarrollar CaCU ([Burk, et al., 1996](#); [Natphopsuk, et al., 2012](#))
- **Edad.** La infección por VPH decrece conforme aumenta la edad. La presencia del virus se observa más comúnmente en mujeres menores a 30 años, mientras el CaCU suele presentarse después de los 35 años ([Burk, et al., 1996](#); [Burk, Kelly, et al., 1996](#); [Adam, et al., 2000](#); [Demers, et al., 2012](#))
- **Uso prolongado de anticonceptivos orales.** El uso de estos productos por largo tiempo, en personas infectadas con VPH, muestra una fuerte correlación con la aparición de lesiones ([Negrini, et al., 1990](#)). También se ha observado *in vitro*, que la presencia de glucocorticoides, en células infectadas con VPH-16, aumenta la transformación celular ([Pater, et al., 1988](#)).
- **Factores heredables.** En algunos estudios se ha observado que los elementos genéticos que se heredan de la familia, pueden tener un efecto de aproximadamente el 25 % en el desarrollo del cáncer ([Magnusson, et al., 2000](#); [Hemminki y Chen, 2006](#)). Se suponía que los genes involucrados podrían ser los responsables de procesos de inmunidad o de la transformación celular, pero ha sido hasta los últimos años que se han encontrado evidencias más claras ([Chen, et al., 2013](#)).
- **pH.** Un microambiente con pH elevado, aumenta 30 % el riesgo de infección con varios tipos virales y el desarrollo de una lesión de bajo grado ([Clarke, et al., 2012](#)).
- **Periodo entre la menarquia y la primera relación sexual.** Un intervalo pequeño entre estos dos eventos, supone un factor de riesgo para el desarrollo de lesiones de alto grado y otras anormalidades citológicas ([Ruiz, et al., 2012](#); [Natphopsuk, et al., 2012](#))
- **Carga y persistencia viral.** La carga viral es el determinante más importante para que se dé la persistencia del VPH. De manera subsecuente, la persistencia de los tipos virales de alto riesgo, promueve el desarrollo de las lesiones precancerosas y posteriormente del cáncer ([Muñoz, et al., 2009](#); [Gosvig, et al., 2013](#)).

- **Variantes virales intratipo.** Se ha comprobado que las diferentes variantes de los VPH-AR, poseen potenciales oncogénicos distintos (Chang, et al., 2013; Tornesello, et al., 2011; Pista, et al., 2007).

Cuando se hace una detección temprana de la infección por VPH, un tratamiento oportuno puede evitar que se desarrolle cáncer. Zhou y sus colaboradores desarrollaron en 1991, las VLPs o partículas tipo virus. Esto lo hicieron expresando los genes L1 y L2 de VPH 16 en células eucariontes (Zhou et al., 1991). Posteriormente se detalló esto, demostrando que sólo L1 era suficiente para el ensamblaje de las partículas (Kirnbauer et al., 1992). Actualmente se encuentran en uso dos vacunas profilácticas que utilizan VLPs. Gardasil, producida por Merck & Co. Inc., es una vacuna tetravalente, que protege contra HPV de los tipos 6, 11, 16 y 18. La otra vacuna es Cervarix, producida por GlaxoSmithKline, y previene la infección con virus de tipo 16 y 18 (NCI, 2011). Actualmente Merck, Sharp & Dohme estudia la eficacia de una vacuna nanovalente contra VPH de los tipos 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58, 6 y 11 (Revisado en Chatterjee, 2014).

1.3 Historia natural de la enfermedad

Actualmente, las etapas precursoras del cáncer cervical se describen utilizando principalmente dos clasificaciones que son mostradas en la **tabla 1**: la de neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) propuesta por Richart en 1980 y la de Bethesda desarrollada en 1989. La primera de estas involucra tres estados de displasia denominados, NIC 1, 2 y 3; donde el NIC 1 corresponde a displasias leves, NIC 2 a moderadas y NIC 3 a severas además de carcinoma *in situ*. La segunda clasificación engloba a las NIC 2 y 3 en un grupo de lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado o HSIL, mientras que las NIC 1 corresponden a lesiones de bajo grado o LSIL (Rohan y Springer, 2004).

Tabla 1. Clasificación de lesiones preinvasivas del cérvix. Tabla modificada de Rohan y Springer, 2004.

| DESCRIPCIÓN | NEOPLASIAS INTRAEPITELIALES CERVICALES (NIC) | BETHESDA |
|--------------------------|--|----------|
| Displasia leve | NIC 1 | LSIL |
| Displasia moderada | NIC 2 | HSIL |
| Displasia severa | NIC 3 | HSIL |
| Carcinoma <i>in situ</i> | NIC 3 | HSIL |

Cuando se da una infección por VPH, esta suele eliminarse naturalmente por el sistema inmune del hospedero, pero existen algunos casos en los que se ha observado que cuando parece haber una eliminación de la infección, el virus se encuentra en un estado de **latencia** (Gravitt, 2012). Cuando la infección no es eliminada rápidamente, se puede avanzar a lo largo de distintas etapas con el riesgo de generar cáncer invasor (Fig. 3).

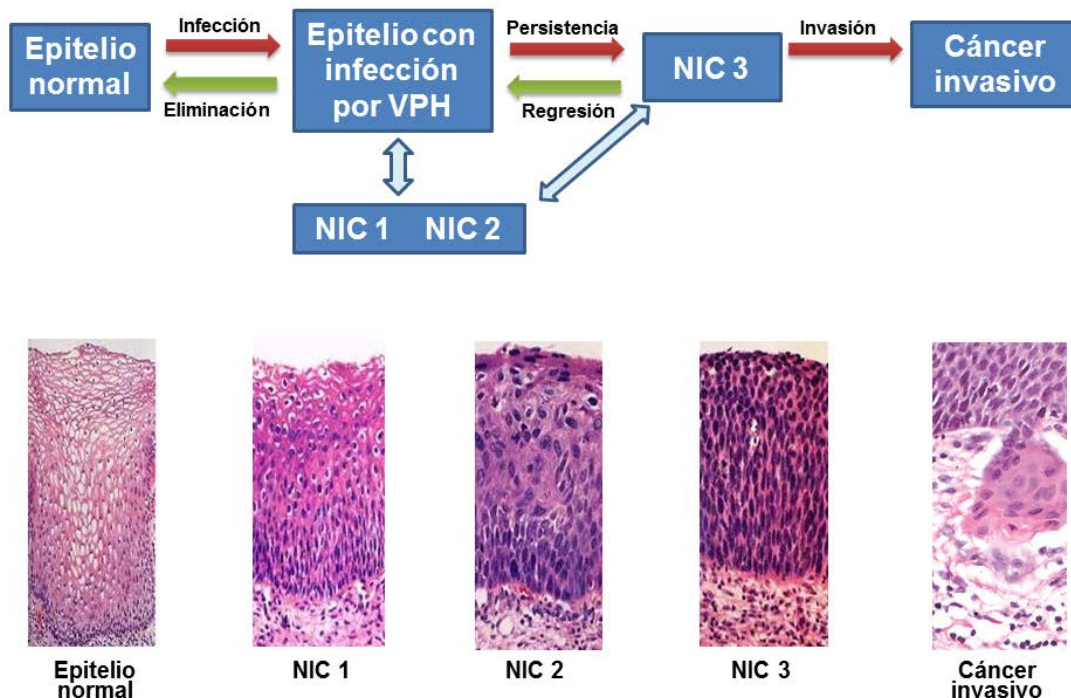


Figura 3. Etapas en la carcinogénesis cervical. Se muestran las etapas a partir de un epitelio normal, pasando por la infección con VPH, las distintas fases de la clasificación de neoplasias intraepiteliales cervicales, culminando en cáncer invasor. En la parte inferior de la imagen podemos ver cortes patológicos en cada una de las etapas. Imagen modificada de Schiffman y Kjaer, 2003; <http://www.cancerquest.org/index.cfm?page=4086&lang=spanish>.

Si la infección genera una lesión leve, normalmente es tal para revertir en personas competentes inmunológicamente (Holowanty, et al., 1999). Sólo el 25 % de las infecciones con VPH desarrollan lesiones LSIL, de las cuales entre el 20 y 40 % progresan a HSIL. Para que se desarrolle una lesión precancerosa (NIC 3), la infección con un VPH de alto riesgo debe persistir, lo que puede ocurrir por alguna deficiencia inmune, carga viral elevada o infección con distintos tipos virales (Hildesheim, et al., 1994; Ho, et al., 1998). Los NIC 3 revierten poco comúnmente, son frecuentemente localizados en mujeres de entre 27 y 30 años y pueden permanecer aproximadamente 10 años en ese estadio antes de que se genere un cáncer invasor (Moscicki, et al., 2006).

2. El virus del papiloma humano

El VPH es una causa necesaria para el desarrollo del cáncer cervicouterino, por tanto, creemos que será de gran utilidad la comprensión de este virus. Hablaremos de su clasificación dentro de los virus del papiloma (VP), organización genética, ciclo de vida y finalmente de las proteínas expresadas a partir de su genoma.

2.1 Clasificación del VPH

Todos los virus del papiloma se clasifican dentro de la familia Papillomaviridae. Se han encontrado en mamíferos, aves y reptiles. Taxonómicamente podemos encontrar géneros, especies y tipos; los géneros comparten menos del 60% de identidad en la secuencia del gen L1, que es el más conservado del genoma viral. Las especies dentro de un género, tienen una identidad entre el 60 y el 70%, pero los tipos dentro de la especie tienen del 71 al 89% de identidad. Cuando se encuentran diferencias entre un 2 y 10%, se reconoce un subtipo viral, y al localizar diferencias menores al 2% se habla de una nueva variante. Hasta ahora se han secuenciado completamente aproximadamente 170 tipos virales, pero hay identificados otros posibles (pave.niaid.nih.gov 2014; Van Doorslaer, *et al.*, 2013).

Según la clasificación realizada por Bernard y colaboradores en 2010, hasta ese momento, se distinguen 29 géneros a partir de 189 tipos de virus del papiloma, de los cuales se tomaron en cuenta 120 VPH (Bernard, *et al.*, 2010). Clínicamente, el género más relevante es el papiloma-Alfa, que engloba a los VPH que se asocian a lesiones en las mucosas genitales (Bernard, 2005).

De acuerdo con la actividad transformante de sus proteínas virales E6 y E7, los tipos virales que infectan dichas mucosas se han dividido en VPH de alto riesgo (VPH-AR), asociados a la progresión a neoplasia cervical; y de bajo riesgo (VPH-BR), asociados a la formación de verrugas benignas y displasias leves. El número de tipos virales que se han reconocido como carcinogénicos o probablemente carcinogénicos varían entre un autor y otro. Englobando estos VPH-AR podríamos mencionar los siguientes: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 69, 34, 67 y 73 (Bernard, *et al.*, 2013; Guan, *et al.*, 2013).

Ahora bien, como hemos mencionado anteriormente, los tipos virales 16 y 18 son los más frecuentes en cáncer cervical, presentándose entre el 70 y 80 % de

los casos, de los cuales, entre 10 y 20 % corresponden al VPH-18 (de Sanjose, et al., 2010). Dentro de los VPH tipo 18, se han identificado tres variantes: Europea (E), Africana (Af) y Asiático-Amerindia (AsAI), siendo esta última, la clona de referencia o prototipo de VPH-18 (Ong, et al., 1993).

2.2 Organización del VPH-18

El virus posee una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), formada por dos proteínas estructurales: L1 y L2, siendo L1 la que se encuentra en mayor cantidad. Ésta estructura sin envoltura, posee un diámetro de alrededor de 55 nm (Revisado en Zur Hausen, 1996; López y Lizano, 2006).

En 1984 se detectó por primera vez la presencia del material genético del VPH-18 en biopsias de cáncer genital (Boshart, et al., 1984).

El genoma del VPH-18 (Fig. 4) está formado por DNA circular de doble cadena, con un tamaño de 7857 pb. Para su estudio, se divide en tres regiones: 1) La región larga de control o LCR, que no posee marco de lectura abierta y regula la transcripción y replicación viral, 2) La región temprana, que contiene marcos de lectura abierta que codifican proteínas involucradas en la regulación de funciones tanto virales como celulares (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y 3) La región tardía, que codifica para proteínas formadoras de la cápside viral (L1 y L2) (Revisado en Zur Hausen, 1996; López y Lizano, 2006).

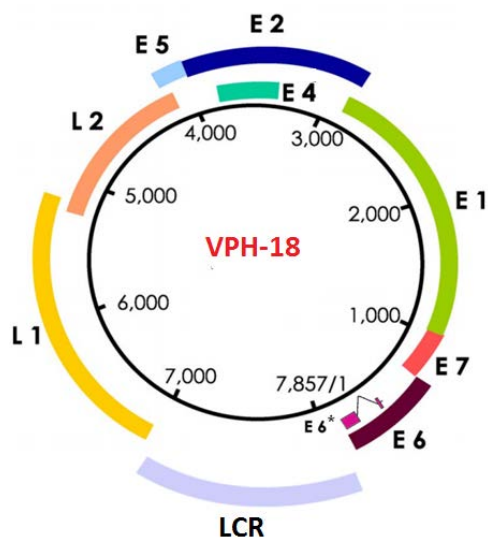


Figura 4. Esquema general del genoma del VPH-18. Se observa la región larga de control LCR y los marcos de lectura abiertos para las diferentes proteínas virales. Imagen modificada de Muñoz, et al., 2003.

2.3 Ciclo de vida

Es importante aclarar que dependiendo de múltiples factores como: el tipo viral, el tejido que se infecta, el consumo de hormonas, etc., el ciclo de vida puede variar, por lo que algunas de las generalidades que se mencionarán en este apartado pudieran no ser aplicables en todas las infecciones.

Para que se de la infección inicial por el virus, se requiere de una microabrasión en el tejido que permita la interacción del virus con la lámina basal del epitelio. Se ha postulado que la infección de la zona de transformación es común por la fácil accesibilidad del virus a la capa de células columnares que posteriormente formarán el epitelio estratificado (**Fig. 5**) (Revisado en Doorbar, *et al.*, 2012).

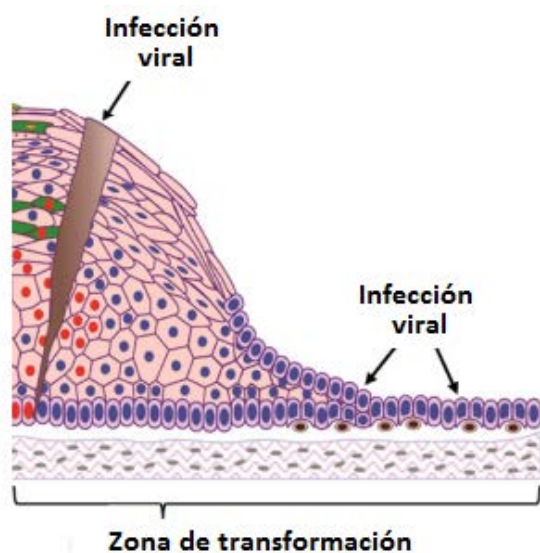


Figura 5. Infección del VPH. Se ha postulado que la infección del virus puede darse por microabrasiones en el epitelio estratificado, que permitan al virus llegar a las células de la capa basal, o en las células cercanas a la zona de transformación, que posteriormente formarán el epitelio estratificado. Imagen modificada de Doorbar, *et al.*, 2012.

Una vez que el virus ha llegado a la capa basal, es necesario el reconocimiento célula-virus. Es posible que la unión inicial del virus se de en la matriz extracelular por medio de laminina-5 (Culp, *et al.*, 2006). Lo que ha sido ampliamente observado, es que el heparán sulfato (HS), presente en la superficie de la célula, funciona como receptor del VPH y es necesario para la infección (Giroglou, *et al.*, 2001). Muchas otras moléculas como las ciclofilinas (Bienkowska, *et al.*, 2012; Bienkowska, *et al.*, 2009), la integrina α_6 , receptores de factores de crecimiento, tetraspaninas, anexina A2, etc., podrían actuar como receptores secundarios (Selinka, *et al.*, 2003). Dichas moléculas se relacionan con la infección vírica (Revisado en Raff, *et al.*, 2013) y algunas han mostrado asociarse a HS y a las proteínas L1 y L2,

generando un cambio conformacional en la cápside, que permite la exposición del extremo N-terminal de la proteína L2 y su corte.

La internalización de los virus (VPH-16, 18 y 31), se da por un mecanismo de endocitosis independiente de clatrina, caveolina, dinamina o balsas lipídicas, pero que requiere de la polimerización dinámica de actina y de microdominios ricos en tetraspanina. Estas observaciones aunadas a la localización de partículas virales en endosomas tardíos, sugiere que el mecanismo utilizado para la internalización es la macropinocitosis (Spoden, et al., 2013). Englobando todos los elementos involucrados hasta ahora, Raff y colaboradores proponen un esquema de la infección de las células basales por el VPH, el cual es mostrado en la **figura 6**.

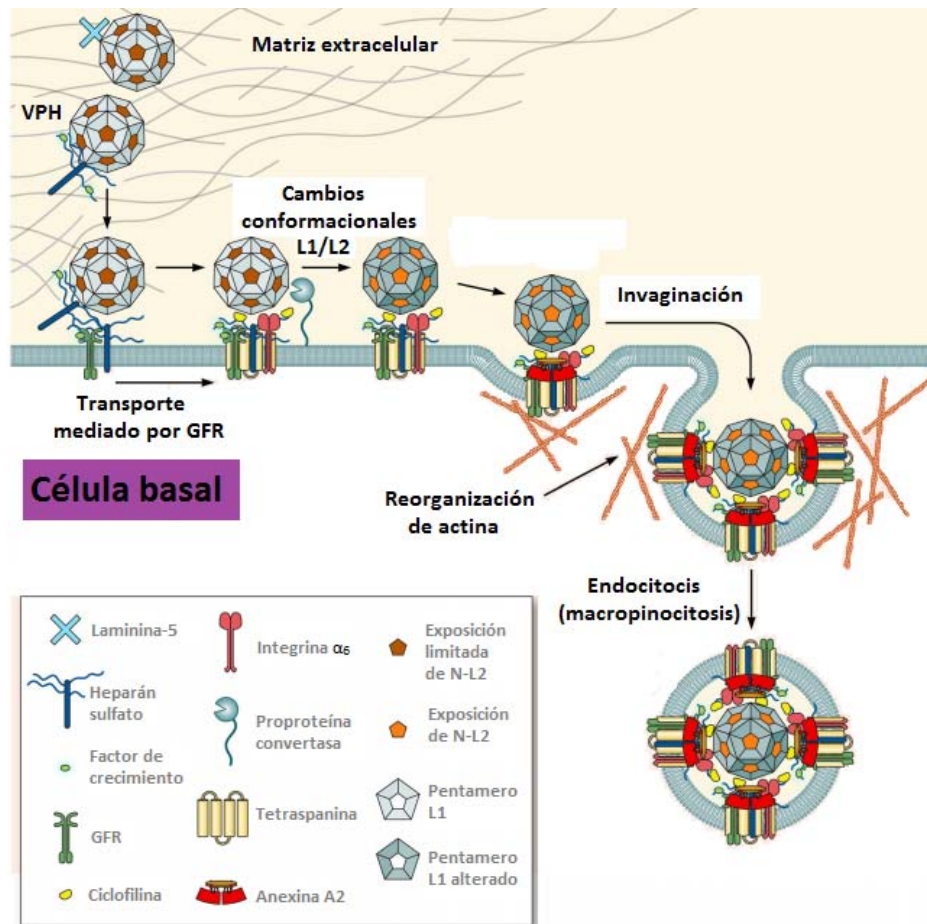


Figura 6. Esquema de la infección de células basales por el VPH. El virus se une a heparán sulfato a través de laminina-5 o directamente sobre la membrana celular, al mismo tiempo GFR (Receptor de factores de crecimiento) forma un complejo con éstos. Se generan cambios conformacionales en las proteínas virales, lo que facilita la unión a diversas proteínas que llevan finalmente a la endocitosis del virus por remodelación de los filamentos de actina. Imagen modificada de **Raff, et al., 2013**.

El mecanismo de transporte del DNA viral al núcleo, una vez que el virus se internalizó, es poco conocido. Hasta ahora se ha observado al complejo L2-DNA en el núcleo, pero no es claro el mecanismo. La unión de L2 con Sorting Nexin 17 (SNX17), parece ser importante en el mantenimiento de la cápside cuando se transporta vía endosoma/lisosoma y los autores especulan sobre la posible función de esta unión en la liberación de L2-DNA del endosoma (Bergant y Banks, 2013; Bergant, *et al.*, 2012).

El ciclo de vida del virus del papiloma humano en una infección productiva normal, se encuentra ligado a la diferenciación del epitelio del cérvix (Fig. 7A) y se puede dar tanto por tipos virales de bajo riesgo como de alto riesgo, pudiendo generar un NIC 1 (Doorbar, 2006). Dentro de este proceso podemos distinguir fases como: el mantenimiento del genoma, la estimulación de la proliferación, la amplificación del genoma, el ensamblaje de los virus y su liberación.

En una célula basal infectada, el genoma es replicado, manteniendo un número bajo de episomas (entre 50 y 100 por célula). En este paso las proteínas E1 (helicasa) y E2 (factor de replicación y transcripción), son necesarias para la replicación viral. Para iniciar este proceso, E2 se une a los sitios de unión para E2 presentes en la LCR, y posteriormente recluta a E1 en el origen de replicación. E1 se une a la LCR y a ATP, se disocia de E2, forma dobles trímeros y finalmente dobles hexámeros que harán la función de helicasa en la horquilla de replicación (Schuck y Stenlund, 2005). La replicación eficiente requiere además de factores celulares que son expresados sólo en la fase S del ciclo celular, y que por lo tanto no están presentes a lo largo de la diferenciación. El mecanismo por el cual el virus resuelve este problema, es la proliferación en células basales y parabasales por expresión de las proteínas virales E6 y E7, las cuales inducen la entrada a la fase S (Revisado en D'Abrahamo y Archambault, 2011). Además de muchas otras funciones, dos de los principales mecanismos por los cuales E6 y E7 generan la proliferación y mantenimiento celular, son la degradación o desregulación de p53 y Rb. E7 desregula a Rb (Bover, *et al.*, 1996) y no permite la unión de esta proteína con E2F, por lo que este factor puede transactivar ciclinas necesarias en el progreso del ciclo celular. Por su parte, E6 lleva a la degradación o

desregulación de p53 ([Band, et al., 1993](#); [Scheffner, et al., 1990](#)) interfiriendo con el arresto celular y la apoptosis.

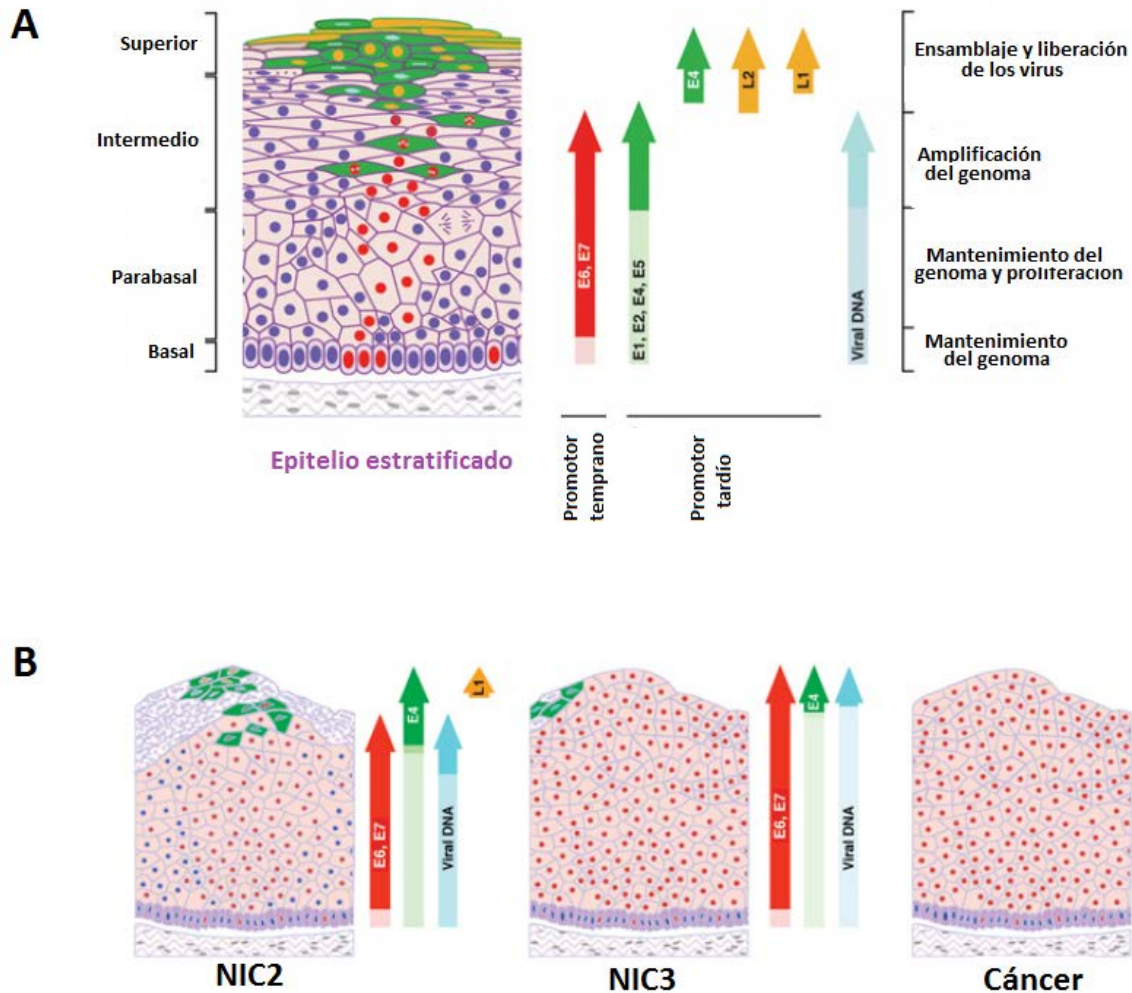


Figura 7. Etapas posteriores a la infección del VPH. A) A la izquierda se muestra el epitelio estratificado con las distintas capas celulares. La expresión de las proteínas virales a lo largo de la diferenciación celular, se muestra con flechas de distintos colores. Los tonos claros de las flechas simbolizan niveles bajos de expresión, mientras los tonos fuertes altos niveles. La consecuencia de la combinación en la expresión de las diversas proteínas se marca a la derecha de las flechas. B) Podemos ver el aumento paulatino de la producción de proteínas oncogénicas y la disminución de las reguladoras, a lo largo del desarrollo de las lesiones hasta el cáncer cervical. Este desajuste se acompaña generalmente de la inserción del genoma viral en el de la célula hospedera. Imagen modificada de [Doorbar, 2006](#).

Además de existir un promotor temprano que regula la transcripción de las proteínas E6 y E7, encontramos un promotor tardío o dependiente de diferenciación ([Grassmann, et al., 1996](#)), que es capaz de elevar la expresión de las proteínas virales E2 y E1, permitiendo la amplificación del genoma viral en la capa media del epitelio, mientras que la entrada a la fase

S del ciclo celular sigue estando regulada por E6 y E7. Además de E1 y E2, la transcripción de otras proteínas virales como E4 y E5 es regulada por este segundo promotor y contribuye indirectamente a la amplificación del genoma [\(Revisado en Doobar, et al., 2012\)](#).

La etapa final del ciclo de vida se da en los queratinocitos diferenciados de las capas superiores del epitelio. En este punto se requiere un cambio en el patrón de splicing de los RNAs generados a partir de promotor tardío, produciéndose las proteínas de la cápside L2 y L1, que son transportadas al núcleo donde los virus se ensamblan con el DNA [\(Florin, et al., 2002\)](#). Finalmente las partículas virales son liberadas, probablemente con la ayuda de E4.

Cuando la infección del cérvix se da por un VPH de alto riesgo, la producción ordenada de las proteínas virales en un NIC 1 puede desregularse y generar neoplasias **(Fig. 7B)**. Hasta ahora, no se sabe con exactitud cómo se da este desajuste, aunque podrían estar involucradas modificaciones epigenéticas del DNA viral [\(Vinokurova y Von Knebel Doeberitz, 2011\)](#), variaciones en niveles hormonales [\(Revisado en Gariglio, et al., 2009\)](#), etc. Si la expresión de E6 y E7 (oncoproteínas en los VPH-AR) aumenta, se predispone a la célula a la inestabilidad cromosómica, fenómeno observado en lesiones NIC 2 y 3 [\(Sokolova, et al., 2007\)](#). La desregulación generada facilita la integración del DNA viral en sitios frágiles del genoma celular [\(Matovina, et al., 2009\)](#), lo que muchas veces resulta en el corte de E2 y/o E1 [\(Cricca, et al., 2009\)](#) (regulador de la transcripción viral), con el consecuente aumento de las oncoproteínas y el probable desarrollo de cáncer.

3. La oncoproteína E6

E6 se une a un gran número de proteínas como factores de transcripción, proteínas apoptóticas, involucradas en arquitectura celular, etc., llevando a la degradación de muchas de éstas, y produciendo desregulación de muchas funciones celulares.

3.1 Funciones de la oncoproteína E6

La proteína E6 de los VPH-AR presenta una acción clave en la transformación celular. Tres de las principales funciones de esta proteína, involucradas en el fenotipo cancerígeno, son

las mostradas en la **figura 8**. Genera la inhibición de la función apoptótica de p53, pues lleva a su degradación por ubiquitinación. Para esto E6 se relaciona con una ubiquitin ligasa denominada E6AP o proteína celular asociada a E6 (**Bonilla, et al., 2012**). Además, E6/E6AP inhibe la senescencia por la immortalización, gracias a que lleva a la degradación de NFX1-91, que de forma natural, reprime la transcripción de la subunidad catalítica hTERT de la telomerasa celular (**Xu, et al., 2010**). Por su efecto sobre proteínas que contienen dominios PDZ, E6 puede afectar también los contactos y la polaridad celular (**Mantovani y Banks, 2001**).

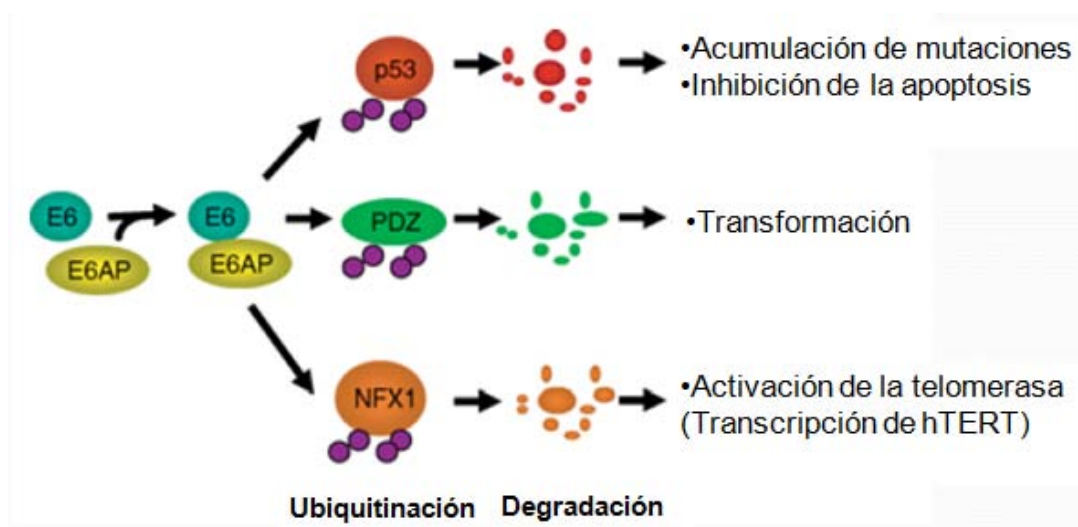


Figura 8. Se muestran las principales funciones de la oncoproteína E6. Degradación de p53, proteínas con dominios PDZ y NFX1-91. Imagen modificada de **Narisawa y Kiyono, 2007**.

3.2 Procesamiento alternativo de E6

Una característica importante de las proteínas E6-AR, es el proceso de splicing o procesamiento alternativo, que se observa para transcritos primarios codificados por el gen de la oncoproteína E6. El gen E6 de estos tipos virales, posee un sitio donador altamente conservado dentro del marco de lectura (ORF) para E6 (G233), y algunos poseen además un sitio aceptor conservado, ubicado también dentro del ORF de E6 y antes del comienzo de E7 (**Fig. 9**). Estos sitios, permiten la remoción de un fragmento de 182 nucleótidos dentro del ORF para E6, generando el RNAm para una isoforma pequeña de E6 denominada E6* (**Pim, et al., 2009**).

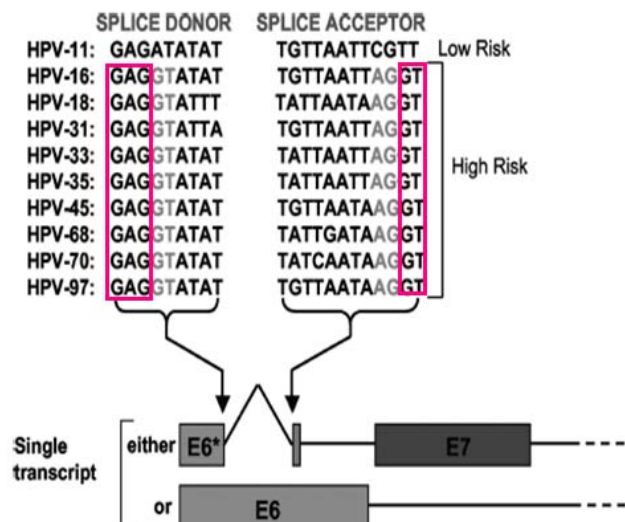


Figura 9. Sitios donadores y aceptores de splicing en los VPH-AR. Con un cuadro rosa, se señalan los sitios donadores y aceptores de splicing en los VPH de alto riesgo. Imagen modificada de **Pim, et al., 2009**.

Se ha obtenido evidencia que sugiere que, al menos para VPH-16 y 18, los RNAm's que llevan a cabo splicing, codifican para E7 y además E6*I, en células derivadas de tumores cervicales. Al analizar los transcritos en células tumorales, se ha observado que éstos se encuentran mayoritariamente en la forma que lleva a cabo splicing. Cuando se hacen construcciones con el gen completo, después de la transfección en células de mamífero, se expresan comúnmente altas cantidades del RNAm para E6*I (**De la Cruz, et al., 2005; Pim, et al., 2009**). En VPH-16 los patrones de splicing permiten la expresión de cuatro especies de E6*I, según la posición del aceptor de splicing. En VPH-18, aparece sólo una especie de RNAm que expresa E6*I (**Czegledy et al., 1994; Pim, et al., 2009**).

4. La proteína E6*I

Poco es el conocimiento hasta ahora generado de la isoforma pequeña de E6 completo. En el siguiente apartado, enunciamos algunas de las evidencias de acciones de E6*I en blancos específicos o del efecto que tiene sobre el papel de E6. También se puntualiza la estructura primaria y se elucida sobre el plegamiento de la misma.

4.1 Estructura y plegamiento de la proteína E6*I

La proteína E6*I es la versión de E6 con el C-terminal truncado. En VPH-16 los patrones de splicing permiten la expresión de más de cuatro especies de E6*I, según la posición del aceptor de splicing (Ajiro, *et al.*, 2012). En VPH-18 aparece sólo una especie de RNA que expresa E6*I (Pim, *et al.*, 2009).

A

E6 158 aa

```
MARFEDPTRR PYKLPDLCTE LNTSLQDIEI TCVYCKTVLE LTEVFEFQFK
DLFVVYRDSI PHAACHKCID FYSRIRELRLH YSDSVYGDTL EKLNTGGLYN
LLIRCLRCQK PLNPAEKLRH LNEKRRFHNI AGHYRGQCHS CCNRARQERL
QRRRETQV
```

E6*I 57 aa

```
MARFEDPTRR PYKLPDLCTE LNTSLQDIEI TCVYCKTVLE LTEVPAVPET
VESSAKT
```

B

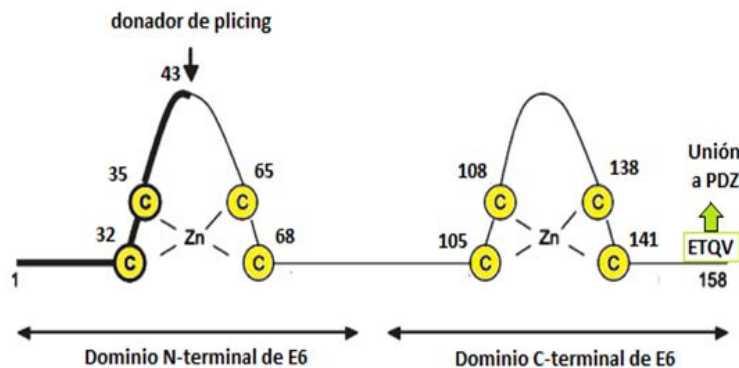


Figura 10. Estructura aminoacídica de las proteínas E6 y E6*I. A) Se observa la secuencia de aminoácidos para las dos proteínas. En amarillo se señalan las cisteínas involucradas en la unión a Zn, formadoras de los dedos de zinc. En verde se resalta el dominio que se une a PDZ y en azul observamos los aminoácidos generados después del sitio de splicing en E6*I. B) Esquema que representa en una línea delgada a E6 y en una línea gruesa los primeros 43 aminoácidos que comparte E6 con E6*I antes del sitio de splicing. Imagen modificada de Heer *et al.*, 2011.

El polipéptido de E6*I de VPH-18 comparte 44 aminoácidos con E6 completo, y luego posee 13 aminoácidos únicos que se derivan del cambio de marco de lectura posterior al splicing. A partir de este cambio en el marco de lectura, también se genera un codón de paro temprano, que genera a una proteína de 57 aminoácidos (Fig. 10 A) (Pim, *et al.*, 2009). En los primeros aminoácidos, antes del sitio de splicing, E6*I conserva sólo dos dominios de unión a zinc

(CXXC) de los ocho presentes en E6 completo, por lo que no se logra formar ni uno de los dos dedos de zinc (con cuatro CXXC cada uno) presentes en el fragmento completo. El dominio de unión a PDZ también parece perderse (**Fig. 10 B**). Hasta ahora no se conoce la estructura tridimensional de E6*I, ni los dominios específicos que actúan en sus funciones.

E6*I puede formar oligómeros y que además tiene distintos patrones de plegamiento, características que dependen del pH, estado redox, disponibilidad de metales y de la cantidad de proteína (**Heer, et al., 2011**).

4.2 Funciones de la proteína E6*I

A la fecha, se han generado pocos estudios sobre el papel de la proteína E6*I. En 1994, Shirasawa y sus colaboradores, demostraron que E6*I de VPH-16, transactiva el promotor temprano P97 de VPH-16, en contraste con la proteína completa E6, que reprime la transcripción del promotor; aunque no se sabe bien a bien cómo se lleva a cabo el proceso (**Shirasawa, et al., 1994**).

Algunos resultados muestran que E6*I de VPH-18, es capaz de unirse a E6 de VPH-16 y 18, además de a E6AP, lo que lleva a la inhibición de la degradación de p53 y por tanto a la detención de la transformación celular (**Pim, et al., 1997**). Posteriormente se supo que la región en E6*I necesaria para la unión a E6 y E6AP es la misma y se compone de 20 aminoácidos antes del sitio de splicing. El estudio con tres mutantes en esta región, demostró que cualquier mutación afecta la unión a E6AP, pero que la mutación es específica en los residuos IEIT, no permite la unión de E6 (**Pim y Banks, 1999**).

Vázquez y colaboradores encontraron que al transfectar células MCF7 con E6*I hay un ligero aumento de p14^{ARF}, proteína regulada negativamente por p53. Ya que E6*I no es capaz de degradar a p53 como lo hace E6, el resultado fue inesperado. La explicación que se encuentra a este hecho, es que probablemente E6*I se una a p53 induciendo modificaciones que no permitan la remoción completa de p14^{ARF} por esta enzima (**Vázquez, et al., 2013**).

En el 2007 se observó que la proteína E6*I, al igual que E6 completa, son capaces de unirse a la procaspasa 8. La proteína completa llevaba a la degradación acelerada de la procaspasa, mientras que E6*I, la estabilizaba (**Filippova, et al., 2007**). Recientemente se

observó que las proteínas E6 de distintos tipos de VPH, así como E6*1 del VPH-16 y 18, se unen al dominio efector de muerte (DED) de la procaspasa 8, y que todas las formas de E6 inducen el corte y activación de ésta, pero no aumentan la apoptosis. Se piensa que la falta de aumento de la apoptosis se debe a que E6 y E6*1 además promueven la translocación de la procaspasa al núcleo, modificando su localización habitual en el citoplasma (Manzo, *et al.*, 2014).

E6*1 también es capaz de llevar a la degradación de proteínas con dominios PDZ, tales como Dlg, MAGI-1, MAGI-2 y Scrib, que son blanco de E6. Además se observó la degradación de Akt. Se estudió la interacción de E6*1 con Dlg y Akt, observando que no se une directamente a éstas. Posiblemente, la proteína E6*1 lleve a la degradación de Dlg y Akt por interacción con otras proteínas involucradas en su regulación (Pim, *et al.*, 2009). Por otro lado, se observó por primera vez que E6*1 es capaz de elevar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que genera estrés oxidativo y el aumento en los niveles de daño en el DNA (Williams, *et al.*, 2014).

A la fecha, se conocen pocas actividades de E6*1 y éstas no presentan un patrón de oncogenicidad o supresor de tumores. Por tanto, el estudio de esta proteína provee un amplio campo para la investigación de su papel en el desarrollo del cáncer y especialmente en el del cáncer cervicouterino, donde es frecuentemente encontrada. La presencia mayoritaria del transcrito codificante para E6*1 en relación con el de E6 completo, en algunas variantes del virus (Fig. 11 y 12) (De la Cruz, *et al.*, 2005; Pim, *et al.*, 2009; Vázquez, *et al.*, 2013) y la regulación de este patrón de splicing dependiente de señales mitógenas (Rosenberger, *et al.*, 2010), sugiere una acción importante de la proteína, tanto en la regulación de E6, como en posibles actividades independientes aún no descritas.

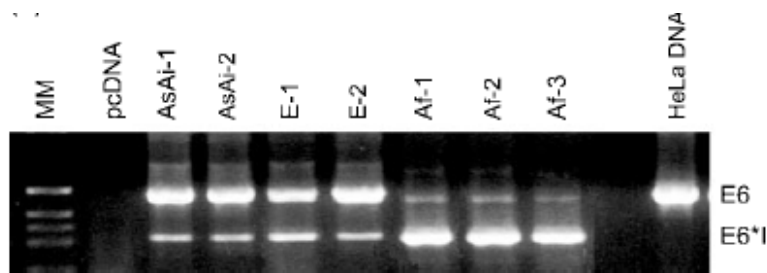


Figura 11. Patrón diferencial de splicing para transcritos de E6 dentro de variantes de VPH-18. RNAm extraído de células MCF7 transfectadas con E6 de variantes AsAi, E y Af de VPH-18, clonadas en el vector pcDNA. El transcrito de E6 completo (477 pb) y E6*1 (295 pb) se muestran para cada variante. Imagen tomada de De la Cruz, *et al.*, 2005.

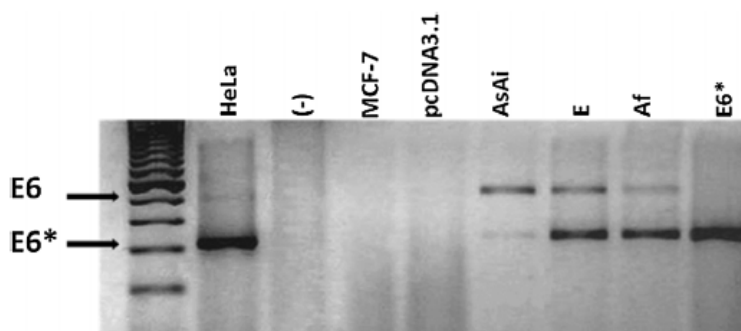


Figura 12. Patrón de splicing para RNAm de E6 en variantes de VPH-18. El transcrito de E6 completo (477 pb) y E6*I (295 pb) a partir de células MCF7 transfectadas con las variantes AsAi, E y Af de E6 VPH-18. Imagen tomada de **Vázquez, et al., 2013**.

5. La vía de Wnt: ligandos y receptores

Esta vía se involucra principalmente en la proliferación, mantenimiento de células trocales, diferenciación y muerte (**Revisado en Ochoa, et al., 2012**). Se han estudiado al menos tres distintas vías activadas por ligandos Wnt; la vía canónica de Wnt o Wnt/ β -catenina, y dos vías no canónicas, independientes de β -catenina: la de polaridad celular planar (PCP) y la de Ca^{2+} . La vía PCP es importante en el cierre de heridas así como del tubo neural. Estos eventos se llevan a cabo por la reorganización del citoesqueleto, lo que da polaridad a la célula y genera el movimiento coordinado de las células. La vía Wnt/ Ca^{2+} lleva a la liberación de calcio intracelular, activación de PKC y CaMKII, lo que finalmente reorganiza el citoesqueleto y uniones celulares (**Revisado en Amin y Vincan, 2012**).

En humanos, se han localizado 19 genes que codifican a distintas glicoproteínas Wnt: Wnt1, 2, 2b, 3, 3a, 4, 5a, 5b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9a, 9b, 10a, 10b, 11 y 16, 11 para receptores de la familia Frizzled (Fzd): Fzd1-11. Los co-receptores se han ligado a una u otra de las vías Wnt; LRP 5/6 para la vía canónica y ROR (**Mikels y Nusse, 2006**) y RYK (**Lu, et al., 2004**) para las no canónicas (<http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>). Los principales ligandos canónicos son Wnt 1, 2, 3, 3a y 8, mientras que los no canónicos son: Wnt 4, 5a, 5b, 7b y 11. En líneas celulares de mamíferos se ha visto que los ligandos Wnt y los receptores Frizzled, son capaces de activar tanto la vía canónica como las no canónicas, dependiendo de la combinación en la que se presenten. También se han observado dimerizaciones entre ligandos o receptores (**Cha, et al., 2008; Carron, et al., 2003**), lo que

muestra que la relación ligando-receptor, así como la cantidad de éstos, puede generar cambios en la activación de las vías.

Es importante saber que la vía de Wnt tiene interacción con muchas otras vías de señalización, varias de ellas involucradas en procesos de desarrollo u homeostasis como Notch, Hedgehog, Rac e Hippo (Huang, *et al.*, 2014; Kurosaka, *et al.*, 2014; Habas, *et al.*, 2003; Azzolin, *et al.*, 2014).

5.1 Vía canónica de Wnt

Cuando no se encuentra presente un ligando Wnt, la proteína β -catenina citoplasmática (que no está en uniones celulares), se une a un complejo que la degrada. Axina, proteína de andamiaje, posee sitios de unión a CK1, GSK3 β , APC y β -catenina, por lo que une a todas en el mismo complejo. CK1 fosforila a β -catenina en la Ser45 y después GSK3 β la fosforila en las Ser33, Ser37 y Thr41 (Liu *et al.*, 2002), mientras que APC protege dichas fosforilaciones impidiendo la acción de la proteína fosfatasa PP2A (Su, *et al.*, 2008). Las fosforilaciones inducen la ubiquitinación de β -catenina por la β -TrCP ubiquitin ligasa, lo que lleva a su degradación vía proteosoma (Bonilla, *et al.*, 2012; Polakis, 2012). En estas condiciones, el complejo proteico TCF/LEF no lleva a transcripción de los genes blanco de la vía, pues se encuentra unido a distintos represores, dentro de los que se encuentra Groucho y algunas desacetilasas de histonas (Fig. 13 A).

La unión de Wnt al dominio rico en cisteína extracelular del receptor Frizzled y su co-receptor LPR5/6, indispensable para la activación de la vía canónica (Fig. 13 B), lleva a la desensamble del complejo de degradación y la acumulación de β -catenina en el citoplasma y en el núcleo (Bulut, *et al.*, 2011). Los motivos intracelulares del receptor Fzd no poseen acción enzimática, por lo que se da el reclutamiento de proteínas en este sitio, que llevan a la transducción de la señal. La activación de la vía canónica, induce entonces la hiperfosforilación de la proteína intracelular Dishevelled (Dvl 1-3), por distintas cinasas (CK1, CK2 y PAR-1) y su unión al receptor. El co-receptor es fosforilado también por CK1 y GSK3 β , además de otras cinasas, lo que lleva a la unión con Axina lo que impide la formación del complejo de degradación de β -catenina. Este proceso permite la acumulación y la translocación al núcleo de β -catenina, que se une a miembros de la familia TCF/LEF. El

complejo modifica la asociación de TCF con los co-represores, llevando a la interacción con co-activadores como la acetilasa de histonas CBP (Takemaru y Moon, 2000) y remodeladores de cromatina como Brg1 (Barker, et al., 2001). Esto controla la expresión de varios genes que regulan la polaridad celular, proliferación y diferenciación, tales como c-Jun, c-Myc, ciclina D1 y c-fos (Lichtig, et al., 2010; Bonilla, et al., 2012; Revisado en Baarsma, et al., 2013).

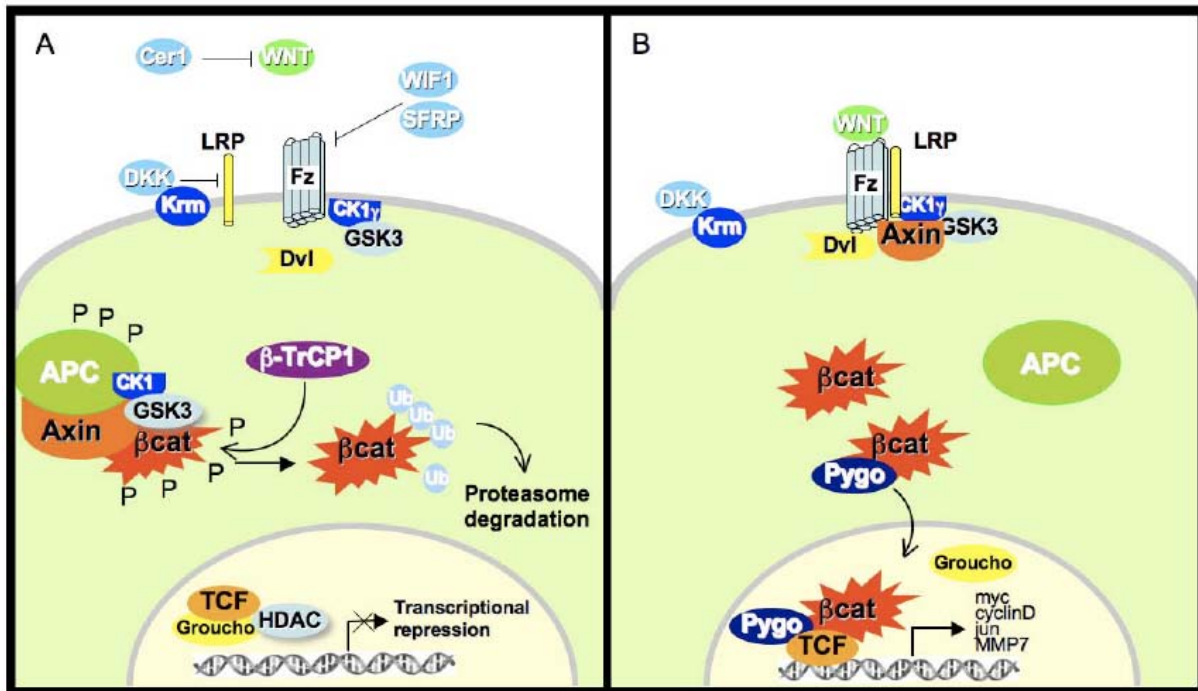


Figura 13. Se esquematiza la vía canónica de Wnt. A) Cuando el ligando Wnt no se encuentra unido a su receptor, la vía se encuentra inactiva, lo que lleva a la degradación de β-catenina. B) Una vez que se une Wnt la vía se activa, por lo que β-catenina logra translocarse al núcleo y activar TCF. Imagen tomada de Pérez, et al., 2008.

Cuando alguno de los componentes de esta vía se ve afectado, diversas enfermedades pueden presentarse como la Poliposis adenomatosa familiar por una mutación en APC (Nishisho, et al., 1991), defectos en la densidad de los huesos por mutaciones en LRP5 (Boyden, et al., 2002), síndrome de tetra-amelia relacionado a defectos en el gen Wnt3 (Niemann, et al., 2004), etc. Muchas investigaciones se han enfocado al análisis de las alteraciones en la vía de Wnt en distintos tipos de cáncer (Revisado en Anastas y Moon, 2013), incluyendo el de cérvix (Üren, et al., 2005; Rodríguez, et al., 2005).

II. ANTECEDENTES

1. La vía de Wnt en cáncer cervicouterino y su relación con E6 y E6*I

En pacientes con CaCU, la progresión tumoral se ha correlacionado con la acumulación nuclear de β -catenina (Üren, *et al.*, 2005; Rodríguez, *et al.*, 2005). Con frecuencia se encuentra β -catenina nuclear en biopsias de carcinoma con VPH-16. Hace poco, se mostró evidencia de que E6-AR puede regular positivamente la vía canónica de Wnt *in vivo* (Bonilla, *et al.*, 2012). Un mecanismo por el cual E6 podría inducir la activación de la vía Wnt, involucra sus efectos en proteínas con dominios PDZ, como Dlg1 y Scribble (Scrib), que participan en la formación de uniones adherentes y que interactúan con APC en una región necesaria para su actividad de supresor de tumores. E6 induce la degradación de Dlg1 y Scribble, lo que lleva a la disminución de la actividad de APC y a la acumulación nuclear de β -catenina (Bonilla, *et al.*, 2012). La proteína E6 también interactúa con Dvl2 (indispensable en la traducción de señales Wnt). Esta unión no depende del dominio de unión a dominios PDZ y es capaz de aumentar la actividad de los factores transcripcionales TCF/LEF, aunque el mecanismo no se conoce (Bonilla, *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la represión de E6 y E7 induce la reducción de la β -catenina nuclear y mediante ensayos de luciferasa, se observó que la activación transcripcional del promotor de TCF por β -catenina, disminuye con el silenciamiento de las proteínas E6 y E7 (Rampias, *et al.*, 2010).

La relación entre E6*I y la vía de Wnt no ha sido dilucidada, pero los niveles elevados de esta proteína en comparación con los de E6 en líneas celulares y tumores, podrían suponer un efecto de esta proteína al menos regulando las actividades de E6. Además la acción E6*I en la degradación de Dlg, nos lleva a pensar que E6*I podría interferir en la modulación de los genes blanco de esta vía y en la localización de β -catenina.

III. JUSTIFICACIÓN

La gran incidencia de cáncer cervicouterino y la constante lucha por encontrar métodos satisfactorios para la prevención y el tratamiento de los VPH-AR que lo generan, hace que la investigación y el entendimiento de las vías afectadas por el virus, sea de suma importancia. Se ha observado que E6-AR es una proteína oncogénica importante en el establecimiento del CaCU y que actúa en la activación de la vía Wnt/TCF. Ya que E6*1 modula ciertas actividades de E6 completo, es importante observar el efecto que puede tener esta proteína por sí misma, en la modulación de la actividad de TCF y en la transcripción de las proteínas blanco de la vía Wnt.

IV. HIPÓTESIS

Las proteínas E6 y E6*1 de VPH-18 modulan elementos de la vía de Wnt y la transcripción de genes blanco en esta vía.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar la participación de las proteínas E6 y E6*I de VPH-18 en la vía de Wnt.

1.1 Objetivos particulares

- Clonación de los genes E6 WT, E6SM y E6*I de VPH-18 y secuenciación de los plásmidos obtenidos.
- Determinación de la expresión y función de las proteínas generadas en células transfectadas.
- Analizar la cantidad de proteína c-Jun, blanco de la vía Wnt, en células transfectadas con E6*I, E6WT y E6SM.
- Evaluar la cantidad de β -catenina en células transfectadas con E6*I, E6WT y E6SM.
- Observar la localización de β -catenina en presencia de E6*I, E6WT o E6SM.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Se utilizaron células humanas de riñón embrionario HEK293 (ATCC), las cuales están transformadas con DNA de adenovirus 5 y son tumorigénicas. También se usaron células HeLa, línea de adenocarcinoma cervical con VPH-18 integrado en su genoma.

2. Cultivo celular

Las líneas celulares se crecieron en medio de cultivo EMEM ATCC[®], suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF) Addgene[®], inactivado. Las células se crecieron a 37 °C con 5 % de CO₂.

3. Diseño de oligonucleótidos

En la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se localizó la secuencia del RNAm codificante para la proteína E6 de VPH-18. Dentro de dicha secuencia se identificaron los sitios donador y aceptor para el procesamiento alternativo del mensajero y con estos datos se obtuvo la secuencia para E6*1.

Una vez identificada la secuencia para las proteínas E6 y E6*1 se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación de ambas proteínas.

Para el diseño se tomaron en cuenta algunas características importantes:

- *Tamaño del oligonucleótido.* Entre 17 y 30 nucleótidos aproximadamente.
- *Contenido en G+C.* Entre un 45 y 55 %.
- *Temperatura de fusión (T_m).* De 55 a 65 °C y cercanas entre ambos oligonucleótidos (menos de 5 °C de diferencia).
- *Secuencias complementarias.* Los primers no deben poseer homología intra-oligonucleótido ni inter-oligonucleótidos.

- *Secuencia GGG en 5'.* Se agrega una secuencia GGG en el extremo amino terminal de cada primer que da estabilidad a la enzima de restricción al situarse sobre la secuencia a cortar.

4. Extracción de DNA genómico

Para digerir las células de donde se extrajo el DNA, se agregaron 400 µl de buffer de lisis y 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml), y la mezcla se incubó a 37 °C durante dos horas. Posteriormente se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó con vortex y se centrifugó a 13 000 rpm por 15 min. Al finalizar la centrifugación se forman dos fases: acuosa (arriba) y orgánica (abajo), en las cuales se visualiza una interfase. La fase acuosa se recupera y se le agrega un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), todo se agitó con vortex y luego se realizó una segunda centrifugación a 13 000 rpm por 15 min. De las dos fases formadas en este paso, se tomó la acuosa y se le agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío, además de 0.1 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M. Para precipitar la muestra se dejó 2 horas a -70 °C o toda la noche a -20 °C. Una vez precipitada, se centrifugó a 13 000 rpm y 4 °C durante 30 min, el sobrenadante se desechó. La pequeña pastilla formada se lavó agregando etanol frío al 70 % y mezclando. Luego de una última centrifugación en las mismas condiciones que la anterior, se desechó el sobrenadante y la pastilla se secó para eliminar los restos de alcohol. Finalmente la muestra fue resuspendida en 30-100 µl de agua estéril, según la concentración requerida.

5. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó con el kit RNeasy de Quiagen®. Se utilizó el procedimiento indicado por el fabricante para la extracción: al botón celular se le agregaron 350 µl de buffer RLT para resuspenderlo. Para romper las células, el contenido del tubo se pasó por una jeringa de 1 ml 15 veces. Posteriormente se agregaron 350 µl de etanol al 70 %, se mezcló y se cargaron 700 µl en una columna del kit. Dicha columna se centrifugó durante 15 segundos a 10 000 rpm y el sobrenadante se descartó. Se adicionaron 500 µl de buffer RPE, y se centrifugó 15 segundos a 10 000 rpm. Nuevamente se agregaron 500 µl de RPE y se centrifugó durante dos minutos. Luego la columna se centrifugó sola un minuto para retirar

todos los restos. Finalmente se agregaron entre 30-70 µl de agua libre de RNAsas para la elución.

6. Retrotranscripción

A partir del RNA extraído se realizó una retrotranscripción para obtener el DNA complementario. El RNA se trató con el kit DNA-free de Ambion[®], que remueve el DNA contaminante con la ayuda de una DNAsa. Para esto se adicionaron 0.1 volúmenes del amortiguador 10X, además de 1 µl de la enzima para 10µl de reacción. Luego la mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se agregaron 0.1 volúmenes de inactivador de DNAsa y se incubó durante dos minutos. Finalmente se centrifugó 1.5 minutos a 12 000 rpm y el sobrenadante, que contenía el RNA, se colectó. Una vez que se tuvo el RNA libre de DNA, utilizando el kit RNA PCR de Geneamp[®], se realizaron las reacciones de retrotranscripción, en las cantidades y con el programa especificados en el **anexo 2.1**.

7. Reacción en cadena de la polimerasa

Se hicieron varias PCRs para la amplificación del control de transfección BAP, E6WT, E6*I y una mutante con splicing disminuido E6SM (donde se cambia la G 233 por una A). Estas reacciones se hicieron a partir de DNA cromosomal, cDNA o DNA plasmídico dependiendo lo que se quisiera localizar. Las cantidades agregadas de cada uno de los reactivos, para una reacción de 20 µl y los programas para la amplificación de todos los productos, pueden observarse en el **anexo 2.2**.

8. Extracción de DNA de gel de agarosa

Para obtener separados los fragmentos que codifican para E6WT y para E6*I, a partir de un amplificado de cDNA de HeLa (con VPH-18), así como para separar el amplificado de E6SM del plásmido pCA-E6SM (donado por el laboratorio del Dr. Lawrence Banks del International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology Padriciano en Trieste, Italia), se utilizó el kit QIAquick Gel Extraction de Qiagen[®]. Con este kit se lograron obtener los fragmentos deseados a partir de un gel de agarosa al 1 %. Una vez que se tenía el gel con la reacción de

PCR, se recortó la banda deseada tratando de tomar la menor cantidad de agarosa posible. El fragmento se colocó en un tubo y se pesó. Posteriormente, se agregaron tres volúmenes de amortiguador QG (tomando el peso del gel como un volumen mg=μl). La mezcla se incubó durante 10 minutos a 50 °C y luego se agregó un volumen de isopropanol, se homogenizó y se transfirió a una columna. Dicha columna se centrifugó a 13 000 rpm durante un minuto y el líquido colectado se descartó. Para lavar, se agregaron 750 μl de amortiguador PE a la columna, se incubó durante tres minutos y fue centrifugada nuevamente un minuto. El filtrado se descartó y luego se centrifugó una vez más sin agregar ningún amortiguador, esto para eliminar todo el etanol (del buffer PE) restante. La columna se transfirió a un tubo y se agregaron entre 30 y 50 μl de amortiguador EB o de agua estéril para eluir el DNA, centrifugando un minuto.

9. Clonación de los fragmentos E6WT, E6SM y E6*I de VPH-18

Una vez que se tenían puros los fragmentos a clonar, se hicieron las restricciones y ligaciones necesarias para la construcción de los plásmidos p3X-E6WT, p3X-E6SM y p3X-E6*I a partir del vector p3XFLAG-CMV-10 de Sigma® (Fig. 14). Dichos plásmidos fueron finalmente transformados en bacterias para su clonación.

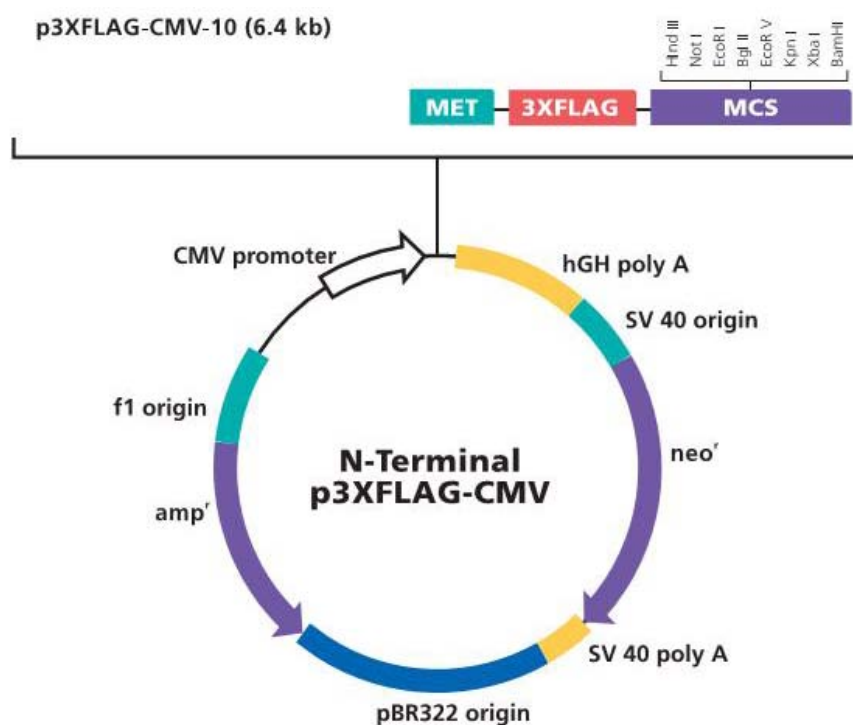


Figura 14. Vector p3XFLAG-CMV-10 (Sigma®). Este vector de expresión ayuda a generar proteínas de fusión con tres epítopes flag (Asp-Tyr, Lys, Xaa, Xaa, Asp) en el extremo N-terminal. Se distribuye junto con el vector p3XFLAG-CMV-7-BAP, que genera la fosfatasa alcalina bacteriana fusionada a los epítopes flag en el extremo N-terminal de la proteína. Este sirve como control positivo de transfección.

Restricciones. Se mezclaron los reactivos necesarios en las cantidades especificadas en el **anexo 3.1** para la primera restricción. Dicha mezcla se incubó durante una hora a 37 °C. Pasado este tiempo, se agregaron los reactivos para la segunda restricción y se repitió la incubación en las mismas condiciones.

Ligaciones. Una vez digeridos el plásmido y cada uno de los fragmentos, ambos se ligaron utilizando la reacción de ligación referida en el **anexo 3.2**, e incubándola a 37 °C durante una hora.

Células competentes. Para transformar las construcciones hechas y llevar a cabo la clonación, fue necesario generar bacterias competentes. Dicho procedimiento se llevó a cabo con la cepa DH5α de *Escherichia coli*, que se hizo competente utilizando un método químico. Se inocularon 50 ml de medio LB con bacterias DH5α y cuando el cultivo llegó a una DO de aproximadamente 0.4 (a 600 nm), las bacterias se colocaron en hielo durante 15 minutos. Pasado el tiempo, se centrifugaron a 2500 rpm por 10 min. El sobrenadante se descartó, y la pastilla de células se resuspendió en 25 ml de un amortiguador CaCl₂-Tris (**anexo 1.6**). Luego de incubar 30 min en hielo, la mezcla se centrifugó a 2500 rpm por 10 min. El sobrenadante fue decantado y la pastilla generada se resuspendió en 3.3 ml del mismo buffer. Las bacterias competentes generadas se dejaban toda la noche a 4 °C, y posteriormente podían ser utilizadas hasta una semana.

Transformación. Cuando se tuvieron listas las bacterias competentes y los plásmidos construidos, el siguiente paso a realizar fue la transformación del DNA en las células. Para estos fines, utilizamos el siguiente protocolo: En distintos tubos colocados en hielo, se agregaron aproximadamente 100 ng de los plásmidos construidos, así como del plásmido vacío y del plásmido control BAP por separado. Posteriormente se adicionaron 200 µl de las bacterias competentes a cada uno de los tubos con DNA y las mezclas se incubaron 30 min en hielo. Para generar un choque térmico, pasados los 30 min, los tubos se colocaron dos minutos a 42 °C, e inmediatamente después se pusieron nuevamente en hielo. Ya en frío, se agregaron 800 µl de medio LB estéril a cada uno de los tubos, y se incubaron una hora a 37 °C con agitación constante (300 rpm). Pasado el tiempo, 100 µl de cada uno de los tubos se sembró en una placa de LB (**Anexo 1.1**) con ampicilina 100 µg/ml. Finalmente las placas se incubaron toda la noche a 37 °C para la obtención de colonias transformantes.

10. Extracción DNA plasmídico

Los diferentes plásmidos fueron extraídos, con el uso del kit PureLink® Quick Plasmid DNA Miniprep de Invitrogen®. El protocolo utilizado se basó en el indicado por el fabricante para el uso de este kit y se describe a continuación: la pastilla de células obtenida de un cultivo bacteriano de 5 ml, se resuspendió en 250 µl de amortiguador R3 (que contiene la RNasa A). La mezcla se transfirió a un tubo y se le adicionaron 250 µl de amortiguador L7 (lisis). Posteriormente se agregaron 350 µl de amortiguador N4 (precipitación) y se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue transferido a una columna, que se centrifugó un minuto y el sobrenadante se descartó. Después de esto se procedió al lavado con 700 µl de amortiguador W9, centrifugando nuevamente un minuto y descartando el sobrenadante. Luego de esto, la columna se centrifugó durante un minuto sin adicionarle nada. Finalmente la columna se transfirió a un tubo y se agregaron 30 µl de agua estéril o de amortiguador de elusión TE en el centro de la membrana. Una última centrifugación se llevó a cabo por dos minutos, en la que el eluido obtenido contenía el plásmido extraído.

11. Electroforesis de ácidos nucleicos

Todas las restricciones, a amplificaciones y demás técnicas de DNA llevadas a cabo, fueron corridas por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (en TBE 1X mostrado en **anexo 1.7**). Los marcadores de peso molecular (Axygen®) que se utilizaron, fueron de 100 pb en todos los casos. El voltaje usado para correr cada gel varió entre 80 y 100 v olts. Los electroferogramas resultantes se revelaron con GelRed de GenScript®, por fluorescencia del colorante en la luz UV.

12. Transfección

La línea celular HEK293 se transfectó con los plásmidos purificados. En placas p60, se sembraron 700 000 células por placa. Al día siguiente, cuando las células se encontraban en una confluencia de aproximadamente 70%, se les cambió el medio a 1 ml de EMEM con 10% de SBF. Como se muestra en la **figura 8.1** del **anexo 8**, se usaron dos tubos para cada una de las construcciones a transfectar. A uno de los tubos se agregaron 5050 ng de DNA (5 µg

de la construcción y 50 ng del plásmido control BAP) y al otro tubo 5 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen®). Cada tubo se adicionó con 200 µl de medio Optimem de Gibco®. Los tubos se dejaron a temperatura ambiente cinco minutos y luego se mezcló el contenido de los dos. Hecha la mezcla, ésta se incubó 25 min a temperatura ambiente y luego se colocó por goteo alrededor de toda la placa, la cual se incubó a 37 °C por cinco horas. Pasadas las cinco horas se cambió el medio por 2 ml de EMEM con 10% de SBF y se incubaron hasta completar las 24 horas post-transfección.

13. Western blot

Para observar las distintas proteínas a evaluar se realizaron ensayos de WB, siguiendo los pasos que se señalan a continuación:

Extracción de proteínas. Esta se hizo con amortiguador RIPA (**Anexo 1.8**) adicionado con 0.2% del coctel de inhibidores de proteasas EASYpack de Roche®. En hielo, los botones celulares se resuspendieron en 200 µl del buffer y se pasaron por una jeringa de insulina entre 15-20 veces. Los lisados se mantuvieron en el hielo durante 20 min y después se centrifugaron a 12 000 rpm durante 15 min. El sobrenadante con las proteínas se almacenó a -70 °C hasta su cuantificación.

Cuantificación. Una curva estándar de albúmina se cuantificó paralelamente que las muestras. Para las proteínas extraídas se agregaron 13 µl de RIPA para cada muestra a cuantificar y 2 µl del extracto proteico obtenido, en los pozos de una placa de 96. Luego se añadieron 300 µl de la solución de trabajo de ácido bicinconfílico con sulfato de cobre (**anexo 1.9**) a cada uno de los pozos (de la curva y de las muestras), se esperó la reacción colorimétrica y se leyó en un lector de Elisa a 570 nm.

Electroforesis de proteínas. Se prepararon geles de poliacrilamida al 10 y 15% (**Tabla 4.1 en anexo 4**) según el peso de las proteínas a observar. El marcador de peso molecular PageRuler Plus de Thermo Scientific® y las proteínas, se cargaron en la cantidad y orden deseado. Las muestras se corrieron con buffer de corrida 1X (**Anexo 1.12**), a un voltaje entre 80 y 110 volts.

Transferencia. La transferencia de las proteínas a una membrana, se hizo en una cámara semiseca, a 20 voltios durante 40 min. Los papeles filtro, el gel con las proteínas y la membrana (de nitrocelulosa con poro de 0.2 µm marca Bio-Rad®), se humedecieron en buffer de transferencia 1X frío (**Anexo 1.13**).

Bloqueo. La membrana de nitrocelulosa con las proteínas, se colocó en un recipiente y se cubrió completamente con buffer de bloqueo (**Anexo 1.14**). El recipiente se dejó en la plancha de agitación a TA de una hora a toda la noche, y luego se lavó con amortiguador TBS-T durante 10 min (**Anexo 1.3**) una vez.

Hibridación de anticuerpos. La membrana bloqueada y lavada, se cubrió con el anticuerpo primario específico señalado en el **anexo 5** y diluido en buffer para dilución de anticuerpos (**Anexo 1.15**). Se dejó toda la noche incubando en agitación a 4 °C. Luego se lavó con buffer TBS-T tres veces durante 15 min cada vez. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario necesario (**Anexo 5**) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente, en agitación. Finalmente se realizaron los tres lavados hechos para el primer anticuerpo.

Detección. Para poder observar las proteínas de interés, utilizamos el kit Immobilion Western de Millipore®. La solución de tinción se preparó mezclando partes iguales del luminol y el peróxido contenidos en el kit. Dicha solución se agregó a la membrana lavada y se dejó actuar durante un minuto. Luego se colocó en el escáner c-Digit™ y se reveló.

14. Generación de células HEK293 con expresión estable de E6WT, E6SM y E6*I

Células HEK293 fueron transfectadas, como se menciona en el apartado número 12 de los métodos, utilizando los plásmidos p3XFLAG-E6WT, p3XFLAG-E6SM y p3XFLAG-E6*I por separado. Durante 30 días, el medio y la geneticina (800 µg/ml) fueron cambiados cada 24 horas. La expresión de E6WT, E6SM y E6*I se evaluó por medio de RT-PCR y WB en las células sobrevivientes.

15. Inmunofluorescencia

Células HEK293 y HEK293 que expresan de forma estable E6WT, E6SM o E6*I fueron sembradas por separado en portaobjetos. Al día siguiente, se lavaron con buffer PBS-T (**Anexo 1.17**) y posteriormente se fijaron con la solución de paraformaldehído (**Anexo 1.16**) durante 15 minutos. Se hicieron tres lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno. Después de esto, el buffer de bloqueo para IF se colocó (**Anexo 1.19**) durante 1.30 horas. El anticuerpo primario anti- β -catenina se disolvió en buffer de bloqueo para IF, a la concentración indicada en el **anexo 5.1** y se dejó en una cámara húmeda, durante toda la noche, a 4 ° C. Al día siguiente, tres lavados con PBS-T fueron realizados, para posteriormente colocar el anti-cuerpo secundario Alexa 594, disuelto en buffer de bloqueo para IF (**Anexo 5.1**) durante 1.30 horas, en cámara húmeda, a temperatura ambiente y cubierto de la luz. Una vez lavadas nuevamente con PBS-T tres veces, se colocó una solución de DAPI diluido (1:200) durante 5 minutos a temperatura ambiente y se realizaron dos últimos lavados de 5 minutos con PBS-T. Finalmente las muestras fueron montadas utilizando medio de montaje ProLong[®] Gold antifade reagent y cubriéndolas con un cubreobjetos.

VII. RESULTADOS

Para poder realizar un análisis específico del papel de E6*1 en la vía de Wnt, era necesario observar las consecuencias de tres tratamientos distintos en las células a evaluar: 1) La expresión conjunta de E6 y E6*1; lo que se observa de manera natural en células infectadas con VPH-18 (Czegledy *et al.*, 1994; Pim, *et al.*, 2009), 2) La expresión sólo de E6 y 3) La expresión sólo de E6*1. Para esto se realizó la clonación de distintos fragmentos específicos.

1. Clonación de los fragmentos E6WT, E6SM y E6*1 de VPH-18 en el vector p3XFLAG-CMV-10

Todas las clonaciones se realizaron en el vector p3XFLAG-CMV-10 mostrado en la **figura 14** en el apartado de métodos. Para poder obtener a la proteína E6 completa, así como a su producto del procesamiento alternativo E6*1, se clonó la secuencia de E6WT que genera a ambas isoformas. Para que se expresara sólo la proteína E6*1, se clonó únicamente la secuencia de RNAm generada después del procesamiento alternativo; y para lograr una mayor expresión de la proteína E6 completa se clonó E6 splice mutant (E6SM). La secuencia nucleotídica para esta mutante es casi igual que la de E6WT, solo cambia el nucleótido 233 que en la secuencia WT corresponde a una guanina, pero en la mutante se cambia por una adenina, lo que disminuye drásticamente el splicing. La mutación correspondiente es silenciosa, ya que en el momento de la transcripción ambos tripletes codifican para ácido glutámico, generando proteínas idénticas.

A partir de la secuencia codificante para E6 de VPH-18, localizada en el compendio de VPH (<http://pave.niaid.nih.gov/lanl-archives/HPVcompintro4.html>, 1994), se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplificaran la totalidad del fragmento, además de un oligonucleótido antisentido extra, para la amplificación de E6*1 hasta su respectivo codón de paro. Como se muestra en la **figura 6.1 del anexo 6**, al realizarse el splicing de la secuencia completa, se genera un cambio en el marco de lectura y un nuevo codón de paro, localizado antes del de la secuencia completa.

Para insertar los fragmentos en el plásmido, se eligieron sitios de corte para dos enzimas presentes en el sitio de multiclonación (MCS) del plásmido (EcoRI y BglII). Ya que las

secuencias a clonar (E6WT, E6 SM y E6 *I) no poseen dichos sitios de corte, estos se agregaron al inicio y final de la secuencia usando los oligonucleótidos diseñados.

Se observó que el sitio de corte para EcoRI, presente en el MCS del plásmido (**Fig. 7.1 en anexo 7**), deja extremos cohesivos que al empalmar con nuestro fragmento cambiarían el marco de lectura y por tanto la secuencia de la proteína. Para solucionar el problema, se agregó un nucleótido (A) terminando el sitio de corte para EcoRI en la secuencia del oligonucleótido “sentido”, conservando así el marco de lectura adecuado (**Fig. 15**).

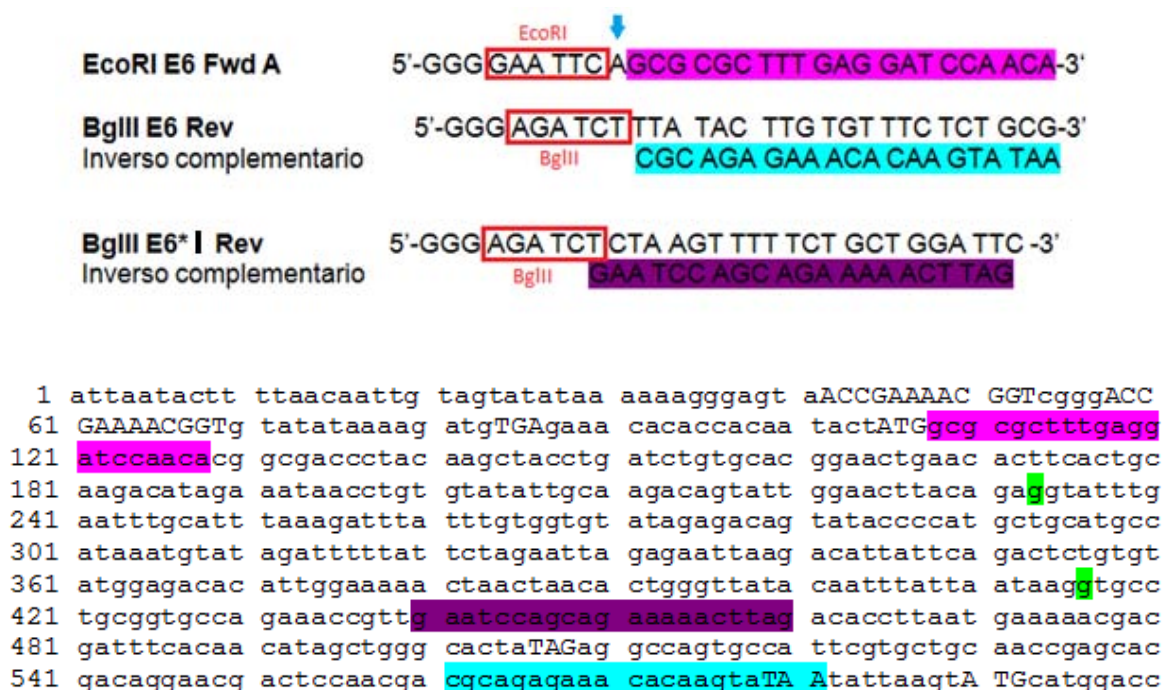


Figura 15. Oligonucleótidos diseñados y secuencia codificante para la proteína E6 de VPH-18. Podemos observar tanto el oligonucleótido sentido como los dos antisentido, para el fragmento completo y para E6*I. Se muestran los sitios de restricción agregados a cada uno de los primers, además de una adenina para la corrección del marco de lectura en el oligo sentido. Con verde se resaltan los sitios donador y aceptor de splicing.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento E6SM fueron los mismos que para E6WT.

En la **figura 16** se muestra un esquema del diseño de las restricciones en los fragmentos y el vector con EcoRI y BglIII, donde se puede ver el orden de los cortes y la orientación en la que quedarán las secuencias a clonar.

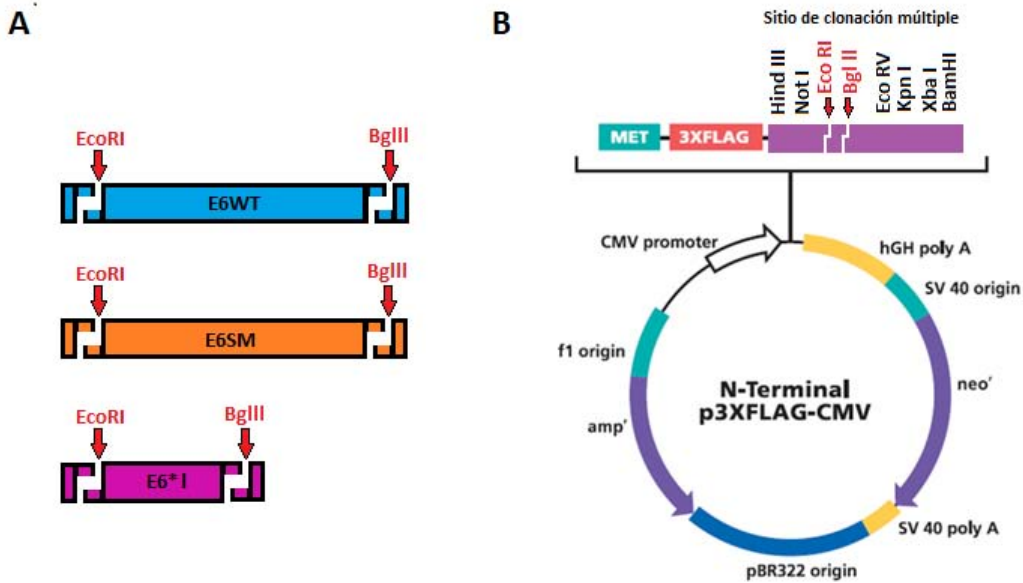


Figura 16. Sitios de corte para EcoRI y BglIII. En la figura se esquematizan los sitios de corte para las enzimas de restricción en los amplificadores E6WT, E6SM y E6*I, así como en el plásmido p3XFLAG-CMV10.

Los fragmentos fueron amplificados con los oligonucleótidos diseñados como se describe en el apartado de materiales y métodos. Cuando se tuvieron listos los tres distintos amplificadores a clonar, se procedió a la restricción de cada uno de éstos y del vector p3XFLAG-CMV 10 con EcoRI y BglIII. Los resultados se observan en la **figura 17**.

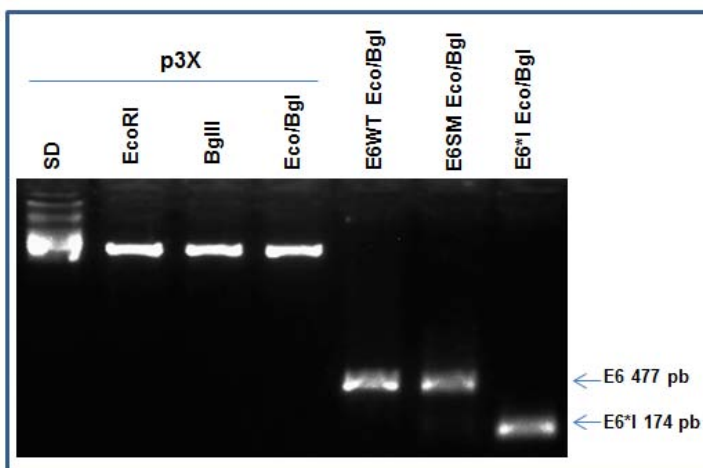


Figura 17. Restricciones de los insertos y el plásmido con EcoRI y BglIII. Del carril 2 al 5 se muestra el vector, sin digerir (SD), sólo con EcoRI, sólo con BglIII y con ambas enzimas. Los carriles 6, 7 y 8 corresponden a las digestiones de los tres fragmentos con las dos enzimas.

Una vez digerido el plásmido y cada uno de los fragmentos, ambos fueron ligados. En la **figura 18** se muestra un esquema de cómo quedan las construcciones una vez ligadas y el nombre que se le dio a cada una de ellas.

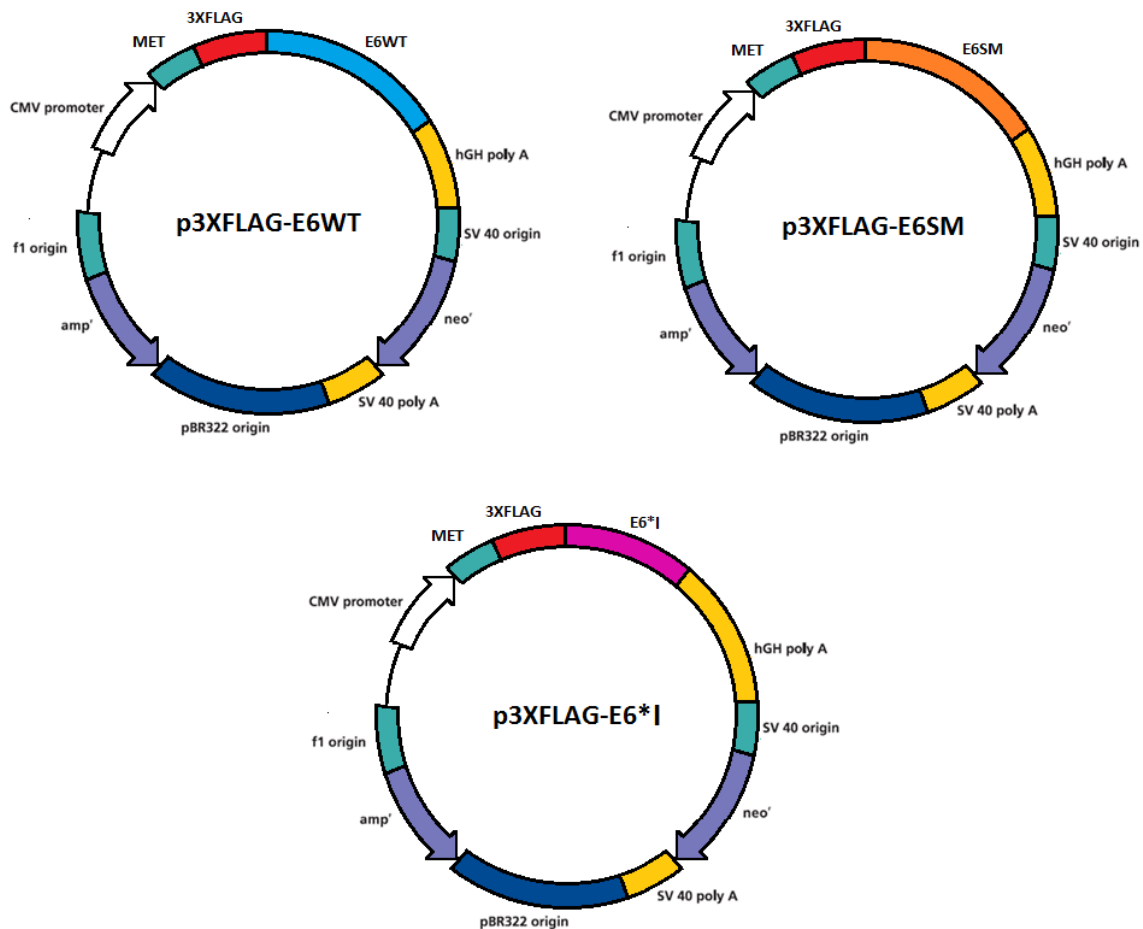


Figura 18. Construcciones obtenidas. Se esquematizan las tres construcciones realizadas con base en el plásmido p3XFLAG-CMV10. Después de la ligación del vector con los insertos E6WT, E6SM y E6*I se obtuvieron las construcciones: p3XFLAG-E6WT, p3XFLAG-E6SM y p3XFLAG-E6*I.

Las tres construcciones así como el plásmido vacío, fueron transformados en bacterias DH5 α competentes por cloruro de calcio, que se plaquearon en LB-agar con ampicilina como antibiótico de selección.

De las colonias obtenidas para cada una de las construcciones se resembraron 3 del vector vacío, 5 de E6WT, 3 de E6SM y 4 de E6*I. A dichas resiembras se les hizo una PCR de colonia. Para p3X no se obtuvo amplificado alguno, cuatro de las cinco colonias con p3Xflag-E6WT amplificaron el fragmento en el tamaño esperado y una más grande, por lo que ésta fue descartada para continuar con el proceso. Para E6SM hubo tres colonias con el amplificado en 477 pb y las cuatro colonias con E6*I tuvieron el fragmento de 147 pb correspondiente. Los resultados se muestran en la **figura 19**.

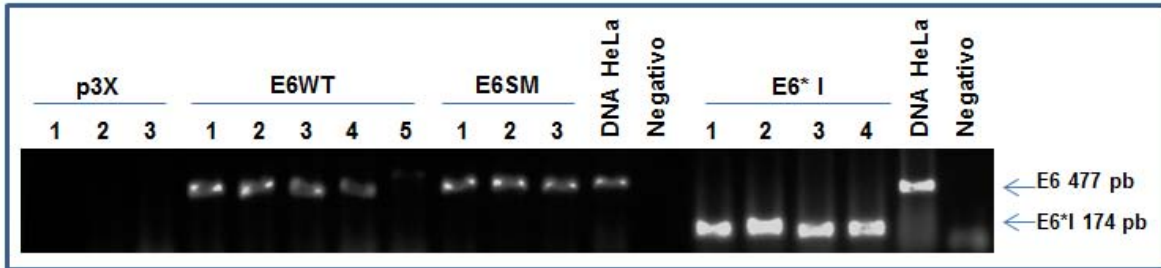


Figura 19. PCR de colonia. A partir de las resiembras de colonias transformadas resistentes a ampicilina se hizo una PCR para amplificar E6WT, E6SM o E6*I.

De las colonias positivas, que contenían el fragmento en el peso deseado, se eligió una de cada construcción, para extraer el plásmido con el procedimiento y a descrito. Ya que se habían extraído los plásmidos, éstos se verificaron por PCR (Fig. 20 A) y luego por liberación de inserto con las dos enzimas utilizadas para clonar (Fig. 20 B).

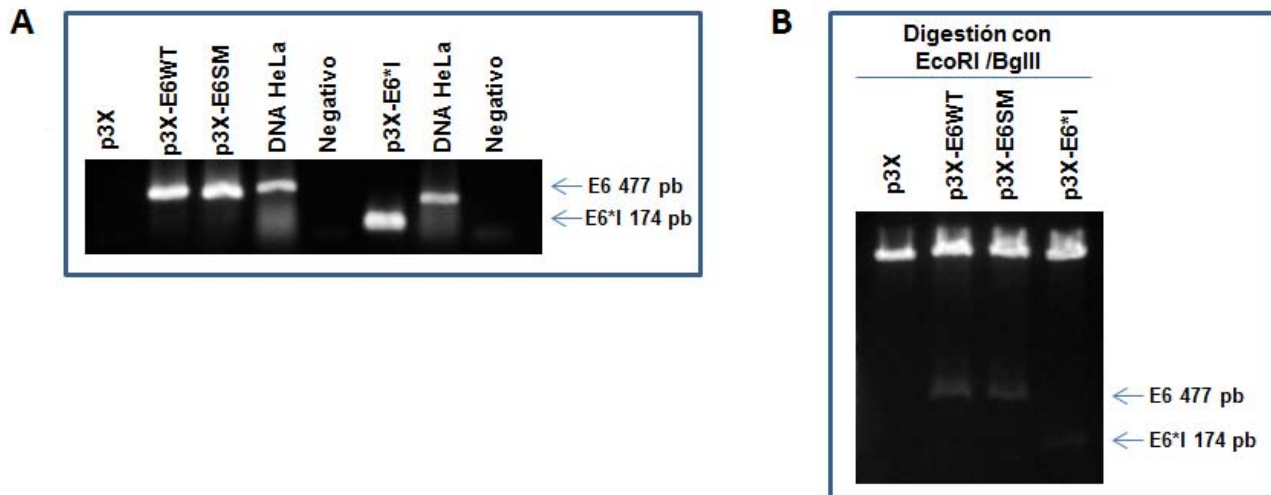


Figura 20. Verificación de la clonación de fragmentos. A) PCR a partir del DNA plasmídico obtenido por Miniprep de las colonias transformantes. Se pueden ver los amplificadores para cada construcción en los pesos correctos, 477 pb para E6WT y E6SM y 174 pb para E6*I. B) Liberaciones de inserto a partir de las construcciones obtenidas. Cada uno de los plásmidos purificados fue digerido con las dos enzimas con las que se realizó la clonación. En la imagen se muestra la liberación de insertos en los pesos de E6 y E6*I.

Para corroborar que los fragmentos clonados estuvieran en marco y que las secuencias fueran correctas, los plásmidos p3XFLAG-E6WT, p3XFLAG-E6SM y p3XFLAG-E6*I fueron secuenciados usando el servicio de secuenciación de la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias obtenidas se muestran en la

figura 9.1 del anexo 9. Los resultados comprobaron que las secuencias son las adecuadas para generar las proteínas E6, E6*I o ambas, dependiendo del plásmido que se utilice.

2. Expresión de las proteínas E6 y E6*I en células HEK293

Células HEK293 fueron transfectadas con las tres construcciones realizadas, así como con el vector vacío por separado. 24 horas post-transfección, las células fueron recogidas y se extrajeron tanto lisados proteicos como RNAm totales. La presencia de transcritos codificantes para E6 y E6*I se observó mediante RT-PCR (**Fig. 21 A**), y la expresión de las proteínas se vio por Western blot (WB) (**Fig. 21 B**) utilizando un anticuerpo anti-FLAG. En cada transfección además de la construcción de interés, se transfectó el plásmido p3XFLAG-BAP, que en los ensayos se utilizó como un control de carga y transfección. Este plásmido codifica para una fosfatasa al calina bacteriana no funcional en eucariontes, ligada a los mismos epítopes FLAG presentes en el vector vacío.

A nivel de transcrito, pudimos observar distintos patrones entre la cantidad de RNAm para E6 y E6*I. En el caso de las células transfectadas con p3XFLAG-E6WT, se observó mayor cantidad del transcrito para E6*I que para E6, mismo patrón que se presenta en transcritos de células HeLa, las cuales poseen DNA de VPH-18 insertado en su genoma. En el caso de E6SM logramos ver también transcrito de ambos fragmentos, pero la cantidad de RNAm para E6 fue mucho mayor que la observada en E6WT. Para E6*I se corroboró la presencia única del transcrito para esta isoforma. En la **figura 21** podemos observar dos tamaños tanto para E6 como para E6*I, lo que depende del par de primers que se haya utilizado en cada caso. Cuando se usan los oligonucleótidos para amplificar a E6 completo, es posible detectar al producto de splicing, pero el tamaño es mayor de lo esperado para E6*I (296 vs. 174 pb), pues se amplifica desde el inicio (igual para ambas proteínas) hasta el codón de paro para E6, que no es el mismo que utiliza E6*I y se encuentra río abajo de él (**Fig. 6.1 en anexo 6**). Un caso parecido es el que encontramos cuando se amplifica el RNAm codificante de E6, con el par de primers diseñados para E6*I, donde se amplifica un fragmento de E6 que termina antes del codón de paro específico para la proteína completa.

Cabe mencionar que hasta el momento sólo en pocos artículos se ha logrado mostrar una buena expresión de la proteína E6 de VPH-18 y son aún menos en los que han visto a la

isoforma E6*I. En este estudio detectamos a las proteínas E6 y E6*I mediante el epítipo FLAG presente en las proteínas recombinantes. Al realizar el ensayo de WB se vio una coincidencia entre los patrones observados para el RNAm y los detectados a nivel proteico. Resulta interesante que aún cuando en las transfecciones con E6SM se observa al RNAm correspondiente a E6*I, la presencia de la proteína fue poco evidente o nula en el WB.

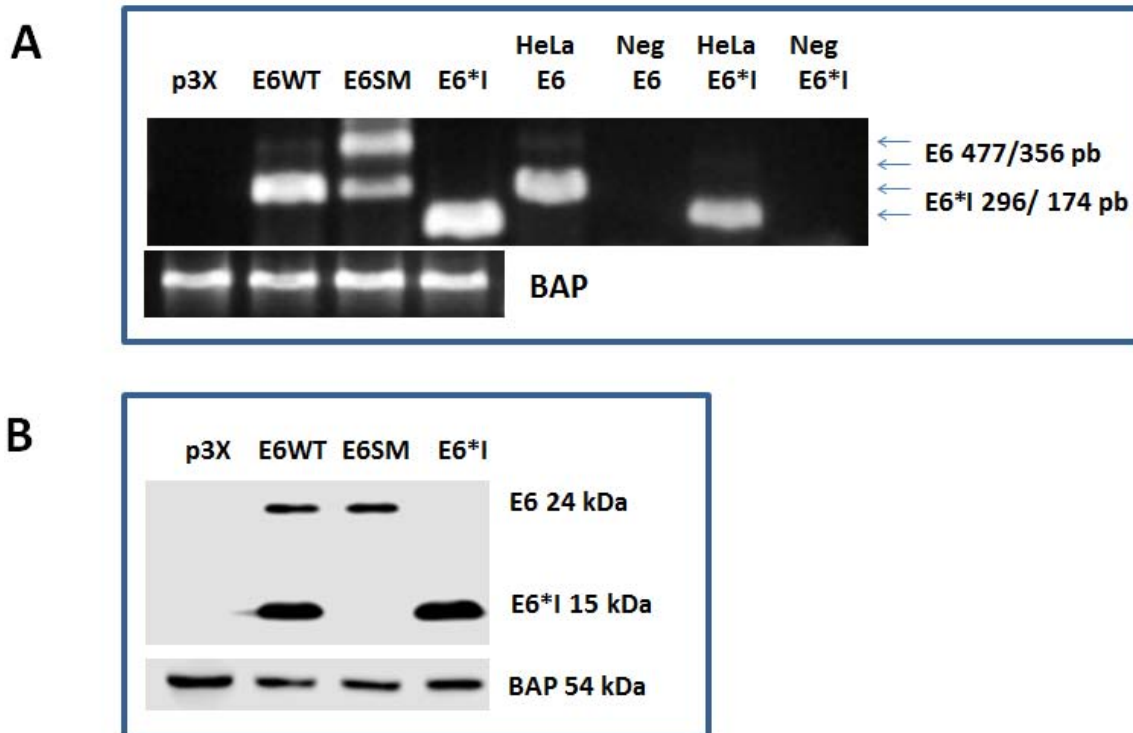


Figura 21. Transcritos y expresión proteica de E6 y E6*I en lisados de células HEK293 transfectadas (24 hr) con p3xFLAG-CMV-10, p3xFLAG-E6WT, p3xFLAG-E6SM y p3xFLAG-E6*I. A) RT-PCR. Se muestran los transcritos de ambos fragmentos. B) WB. Se observan los patrones de expresión de ambas proteínas en las distintas transfecciones. El control de transfección y carga en ambos casos fue BAP.

Como podemos ver, el plásmido p3XFLAG-CMV-10 fue de gran utilidad para la clonación del gen de E6WT y las modificaciones de éste. Sus epítopos FLAG representaron una herramienta eficiente en la detección de las proteínas E6 y E6*I, que se expresaron con el patrón esperado en células HEK293.

3. Degradación de p53 por la proteína E6

Cuando E6 se une a la ubiquitin ligasa E6AP, es capaz de enviar a degradación a la proteína p53, por lo que actualmente p53 es un blanco bien conocido de E6 ([Revisado en Narisawa y Kiyono, 2007](#); [Thomas, et al., 1999](#)). Para corroborar la actividad de la proteína E6 observada en nuestros ensayos, evaluamos los niveles de p53 en los distintos tratamientos utilizados (**Fig. 22**).

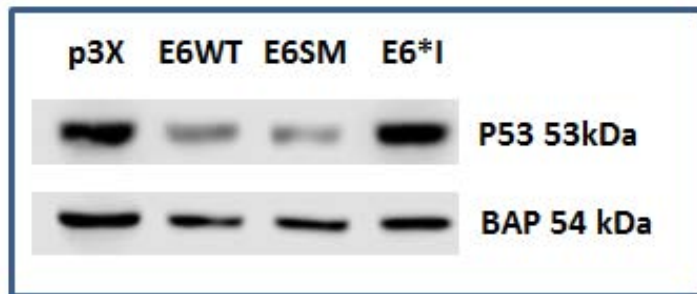


Figura 22. Niveles de p53 en proteínas totales de células HEK293 transfectadas (24 hr) con p3xFLAG-E6WT, p3x FLAG-E6SM y p3xFLAG-E6*I. Podemos observar la disminución de los niveles de p53 en las células donde se expresa sólo E6 o E6 y E6*I, pero no donde sólo hay E6*I.

En los resultados generados a partir del WB se observaron niveles disminuidos de p53 en presencia de E6. Cuando las células eran transfectadas con E6SM, y por tanto se tenía una mayor cantidad de E6 que de E6*I, la degradación de p53 es mayor que cuando la isoforma pequeña está presente de forma abundante. La proteína pequeña, producto del splicing alternativo, no mostró degradación del blanco evaluado.

4. Efecto de las proteínas E6 y E6*I sobre blancos de la vía de Wnt

Se realizó un ensayo para observar los niveles de β -catenina, proteína blanco de la vía canónica de Wnt. Los resultados muestran un aumento en los niveles de β -catenina cuando las células HEK293 se transfectaron con E6WT, E6SM y E6*I, en relación con la cantidad de proteína observada en la ausencia de E6 o E6*I (**Fig. 23 A**). En E6WT, ambas isoformas de E6 (completa y pequeña), parecen sinterizar el aumento de la proteína β -catenina (**Fig. 23 B**).

En el caso de los niveles proteicos de c-Jun, la cantidad de esta proteína se ve elevada cuando está presente E6, y a sea solo o en combinación con E6*I, pero no aumenta en cuando solamente se encuentra E6*I (**Fig. 23 C**).

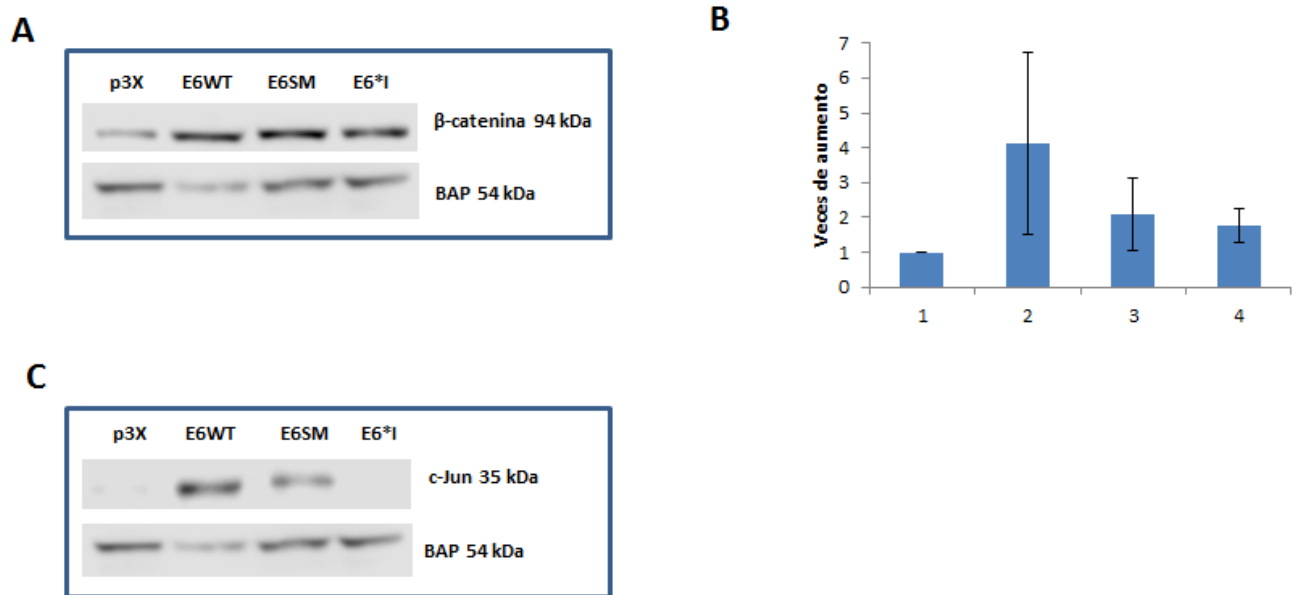


Figura 23. Niveles de β -catenina y c-Jun en lisados proteicos totales de células HEK293 transfectadas (24 hr) con p3xFLAG-E6WT, p3xFLAG-E6SM y p3xFLAG-E6*I. A) Se observa el aumento en los niveles de β -catenina cuando se transfecta cualquiera de las combinaciones de E6-E6*I. B) Densitometría que muestra una tendencia en el aumento de β -catenina cuando está presente E6, E6*I, o ambas. Un mayor aumento de β -catenina se observa cuando hay ambas isoformas. C) Aumento de c-Jun sólo cuando está presente la proteína completa.

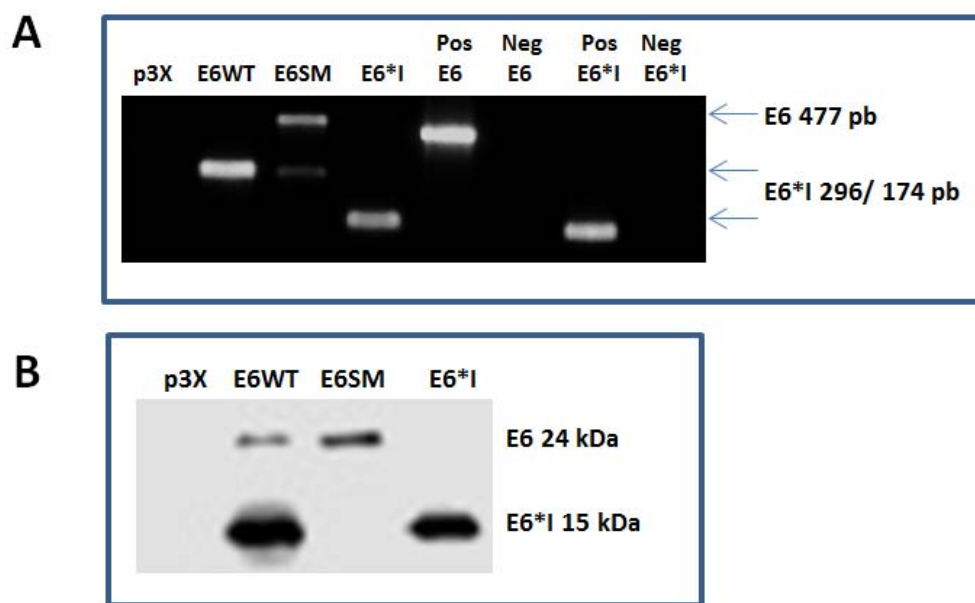


Figura 24. Expresión estable de E6WT, E6SM y E6*I en células HEK293. A) RT-PCR donde se muestra la presencia de transcritos para cada una de las proteínas. B) WB que evidencia la presencia de las proteínas.

5. Localización de β -catenina en presencia de E6WT, E6SM y E6*I

Una vez que comprobamos el efecto de las proteínas E6 y E6*I de VPH-18 sobre los niveles de β -catenina, quisimos averiguar si la localización de β -catenina se modificaba en presencia de las proteínas virales.

Para observar esto, realizamos ensayos de inmunofluorescencia en líneas de células HEK293 que expresan de manera estable E6WT, E6SM o E6*I; donde la expresión de las proteínas del virus se corroboró mediante RT-PCR y WB (**Fig. 24 A y B** respectivamente).

Los resultados de las inmunofluorescencias, utilizando un microscopio de epifluorescencia, pueden observarse en la **figura 25**. En las células HEK293 que no expresan a ninguna de las proteínas virales, β -catenina tienen una localización mayoritariamente membranar y citoplasmática. Todas las células que expresan E6WT, E6SM o E6*I, muestran a β -catenina ubicada principalmente en el citoplasma y en los casos en los que está presente E6 también en el núcleo. Esta localización nuclear en los casos en que está presente E6, es mayor cuando está E6SM (expresión mayoritaria de E6). En presencia de E6*I, se observaron campos con β -catenina nuclear, aunque la mayoría de las células la presentaban más en el citoplasma.

En todas las células con expresión de E6, E6*I o ambas, se observaron cambios en la morfología de las células.

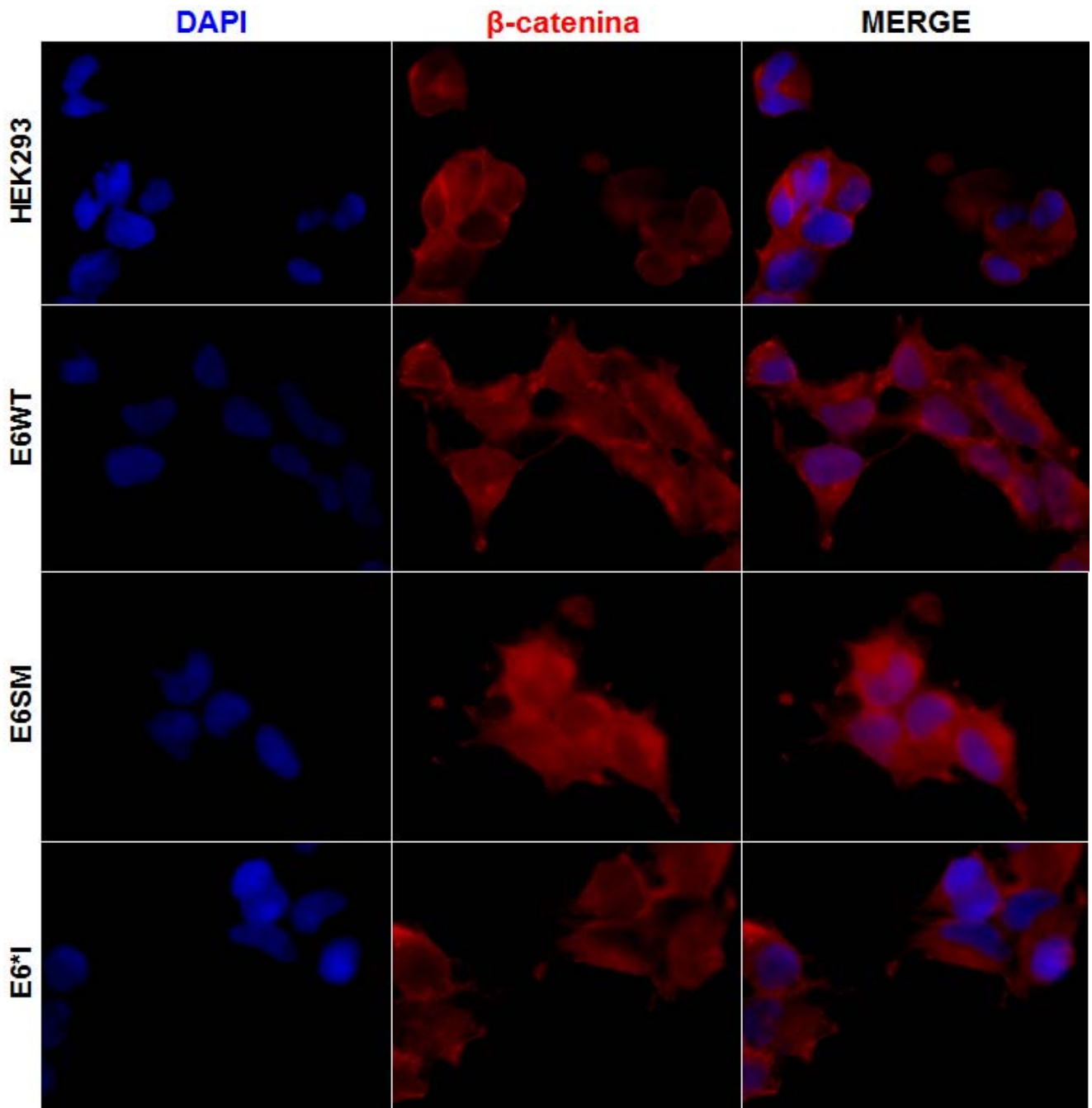


Figura 25. Inmunofluorescencias con microscopía de epifluorescencia en células HEK293 con expresión estable de E6WT, E6SM o E6*I. En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI y en rojo la proteína β -catenina endógena.

VIII. DISCUSIÓN

La actividad oncogénica de las proteínas E6 y E7 de los VPH-AR, ha sido ampliamente estudiada (**Revisado en Mantovani y Banks, 2001; Moody y Laimins, 2010; Narisawa y Kiyono, 2007**). Sin embargo, poco se conoce de la actividad del producto de procesamiento alternativo E6*I. La abundante presencia de E6*I en muestras de cáncer cervicouterino y en líneas celulares derivadas del mismo (**De la Cruz, et al., 2005; Vázquez, et al., 2013**), han motivado el estudio de los efectos de esta proteína en las vías relacionadas con la transformación celular. La capacidad de E6*I para unirse a E6 y E6AP (**Pim, et al., 1997**) y su efecto en la degradación o activación de ciertas proteínas involucradas en procesos de apoptosis, proliferación y adhesión celular (**Pim, et al., 2009; Manzo, et al., 2014**), sugieren que E6*I podría intervenir en la regulación de la proteína E6 completa o realizar funciones independientes a E6, que de alguna forma modularán ciertas vías de señalización involucradas en la transformación celular.

La vía de Wnt se ha observado alterada en cáncer cervicouterino; donde β -catenina aumenta tanto en citoplasma como en núcleo a medida que va avanzando la lesión (**Üren, et al., 2005; Rodríguez, et al., 2005**). De esta manera β -catenina se ubica en la membrana del tejido normal de cérvix, mientras que en las displasias comienza a observarse también en citoplasma y en cáncer invasor, principalmente en el núcleo. La participación de la proteína E6 de VPH-16 en la vía de Wnt se ha estudiado previamente (**Lichtig, et al., 2010**). Sin embargo, en esta vía no se conoce el efecto de E6 de VPH-18, que en México se encuentra entre los primeros lugares en frecuencia de los tipos de VPH presentes en cáncer de cérvix (**Carrillo, et al., 2014**) y que presenta un peor pronóstico en etapas tempranas (**Burger, et al., 1996**). Por otra parte, dado que E6*I se encuentra en una elevada proporción en los carcinomas, también resulta relevante determinar el papel específico de esta proteína en la vía de Wnt.

En el presente trabajo evaluamos si la presencia de la proteína E6 o E6*I de VPH-18 tienen un efecto en la vía canónica de Wnt. Para cumplir con este objetivo, no sólo observamos la consecuencia de expresar a E6*I, la isoforma pequeña de E6, sino también el efecto de la expresión de la proteína completa, generada a partir de un transcrito que realiza un

procesamiento alternativo de E6 (E6SM), así como de la combinación de ambas isoformas generadas por E6WT, en tratamientos separados.

En nuestro modelo de estudio E6SM representa una importante herramienta para estudiar el efecto específico de la proteína E6 completa. Esto se debe a que si bien en las células transfectadas con esta mutante se observa la expresión tanto del transcrito E6*I como E6 completo, la forma completa aumenta considerablemente su proporción, en relación a los transcritos observados en las células con E6WT. Cabe resaltar que a nivel de proteína, sólo se observa la forma completa en las células con E6SM, mientras que E6 y E6*I se expresan en las células transfectadas con E6WT. Como es de esperarse en las células transfectadas con E6*I, sólo se observa este producto de 10 kDa.

La degradación de p53 resultó una buena prueba de la funcionalidad de E6, dado que la presencia mayoritaria de la proteína E6 en la mutante E6SM llevó a una mayor degradación de p53 que cuando estaba E6*I acompañando a E6 completo en las células con E6WT. Por su parte, E6*I no tuvo ningún efecto en los niveles de p53, lo cual era de esperarse dado que se sabe que aún cuando puede unirse a p53, no lleva a su degradación.

En primera instancia, observamos un aumento evidente en los niveles de la proteína c-Jun, cuyo gen es blanco transcripcional de la vía de Wnt, en presencia tanto de E6SM como de E6WT (**Fig. 23**). Sin embargo, el aumento de c-Jun parece deberse al efecto del producto completo de E6 y no a E6*I, ya que cuando sólo está presente la isoforma pequeña no hay ningún efecto en los niveles proteicos de c-Jun. Para ver que este aumento en la proteína blanco de la vía de Wnt, es consecuencia del incremento en la transcripción del gen que la codifica, y por tanto en la actividad transcripcional de los factores río abajo en Wnt (TCF/LEF), se requieren ensayos de PCR en tiempo real con sondas Taqman específicas para la amplificación y detección de los transcritos codificantes de c-Jun. Para entender los mecanismos que intervienen en el aumento de la proteína c-Jun por efecto de los productos de E6, los respectivos plásmidos de expresión se podrían cotransfectar con los plásmidos FOP y TOP-Flash; los cuales contienen sitios de unión al factor TCF y secuencias de unión mutadas, respectivamente, ambas acopladas al gen de luciferasa. Este ensayo mostraría si la actividad transcripcional ligada a TCF, se ve aumentada en presencia de la proteína E6 de VPH-18, caso que se ha verificado en presencia de E6 de VPH-16 ([Lichtig, et al., 2010](#)).

El aumento observado en c-Jun se ha evidenciado en estudios anteriores cuando está presente E6 de VPH-16 (de Wilde, *et al.*, 2008). La relación entre la sobre-regulación de esta proteína y el desarrollo de carcinomas está demostrada desde hace tiempo (Szabo, *et al.*, 1996), pero el aumento dependiente de la proteína E6 del VPH-18, presente en aproximadamente la mitad de los adenocarcinomas de cérvix en México, aún no se ha estudiado, lo que da relevancia a los resultados encontrados hasta ahora.

Otro resultado obtenido, que no había sido descrito en estudios previos, es que los niveles de β -catenina aumentan en presencia tanto de E6 como de E6*1 (Fig. 23 A y B). Es muy interesante que la cantidad del co-activador transcripcional β -catenina aumente en todos los tratamientos, habiendo observado que c-Jun se incrementa exclusivamente cuando la proteína E6 completa está presente. Estos patrones distintos en la expresión de c-Jun y β -catenina cuando está presente E6 o E6*1, nos llevan a pensar que probablemente el aumento y posterior regulación de β -catenina, se dé por diferentes mecanismos cuando se expresa una u otra de las proteínas de VPH-18.

Entonces, de estos resultados surge un primer cuestionamiento: ¿Cómo puede E6 aumentar la cantidad de β -catenina y llevar a la transcripción de c-Jun? Ciertas evidencias pueden ayudar a contestar esta pregunta: a) Cuando las proteínas E6 de los VPH-16, 18 y 31 son fosforiladas por Akt o PKA pueden unirse a la proteína maestra 14-3-3, dicha unión estabiliza a la oncoproteína viral (Boon y Banks, 2013). b) Por su parte, 14-3-3 se une a las proteínas YAP/TAZ (Basu, *et al.*, 2003; Kanai, *et al.*, 2000), componentes esenciales de la vía de señalización Hippo, lo que promueve su localización en el citoplasma. c) El complejo YAP/TAZ se ha encontrado unido al complejo de degradación de β -catenina por medio de Axina y tiene un papel muy importante en la unión de la ubiquitin ligasa β -TrCP (Azzolin, *et al.*, 2014). Ya que E6 de VPH-18 puede unirse a 14-3-3, podríamos pensar un mecanismo en el que E6 interactúe con el complejo YAP/TAZ, lo que podría separarlas del complejo de degradación, impedir la unión de β -TrCP y por lo tanto, la ubiquitinación y posterior degradación de β -catenina. De esta manera β -catenina sería capaz translocarse al núcleo y llevar a la transcripción de genes blanco de la vía de Wnt, como es el caso de c-Jun.

Cabe recalcar que uno de los hallazgos más interesantes es el aumento de β -catenina en células que expresan sólo E6*1, lo que podría parecer contradictorio con los niveles bajos de c-Jun observados en la misma transfección. Hasta este punto, estos efectos sugerían que

probablemente la localización de β -catenina sea distinta en presencia de E6 o de E6*1, por lo que observamos la localización de β -catenina mediante inmunofluorescencia, para comprobar esta hipótesis.

Los resultados mostraron que la localización de β -catenina si es distinta en las células que expresan la isoforma pequeña o completa de E6 de VPH-18 (**Fig. 25**). En las inmunofluorescencias se observa el aumento de β -catenina en el citoplasma y en algunos casos también en núcleo, cuando las células HEK293 expresan de manera estable a las proteínas E6WT o E6SM. El aumento de β -catenina en el núcleo es mayor cuando únicamente está la proteína E6 (E6SM), caso contrario a lo observado en las transfecciones transitorias, donde la presencia de E6 y E6*1 en E6WT mostraba un aumento mayor de β -catenina. Esto puede deberse al efecto crónico o agudo en células con expresión estable o transitoria, respectivamente, de proteínas exógenas. Cuando estaba solo E6*1, se observaron casos contradictorios, pues algunas células parecían tener localización nuclear de β -catenina aunque la mayoría la mantenía en el citoplasma. Aunque serían necesarios ensayos de microscopía confocal y fraccionamiento celular para corroborar la localización de β -catenina, los experimentos hechos nos dan indicios de la ubicación de esta proteína.

Tomando en cuenta estos resultados, E6 podría llevar a la translocación nuclear de β -catenina, como se observa en la activación de la vía por ligando Wnt (**Fig. 13B**) y por tanto, llevar a la activación de los factores de transcripción TCF/LEF y el aumento de los genes blanco. Mientras tanto, E6*1 podría generar un mecanismo distinto que influyera en el aumento de β -catenina, pero no en la translocación de la misma al núcleo, manteniéndose por tanto los niveles basales de c-Jun.

Es difícil pensar en un modelo que explique el incremento en los niveles de β -catenina en presencia de E6*1, ya que los efectos de esta isoforma de E6 son muy poco conocidos. Dado que E6*1 se ha involucrado en la degradación de algunas proteínas de la familia MAGUK como Dlg, Scribble, etc. (**Pim, et al., 2009**) y que la unión de Dlg con APC (proteína que integra el complejo de degradación de β -catenina) juega un importante papel en el bloqueo de la progresión celular (**Ishidate, et al., 2000**), podemos pensar que la posible disminución de Dlg por E6*1 modula la actividad supresora de tumores de APC, liberando a β -catenina del complejo de degradación y por tanto incrementando sus niveles. Además, una vez que β -catenina se haya liberado del complejo, la proteína citoplasmática sería capaz de degradar el

Dlg restante (**Subbaiah, et al., 2012**), generando una disociación del complejo potenciada por la β -catenina liberada.

Siguiendo con este razonamiento ¿Dónde radicaría la diferencia para que β -catenina se transloque o no en presencia de E6 completo o E6*I? Recientemente se ha demostrado que β -catenina puede unirse a IQGAP1 y a Dvl2 formando un complejo, que mediante IQGAP1 se une a importina- β 5, permitiendo la translocación de todo el complejo al núcleo celular (**Goto, et al., 2013**). A su vez IQGAP1 se une a pERK-1/2, la cual aumenta en presencia de E6 completo (**Contreras, et al., 2009**). A la fecha no se conocen interacciones de E6*I con ninguna de las proteínas involucradas en la translocación al núcleo de β -catenina, pero la presencia nuclear tanto de E6 como de E6*I ha sido demostrada (**Vaeteewoottacharn, et al., 2005; Manzo, et al., 2014**), por lo que alguna interacción o modulación de la translocación de β -catenina en el núcleo es posible por estas proteínas virales. Para obtener más información sobre qué proteínas interactúan con E6 y E6*I de VPH-18 se deberán realizar ensayos de co-inmunoprecipitación.

Otra alternativa, es que E6*I promueva la expresión de β -catenina y su translocación al núcleo, pero que no pueda unirse al factor transcripcional TCF. Es decir, que E6*I no impida la translocación total de β -catenina al núcleo, sino la interacción con el complejo TCF/LEF.

Por otro lado, en los ensayos de inmunofluorescencia se observó una evidente modificación en la morfología de las células cuando estaban presentes las proteínas E6 o E6*I, mostrando que pueden estar relacionadas en la pérdida de uniones célula-célula o de la polaridad celular. Anteriormente se ha relacionado a E6 (**Kranjec y Banks, 2011; Facciuto, et al., 2014**) y a E6*I (**Pim, et al., 2009; Storrs y Silverstein, 2007**) con la degradación de proteínas que intervienen en uniones celulares y en polaridad celular, por lo que estudios en los que se evalúen estas características podrían ser importantes.

Aun se necesita mucha evidencia que soporte o refute las ideas planteadas. Por tanto, sería interesante realizar ensayos de microarreglos de expresión y estudios de proteómica, transfectando los mismos plásmidos utilizados en este trabajo (p3XFLAG-E6WT, -E6SM y -E6*I de VPH-18) en distintas líneas celulares, lo que nos dará un panorama más amplio de los procesos en los que se encuentren relacionadas estas proteínas.

El conocimiento de las funciones de las distintas proteínas del VPH ayudará al entendimiento de la enfermedad y al diseño de estrategias encaminadas a un mejor diagnóstico y tratamiento.

IX. CONCLUSIONES

En células HEK293:

- El vector p3x FLAG-CMV10 resulta una eficiente herramienta para la clonación y expresión de las proteínas E6 y E6*1 de VPH-18, que pueden ser identificadas por los epítopes FLAG.
- La presencia mayoritaria de la proteína E6 en la mutante E6SM conlleva a una mayor degradación de p53 que cuando se encuentra E6*1 acompañando a E6 en E6WT.
- La proteína E6 aumenta los niveles proteicos de c-Jun en ausencia o presencia de E6*1.
- Los niveles de β -catenina son aumentados tanto por E6 como por E6*1, aun cuando esta última no aumenta los niveles de c-Jun.
- La localización de β -catenina se ve modificada por la presencia de E6, E6*1 o ambas.
- Cuando se expresan E6, E6*1 o ambas, la morfología de las células cambia drásticamente.

X. PERSPECTIVAS

En este trabajo sería importante determinar el efecto de E6 y E6*1 sobre otros blancos de la vía de Wnt como son Ciclina D1, c-Myc y c-Fos, tanto a nivel de proteína por WB, como de transcrito mediante ensayos de PCR en tiempo real. Dichos experimentos permitirían observar si la regulación de los niveles de c-Jun, a nivel de proteína, es un evento único o ligado a la actividad transcripcional de TCF.

Si existe una regulación sobre los niveles de transcritos y proteínas, mediada por E6 o E6*1 de VPH-18, deberemos mostrar si esta modulación verdaderamente está ligada al factor transcripcional TCF, lo que podría hacerse utilizando un plásmido reportero con sitios de unión a TCF.

Aunque las inmunofluorescencias utilizando microscopía de epifluorescencia nos dan un acercamiento de la localización de β -catenina en presencia de las proteínas virales, es importante confirmar esta localización realizando fraccionamiento celular e inmunofluorescencia confocal.

Llevar a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación, nos ayudaría a elucidar los mecanismos involucrados en la regulación de β -catenina, observando si E6 o E6*1 son capaces de interactuar con proteínas involucradas en la degradación o translocación de β -catenina, así como en la activación o represión de TCF.

XI.BIBLIOGRAFÍA

1. Artículos consultados

1. **Adam E., Z. Berkova, Z. Daxnerova, J. Icenogle, W C. Reeves y R H. Kaufman.** 2000. Papillomavirus detection: demographic and behaviorl characteristics influencing the i dentification of cervical disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 182 (2): 257-264.
2. **Ajiro M., R. Jia, L. Zhang, X. Liu, y Z. Zheng.** 2012. Intron Definition and a Branch Site Adenosine at nt 385 Control RNA Splicing of HPV16 E6* and E7 Expression. *PLOS ONE.* 7(10):1-15.
3. **Amin N. y E. Vincan.** 2012. The Wnt signaling pathways and cell adhesión. *Frontiers in Bioscience.* 17: 784-804.
4. **Amita M., G. Sudeep, W. Rekha, K. Yogesh y T. Hemant.** 2005. Brain metastasis from cervical carcinoma. A case report. *Medscape general medicine.* 5;7(1):26.
5. **Anastas J. y R. Moon.** 2013. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cáncer. *Nature Reviews.* 13:11-26.
6. **Azzolin L., T. Panciera, S. Soligo, E. Enzo, S. Bicciato, S. Dupont, S. Bresolin, CH. Frasson, G. Basso, V. Guzzardo, A. Fassina, M. Cordenonsi y S. Piccolo.** 2014. YAP/TAZ Incorporation in the β -Catenin Destruction Complex Orchestrates the Wnt Response. *Cell.* 158:157-170.
7. **Baarsma H., M. Königshoff y R. Gosens.** 2013. The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: Molecular mechanisms and pharmacological targets. *Pharmacology & Therapeutics.* 138: 66-83.
8. **Band V., S. Salal, L. Delmolino y EJ. Androphy.** 1993. Enhanced degradation of p53 protein in HPV-6 and BPV-1 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *EMBO Journal.* 12(5):1847-1852.
9. **Barker, N., A. Hurlstone, H. Musisi, A. Miles, M. Bienz y H. Clevers.** 2001. The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with β -catenin to promote target gene activation. *EMBO Journal.* 20(17):4935-4943.

10. **Basu S., N. Totty, M. Irwin, M. Sudol y J. Downward.** 2003. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Molecular Cell*. 11(1):11-23.
11. **Baudu A., J.L. Prétet, D. Riethmuller, M. Chotard, C. Mougin y M. Mercier.** 2014. Prevalence and risk factors of human papillomavirus infection types 16/18/45 in a cohort of French females aged 15-23 years. *Journal of epidemiology and global health*. 4(1):35-43.
12. **Bernard.** 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*. 32 Suppl 1:S1-6.
13. **Bernard H., R. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. zur Hausen y E. de Villiers.** 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 401(2010):70-79.
14. **Bernard E., M. Pons-Salort, M. Favre, I. Heard, E. Delaricque-Astagneur, D. Guillemot y A. Thiébaud.** 2013. Comparing human papillomavirus prevalences in women with normal cytology or invasive cervical cancer to rank genotypes according to their oncogenic potential: a meta-analysis of observational studies. *BMC Infectious Diseases*. 13(1):1-11.
15. **Bergant M. y L. Banks.** 2013. SN17 facilitates infection with diverse papillomavirus types. *Journal of Virology*. 87(2):1270-1273.
16. **Bergant M., M. Ozburn, S. Campos, M. Myers y L. Banks.** 2012. Human Papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via Sorting Nexin 17. *National Institute of Health*. 13(3):455-467.
17. **Bonilla, J., G. Bulut, X. Liu, E. Cortés, R. Schlegel, C. Flores, R. Contretas, S. Chung, P. Lambert, A. Üren y P. Gariglio.** 2012. The E6 Oncoprotein from HPV16 Enhances the Canonical Wnt/ β -Catenin Pathway in Skin Epidermin In Vivo. *Molecular Cancer Research*. 10:250-258.
18. **Boon S. y L. Banks.** 2013. High-risk human papillomavirus E6 oncoproteins interact with 14-3-3 ζ in a PDZ binding motif-dependent manner. *Journal of Virology*. 87(3):1586-1595.
19. **Boyden L., J. Mao, J. Belsky, A. Farhi, M. Mitnick, D. Wu, K. Insogna y R. Lifton.** 2002. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *The New England Journal of Medicine*. 346(20):1513-1521.

20. **Bulut, G., S. Fallen, E. Beauchamo, L. Drebing, J. Sun, D. Berry, B. Kallakury, C. Crum, J. Toretsky, R. Schlegel y A. Üren.** 2011. Beta-Catenin Accelerates Human Papilloma Virus Type-16 Mediated Cervical Carcinogenesis in Transgenic Mice. *PLOS ONE*. 6(11):1-10.
21. **Burger, R., B. Monk, T. Kurosaki, H. Anton-Culver, S. Vasilev, M. Berman y S. Wilczynski.** 1996. Hman Papillomavirus Type 18: Association With Poor Prognosis in Early Stage Cervical Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 88 (19):1361-1368.
22. **Bruni L., M. Diaz, X. Castellsagué, E. Ferrer, F.X. Bosch y S. Sanjosé.** 2010. Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Finding. *The Journal of Infectious Diseases*. 202:1789-1799.
23. **Bienkowska-Haba M., H. Patel y M. Sapp.** 2009. Target Cell Cyclophilins Facilitate Human Papillomavirus Type 16 Infection. *PLOS Pathogens*. 5(7):1-11.
24. **Bienkowska-Haba M., C. Williams, S.M. Kim, R.L. Garcea y M. Sapp.** 2012. Cyclophilins facilitate dissociation of the human papillomavirus type 16 capsid protein L1 from the L2/DNA complex following virus entry. *Journal of Virology*. 86(18):9875-9887.
25. **Boshart M., L. Gissmann, H. Ikenberg, A. Kleinheinz, W. Scheurlen y H. zur Hausen.** 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *The EMBO Journal*. 3(5):1151-1157.
26. **Bover S.N., DE. Wazer y V. Band.** 1996. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Research*. 56(20):4620-4624.
27. **Burk R., G. Ho, L. Beardsley, M. Lempa, M. Peters y R. Bierman.** 1996. Sexual Behavior and Partner Characteristics Are the Predominant Risk Factors for Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. *The journal of infectious diseases*. 174(4):679-689.
28. **Burk R., P. Kelly, J. Feldman, J. Bromberg, S.H. Vermund, J.A. Dehovitz y S. H. Landesman.** 1996. Declining Prevalence of Cervicovaginal Human Papillomavirus

- Infection With Age Independent of Other Risk Factors. *Sexually transmitted diseases*. 23(4):333-341.
29. **Byun S , S.T. Park, E .Y. Ki, H. Song, S.H. Hong y J.S. Park.** 2013. Intracardiac metastasis from known cervical cancer: a case report and literature review. *World journal of surgical oncology*. 11:107.
 30. **Carrillo A., S. Ponce de León, D. Cantú, V. Fragoso, I. Martínez, A. Orozco, A. Mohar y M. Lizano.** 2014. Impact of human papillomavirus coinfections on the risk of high-grade squamous intraepithelial lesion and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. 134:534-539.
 31. **Carron C., A. Pascal, A. Djiane, J. Boucaut, D. Shi y M. Umbhauer.** 2003. Frizzled receptor dimerization is sufficient to activate the Wnt/ β -catenin pathway. *Journal of Cell Science*. 116(12):2541-2550.
 32. **Cha S., E. Ta djuidje, Q. Ta o, Ch. Wylie y J. Heasman.** 2008. Wnt5a and Wnt11 interact in a maternal Dkk1-regulated fashion to activate both canonical and non-canonical signaling in Xenopus axis formation. *Development*. 135:3719-3729.
 33. **Chang YJ., HC. Chen, MH. Pan, BH. Lee, SL. You, CY. Lin, YC. Hsieh, YJ. Cheng, KL. Liaw, AW. Hsing, M. Shiffman y CJ. Chen: CBCSP-HPV Study Group.** 2013. Intratypic variants of human papillomavirus type 16 and risk of cervical neoplasia in Taiwan. *Journal of Medical Virology*. 85(9):1567-1576.
 34. **Chatterjee, A.** 2014. The next generation of HPV vaccines: nonavalent vaccine V503 on the horizon. *Expert Review Vaccines*. 13(11):1279-1290.
 35. **Chen D., I. Juko-Pecirep, J. Hammer, E. Ivasson, S. Enroth, I. Gustavsson, L. Feuk, P.K. Magnusson, J.D. McKav, E. Wilander y U. Gyllensten.** 2013. Genome-wide association study of susceptibility loci for cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 105(9):624-33.
 36. **Clarke MA., AC. Rodriguez, JC. Gage, R. Herrero, A. Hildesheim, S. Wacholder, R. Burk y M. Schiffman.** 2012. A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infectious Diseases*. 12:33.
 37. **Contreras A., E. De la Cruz, I. Martínez, A. Dueñas y M. Lizano.** 2009. E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. *Virology*. 383:78-85.

38. **Cricca M., S. Venturoli, E. Leo, S. Costa, M. Musiani y M. Zerbini.** 2009. Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *Journal of Virological Methods.* 158(1-2):180-183.
39. **Culp T., L. Budgeon, M. Marinkovich, G. Meneguzzi y N. Christensen.** 2006. Keratinocyte-Secreted Laminin 5 Chain Function as a Transient Receptor for Human Papillomaviruses by Binding Virions and Transferring Them to Adjacent Cells. *Journal of Virology.* 80(18):8940-8950.
40. **Czegledy, J., M. E. vander, Z. Hernadi, L. Gergely y G. Wadell.** 1994. Human papillomavirus type 18 E6*1 RNA in primary tumors and pelvic lymph nodes of Hungarian patients with squamous cervical cancer. *International Journal of Cancer.* 56: 182–186.
41. **D' Abramo C. M. y J. Archambault.** 2011. Small Molecule Inhibitors of Human Papillomavirus Protein-Protein Interactions. *The Open Virology Journal.* 5:80-95.
42. **De la Cruz, E., A. García, A. Mohar, A. Dueñas., A. Contreras, E. Pérez, R. Herrera y M. Lizano.** 2005. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *Journal of General Virology.* 86:2459-2468.
43. **De Sanjose S., W. Quint, L. Alemany, D. Geraets, J. Klustermeier, B. Lloveras, S. Tous, A. Felix, L. Bravo, H. Shin, C. Vallejos, P. Alonso, M. Lima, N. Guimera, O. Clavero, M. Alejo, A. Lombart-Bosch, C. Cheng-Yang, S. Tatti, E. Kasamatsu, E. Iljazovic, M. Orida, R. Pardo, M. Seoud, M. Grce, A. Usubutun, A. Jain, G. Hernandez, L. Lombardi, A. Banjo, C. Menéndez, D. Domingo, J. Velasco, A. Nessa, S. Chichareon, Y. Qiao, E. Lerma, S. Garland, T. Sasagawa, A. Ferrera, D. Hammouda, L. Mariani, A. Pelayo, I. Steiner, E. Oliva, C. Meijer, W. Al-Jassar, E. Cruz, T. Wright, A. Puras, C. Llave, M. Tzardi, T. Agorastos, V. García-Barriola, C. Clavel, J. Ordi, M. Andújar, X. Castellsagué, G. Sánchez, A. Nowakiwski, J. Bornstein, N. Muñoz y X. Bosch.** 2010. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 11:1048-1056.
44. **De Villiers E., L. Gissmann y H. Zur Hausen.** 1981. Molecular Cloning of Viral DNA from Human Genital Warts. *Journal of Virology.* 40(3):932-935.

45. **De Wilde J., J. De Castro, P. Snijders, C. Meijer, F. Rösl y R. Steenbergen.** 2008. Alterations in AP-1 and AP-1 regulatory genes during HPV-induced carcinogenesis. 2008. *Cell Oncology*. 30(1):77-87.
46. **Demers AA., B. Shearer, A. Severini, R. Lotocki, EV. Kliewer, S. Stopera, T. Wong y G. Javaraman.** 2012. Distribution of human papillomavirus types, cervical cancer screening history, and risk factors for infection in Manitoba. *Chronic Diseases and Injuries in Canada*. 32(4):177-185.
47. **Doorbar J.** 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*. 110:525-541.
48. **Doorbar J., W. Quint, L. Banks, I. Bravo, M. Stoler, T. Broker y M. Stanley.** 2012. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*. 30S:F55-F70.
49. **Van Doorslaer K., Q. Tan, S. Xirasagar, S. Bandaru, V. Golapan, Y. Mohamoud, Y. Huyen y A. McBride.** 2013. The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acids Research*. 41.
50. **Erdi E.** 2014. A rare metastatic region of cervix cancer; the brain. *The journal of Pakistan Medical Association*. 64(1):89-90.
51. **Facciuto F., M. Bugnon, F. Marziali, P. Massimi, L. Banks, A. Cavatorta y D. Gardiol.** 2014. Human papillomavirus (HPV)-18 E6 oncoprotein interferes with the epithelial cell polarity Par3 protein. *Molecular Oncology*. 8:533-543.
52. **Filippova M., M. Johnson, M. Bautista, V. Filippov, M. Fodor, S. Tungteakkhun, K. Williams y P. Duerksen-Hughes.** 2007. The Large and Small Isoforms of Human Papillomavirus Type 16 E6 Bind to and Differentially Affect Procaspase 8 Stability and Activity. *Journal of Virology*. 81(8):4116-4129.
53. **Florin L., C. Sapp, R. Streck y M. Sapp.** 2002. Assembly and Translocation of Papillomavirus Capsid Proteins. *Journal of Virology*. 76(19):10009-10014.
54. **Fodero C, A. Cavazza, R. Bio, L. Bulgarelli, L. Campioli, T. Rubino, V. Semeraro y S. Prandi.** 2013. Molecular diagnostics of pulmonary metastasis from cervical cancer. *Pathologica*. 105(1):21-3.
55. **Gariglio P., J. Gutiérrez, E. Cortés y J. Vázquez.** 2009. The role of retinoid deficiency and estrogen cofactors in cervical cancer. *Archives of Medical Research*. 40(6):449-465.

56. **Giroglou T ., L . F lorin, F . S chäfer, R . S treeck y M. S app.** 2001. Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology*. 75(3):1565-1570.
57. **Gosvig C F., L D. H uusom, K K. Andersen, A. If tner, L . C ederkvist, E . S vare, T . Iftner y SK. K jaer.** 2013. Persistence and reappearance of high-risk human papillomavirus after conization. *Gynecologic Oncology*. 131(3):661-666.
58. **Goto T., A. Sato, S. Adachi, S. Iemura, T. Natsume y H. Shibuya.** 2013. IQGAP1 protein regulates nuclear localization of β -catenin via importin- β 5 protein in Wnt signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 288(51):36351-36360.
59. **Grassmann K., B. Rapp, H. Maschek, KU. Petry y T. Iftner.** 1996. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *Journal of Virology*. 70(4):2339-2349.
60. **Gravitt P E.** 2012. Evidence and impact of human papillomavirus latency. *The Open Virology Journal*. 6:198-203.
61. **Guan P., G. Clifford y S. Franceschi.** 2013. Human papillomavirus types in glandular lesions of the cervix: A meta-analysis of published studies. *International Journal of Cancer*. 132:248-250.
62. **Habas R ., I. D awid y X . H e.** 2003. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes & Development*. 17:295-309.
63. **Hemminki K . y B . Chen.** 2006. Familial risks for cervical tumors in full and half siblings: etiologic apportioning. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 15(7):1413-1414.
64. **Heer A., L. Alonso y G. de Prat.** 2011. E6*, the 50 amino acid product of the most abundant spliced transcript of the e6 oncoprotein in high-risk human papillomavirus, is a promiscuous folder and binder. *Biochemistry*. 50(8):1376-1376.
65. **Hildesheim A., M Sichffman y P. Gravitt.** 1994. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *The Journal of Infectious Diseases*. 169(2):325-240.
66. **Ho G., R . B ierman y L. B eardsley.** 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *The New England Journal of Medicine*. 338(7): 423-428.

67. **Holowaty P., AB. Miller y T. Rohan.** 1999. Natural dysplasia of the uterine cervix. *J. Natl. Cancer Institute.* 91: 252-258.
68. **Huang M., A. Chang, M. Chio, D. Zhou, F. Anania y C. Shin.** 2014. Antagonistic Interaction Between Wnt and Notch Activity Modulates the Regenerative Capacity of a Zebrafish Fibrotic Liver Model. *Hepatology.* 0(0):1-14.
69. **Ishidate T., A. Matsumine, K. Toyoshima y T. Akivama.** 2000. The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. *Oncogene.* 19 (3):365-372.
70. **Kirnbauer R., F. Booy y N. Cheng.** 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proceedings of the National Academy of Science.* 89(24): 12180-12184.
71. **Kanai F., P. Marignani, D. Sarbassova, R. Yagi, R. Hall, M. Donowitz, A. Hisaminato, T. Fujiwara, Y. Ito, L. Cantley y M. Yaffe.** 2000. TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *The EMBO Journal.* 19(24):6778-6791.
72. **Kranjec C. y L. Banks.** 2011. A Systematic Analysis of Human Papillomavirus (HPV) E6 PDZ Substrates Identifies MAGI-1 as a Major Target of HPV Type 16 (HPV-16) and HPV-18 Whose Loss Accompanies Disruption of Tight Junctions. *Journal of Virology.* 85(4):1757-1764.
73. **Kurosaka H., A. Lulianella, T. Williams y P. Trainor.** 2014. Disrupting hedgehog and WNT signaling interactions promotes left lip patogenesis. *The Journal of Clinical Investigation.* 124(4):1660-1671.
74. **Lee S., I. Park y S. Cho.** 2011. Extension of metastatic lung cancer from cervix cancer through pulmonary vein into the left atrium. *The annals of thoracic surgery.* 92(3):1131.
75. **Lichting, H., D. Avital Gilboa, A. Jackman, P. Gonen, Y. Levav-Cohen, Y. Haupt y L. Sherman.** 2010. HPV16 E6 Augments Wnt Signaling in an E6AP-Dependent Manner. *Virology.* 396:47-58.
76. **Liu Ch., Y. Li, M. Semenov, Ch. Han, G. Baeg, Y. Tan, Z. Zhang, X. Lin y X. He.** 2002. Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell.* 108:837-847.

77. **Lizano M., E. De la Cruz, A. Carrillo, A. García, S. Ponce de León, A. Dueñas, D.M. Hernández y A. Mohar.** 2006. Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population. *Gynecologic Oncology*. 102:230-235.
78. **López A. y M. Lizano.** 2006. Cáncer Cervicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La Historia que no Termina. *Cancerología* 1(2006): 31-55.
79. **López R., L. Martínez y M. Sánchez.** 2008. Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infectious Agents and Cancer*. 3(3):1-13.
80. **Lu W., V. Yamamoto, B. Ortega y D. Baltimore.** 2004. Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell*. 119(1):97-108.
81. **Malek M., A.R. Kanafi, R. Pourghorban y R. Nafisi-Moghadam.** 2012. Isolated humeral metastasis in uterine cervical cancer: a rare entity. *Journal of clinical imaging science*. 2:80.
82. **Manzo J., P. Massimi, M. Lizano y L. Banks.** 2014. The human papillomavirus (HPV) E6 oncoproteins promote nuclear localization of active caspase 8. *Virology*. 450-451:146-152.
83. **Mantovani F. y L. Banks.** 2001. The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. 20:7874-7887.
84. **Magnusson P K., P. Lichtenstein y U B. Gyllenstein.** 2000. Heritability of cervical tumours. *International journal of Cancer*. 88(5):698-701.
85. **Matovina M., I. Sabol, G. Grubisic, NM. Gasperov y M. Grce.** 2009. Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecologic Oncology*. 113(1):120-127.
86. **McDonald A.C., A.I. Tergas, L. Kuhn, L. Denny y T.C. Jr Wright.** 2014. Distribution of Human Papillomavirus Genotypes among HIV-Positive and HIV-Negative Women in Cape Town, South Africa. *Frontiers on Oncology*. 4:48.
87. **Mikels AJ y Nusse R.** 2006. Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits β -Catenin–TCF Signaling Depending on Receptor Context. *PLoS Biology*. 4(4): 0570-0582.
88. **Moody C. y L. LaImins.** 2010. Human Papillomavirus Oncoproteins: Pathways to transformation. *Nature Reviews*. 10:550-560.

89. **Moscicki A., M. Schiffman, S. Kjaer y L. Villa.** 2006. Chapter 5: Updating natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*. 24(3):S42-S51.
90. **Muñoz N., G. Hernández-Suarez, F. Méndez, M. Molano, H. Posso, v. Moreno, R. Murillo, M. Ronderos, C. Meijer y A. Muñoz.** 2009. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *British Journal of Cancer*. 100: 1184-1190.
91. **Muñoz N., F. Bosch y S. Sanjose.** 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*. 348:518-527.
92. **Nair A. y D.R. Pai.** 2005. Single cystic liver metastasis in residual carcinoma of the uterine cervix. *European journals of obstetrics, gynecologic and reproductive biology*. 122(1):126-127.
93. **Narisawa M., y T. Kiyono.** 2007. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer science*. 98(10):1505-1511.
94. **Natphopsk S., W. Settheetham-Ishida, C. Pientong, P. Yuenvao y T. Ishida.** 2012. Risk factor for cervical cancer in northeastern Thailand: detailed analyses of sexual and smoking behavior. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 13(11):5489-5495.
95. **Negrini BP., MH. Schiffman, RJ. Kurman, W. Barnes, L. Lannom, K. Mallev, LA. Brinton, G. Delgado, S. Jones, JG. Tachabo, et al.**1990. Oral contraceptive use, human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix. *Cancer Research*. 50(15):4670-4675.
96. **Niemann S., C. Zhao, F. Pascu, U. Stahl, U. Aulepp, L. Niswander, J. Weber y U. Müller.** 2004. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *The American Journal of Human Genetics*. 74(3):558-563.
97. **Nishisho I., Y. Nakamura, Y. Miyoshi, Y. Miki, H. Ando, A. Hori, K. Koyama, J. Utsunomiya, S. Baba y P. Hedge.** 1991. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*. 253(5020):665-669.
98. **Noh J., W. Park, Y. Kim, J. Kim, H. Kim, J. Kim, JH. Kim, M. Yoon, J. Choi, W. Yoon, JY. Kim y S. Huh.** 2014. Comparison of clinical outcomes of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma in uterine cervical cancer patients receiving surgical

- resection followed by radiotherapy: A multicenter retrospective study (KROG 13-10). *Gynecologic Oncology*. 132:618-623.
99. **Ochoa A., C. Juarez, M. Rosales y P. Barros.** 2012. La vía de Señalización Wnt-B-catenina y su relación con cáncer. *Cirugía y Cirujanos*. 80 (4): 389-398.
 100. **Ong c., S. Chan, M. Campo, K. Fujinaga, P. Mavromara, V. Labropoulou, H. Pfister, S. Tay, J. ter Meulen y L. Villa.** 1993. Evolution of Human Papillomavirus Type 18: an Ancient Phylogenetic Root in Africa and Intra-type Diversity Reflects Coevolution with Human Ethnic Groups. *Journal of Virology*. 67(11):6424-6431.
 101. **Ozdemir H y G. Tunçbilek .** 2009. Metastasis of carcinoma of the uterine cervix to the nasal dorsum. *The journal of craniofacial surgery*. 20(3):971-973.
 102. **Park S., D. Ro, B. Park, Y. Kim, T. Kim, J. Jung, J. Lee, J. Kim y C. Han.** 2010. Brain metastasis from uterine cervical cancer. *The journal of Obstetrics and Gynecologic Research*. 36(3):701-704.
 103. **Pater, M ., G. Hughes, D . Hyslop, H . N akshatri y A. Pater.** 1988. Glucocorticoid-dependent oncogenic transformation by type 16 but not type 11 human papilloma virus DNA. *Nature London*. 335:832-835.
 104. **Perez C., A. Dueñas y B. Alatorre.** 2008. Second hit in cervical carcinogenesis process: involvement of wnt/beta catenin pathway. *International Archives of Medicine*. 1(10):3-8.
 105. **Pillai R.M., J.M. Babu, V.T. Jissa, S. Lakshmi, S.V. Chiplunkar, M. Patkar, H. Tongaonkar, K.B. Reddy, K.N. Chakka, M. Siddiqui, S. Roychoudury, P. Abraham, A. Peedicayil, M. Gnanamony, J. Subashini, T .S. Ram, B. Dey, N. Singh, A. Singh, S.K. Jain y R.S. Jayshree .** 2010. Region-wise distribution of high-risk human papillomavirus types in squamous cell carcinomas of the cervix in India. *International journal of gynecological cancer: Official journal of International Gynecological Cancer society*. 20(6):1046-1051
 106. **Pim D. y L . Banks.** 1999. HPV-18 E6*1 protein modulates the E6-directed degradation of p53 by binding to full-length HPV-18 E6. *Oncogene*. 18(52):7403-7408.
 107. **Pim D ., P . Massimi y L. Banks.** 1997. Alternatively Spliced HPV-18 E6*1 Protein Inhibits E6 Mediated Degradation of p53 and Suppresses Transformed Cell Growth. *Oncogene*. 15:257-264.

108. **Pim D., V. Tomaic y L. Banks.** 2009. The Human Papillomavirus (HPV) E6* Proteins from High-Risk, Mucosal HPVs Can Direct Degradation of Cellular Proteins in the Absence of Full-Length E6 Protein. *Journal of Virology*. 83 (19):9863-9874.
109. **Pista A., A. Oliveira, A. Barateiro, H. Costa, N. Verdasca y MT. Paixao.** 2007. Molecular variants of human papillomavirus type 16 and 18 and risk for cervical neoplasia in Portugal. *Journal of Medical Virology*. 79(12):1889-1897.
110. **Polakis, P.** 2012. Wnt Signaling in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1-13.
111. **Puranik AD, N.C. Purandare, S. Dua, K. Deodhar, S. Shah, A. Agrawal y V. Rangarajan.** 2013. Isolated mandibular condylar metastases: an uncommon manifestation of recurrent cervical cancer. *Journal of cancer research and therapeutics*. 9(1):108-110.
112. **Raff AB., AW. Woodham, LM. Raff, JG. Skeate, L. Yan, DM. Da Silva, M. Schelhaas y WM. Kast.** 2013. The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *Journal of Virology*. 87(11):6062-6072.
113. **Rampias T., E. Boutati, E. Pectasides, C. Sasaki, P. Kountourakis, P. Weinberger y A. Psyrri.** 2010. Activation of Wnt Signaling Pathway by Human Papillomavirus E6 and E7 Oncogenes in HPV16-Positive Oropharyngeal Squamous Carcinoma Cells. *Molecular Cancer Research*. 8(3):433-443.
114. **Renschmidt C., AM. Kaufmann, I. Hagemann, E. Vartazarova, O. Wichmann y Y. Deleré.** 2013. Risk factors for cervical human papillomavirus infection and high-grade intraepithelial lesion in women aged 20 to 31 years in Germany. *International Journal of Gynecology and Cancer*. 23(3):519-526.
115. **Rodriguez M.,L. González, R. Delgado, M. Lizano, G. Tsubaki, A. Mohar y A. García.** 2005. Abnormal distribution of E-cadherin and beta-catenin in different histologic types of cancer of the uterine cervix. *Gynecology Oncology*. 97(2):330-336.
116. **Rosenberger S., J. De-Castro Arce, L. Langbein, R. Steenbergen y F. Rösl.** 2010. Alternative splicing of human papillomavirus type-16 E6/E6* early RNA is coupled to EGF signaling via Erk1/2 activation. *Proceeding of the National Academy of Science*. 107(15): 7006-7011.
117. **Ruiz AM., JE. Ruiz, AV. Gavilanes, T. Eriksson, M. Lehtinen, G. Pérez, HL. Sings, MK. James, RM. Haupt: FUTURE I y II Study Group.** 2012. Proximity of first

- sexual intercourse to menarche and risk of high-grade cervical disease. *Journal of Infectious Diseases*. 206(12):1887-1896.
118. **Sabatier R , C. Roussin , J. Riviere , A. Jalaguier , J. Jacquemier y F. Bertucci.** 2012. Breast metastasis of a squamous cell carcinoma of the uterine cervix mimicking inflammatory breast cancer. *Case reports on Oncology*. 5(2):464-470.
 119. **Scheffner M ., B A. Werness, JM . Huibregtse, AJ. Levine y PM. Howley.** 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 63(6):1129-1136.
 120. **Schiffman M. y SK. Kjaer.** 2003. Chapter 2: Natural history of a non-genital human papillomavirus infection and neoplasia. *Journal of the Cancer Institute Monographs*. (31):14-19.
 121. **Schuck S . y A. Stenlund.** 2005. Assembly of a double hexameric helicase. *Molecular Cell*. 20(3):377-389.
 122. **Selinka H C., T . Giroglou, T . Nowak, N D. Christensen y M. Sapp.** 2003. Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations. *Journal of Virology*. 77(24):12961-12967.
 123. **Shirasawa H., M. Jin, K. Shimizu, N. Akutsu, Y. Shino y B. Simizu.** 1994. Transcription-Modulatory Activity of Full-Length E6 and E6*1 Proteins of Human Papillomavirus Type 16. *Virology*. 203:36-42.
 124. **Sokolova I., A. Algeciras-Schimmich, M. Song, S. Sitailo, F. Policht, B R. Kipp, J S. Voss, K C. Halling, A. Ruth, W. King, D. Underwood, J. Brainard y L. Morrison.** 2007. Chromosomal biomarkers for detection of human papillomavirus associated genomic instability in epithelial cells of cervical cytology specimens. *Journal of Molecular Diagnostics*. 9(5):604-611.
 125. **Spoden G., L. Kühling, N. Cordes, B. Frenzel, M. Sapp, K. Boller, L. Florin y M. S chekhaas.** 2013. Human papillomavirus types 16, 18 and 31 share similar endocytic requirements for entry. *Journal of Virology*. 87(13):7765-7773.
 126. **Storrs C . y S . Silverstein.** 2007. PATJ, a Tight Junction-Associated PDZ Protein, Is a Novel Degradation Target of High-Risk Human Papillomavirus E6 and the Alternatively Spliced Isoform 18 E6*. *Journal of Virology*. 81(8):4080-4090.

127. **Su Y., C. Fu, S. Ishikawa, A. Stella, M. Kojima, K. Shitoh, E. Schreiber, B. Day y B. Liu.** 2008. APC Is Essential for Targeting Phosphorylated β -Catenin to the SCF β -TrCP Ubiquitin Ligase. *Molecular Cell*. 32: 652-661.
128. **Subbaiah VK, N. Narayan, P. Massimi y L. Banks.** 2012. Regulation of the DLG tumor suppressor by β -catenina. *International Journal of Cancer*. 131(10):2223-2233.
129. **Szabo E., M. Riffe, S. Steinberg, M. Birrer y R. Linnoila.** 1996. Altered cJUN expression: an early event in human lung carcinogenesis. *Cancer Research*. 56(2):305-315.
130. **Takemaru K. y R. Moon.** 2000. The Transcriptional Coactivator CBP Interacts with β -Catenin to Activate Gene Expression. *Cell Biology*. 149(2):249-254.
131. **Thanappapasr D., A. Narttharung, P. Likittanasombut, N.I Ayudhya, C. Charakorn, U. Udomsubpayakul, T. Subhadarbandhu y S. Wilailak.** 2010. Bone metastasis in cervical cancer patients over a 10-year period. *International journal of gynecological cancer: Official journal of international Gynecological Cancer society*. 20(3):373-378.
132. **Thomas M., D. Pim y L. Banks.** 1999. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. 18(53):7690-7700.
133. **Tornesello ML., S. Losito, G. Benincasa, F. Fuiciniti, G. Botti, S. Greggi, L. Buonaguro y FM. Buonaguro.** 2011. Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecologic Oncology*. 121(1):32-42.
134. **Üren A., S. F allen, H. Y uan, A. U subütün, T. K üçükali. R. Schlegel y J. Toretsky.** 2005. Activation of the Canonical Wnt Pathway during Genital Keratinocyte Transformation: A Model for Cervical Cancer Progression. *Cancer Research*. 65(14):6199-6206.
135. **Vaeteewoottacharn K., S. Chamutpong, M. Ponglikitmongkol y P. Angeletti.** 2005. Differential localization of HPV16 E6 splice products with E6-associated protein. *Virology Journal*. 2(50):1-6.
136. **Vazquez S. L .P. S á nchez, R . Andrade, E . C astellanos, A . Contreras, A . García, M. Lizano y L. Benites.** 2013. Regulation of p14ARF expression by HPV-18 variants. *Journal of medical virology*. 85(7):1215-1221.

137. **Vinokurova S. y M. von Knebel Doeberitz.** 2011. Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PLoS One*. 6(9):e24451.
138. **Walboomers J., M. Jacobs, M. Manos, X. Bosch, A. Kummer, K. Shah. P. Snijders, J. Peto, C. Meijer y N. Munoz.** 1999. Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worl-Wide. *Journal of Pathology*. 189: 12-19.
139. **Wang S ., H. Wei, N. Wang, S. Zhang, Y. Zhang, Q. Ruan, W. Jiang, Q. Xiao, X. Luan, X. Qian, L. Zhang, X. Gao y X. Sun.** 2012. The prevalence and role of human papillomavirus g enotypes i n primary c ervical s creening i n t he n ortheast of China. *BMC Cancer*. 12:160.
140. **Williams V., M. Filippova, V. Filippov, K. Payne y P. Duerksen.** 2014. Human papillomavirus t ype 1 6 E 6* i nduces ox idative s tress and D NA damage. *Journal of Virulogy*. 88(12):6751-6761.
141. **Xu, M., R. Katzenellenbogen, C. Grandori y D. Galloway.** 2010. NFX1 Plays a Role i n H uman P apillomavirus Type 16 E 6 A ctivation o f N FκB A ctivity. *Journal of Virology*. 84(21): 11461-11469.
142. **Yoshimura T., Y. Tamai, H. Takami, K. Kariya, R. Nakahata, K. Tsushima, A. Munakata y S. Kawamura.** 1999. Rapidly progressive irradiated cervical cancer that metastasized t o t he liver during t herapy f or i diopathic t hrombocytopenic pur pura. *Rinsho Ketsueki. The Japanese journal of clinical hematology*. 40(2):150-152.
143. **Yousefzadeh A ., S.M. Mostafavizadeh, A. Jarollahi, M. Raesi, M. Garshasbi, Z. Siavashvahi, B. Moazzami y B. Shafaghi.** 2014. H uman papillomavirus (HPV) prevalence and t ypes a mong w omen at tending r egular gynecological visit in Tehran, Iran. *Clinical Laboratory*. 60(2):267-73.
144. **Zhou J., X. Sun y D. Stenzel.** 1991. Expression of vaccine recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*. 185(1):251-257.
145. **Zur Hausen H .** 1996. P apillomavirus i nfectio ns: a major c ause o f h uman cancers. *Biochimica el Biophysica Acta*. 1288:F55-F78.

2. Libros consultados

1. *Findings from cytology-based studies* En: *Cervical Cancer: From Etiology to Prevention*. Eds: **Rohan T. and K. Shah**. Springer; 2004: 63-65.
2. **Eifel P.J., J.S Berek, Markman, M.** *Cancer of the cervix, vagina, and vulva*. En: *Cáncer: Principles and Practice of Oncology*. Eds: **DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA**, 8th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2008:1496–1543.

3. Páginas electrónicas consultadas

1. **GLOBOCAN** 2012 (IARC) *Section of Cancer Information* <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp> (21/05/2014)
2. **National Cancer Institute (NCI)**. 2011. *Human Papillomavirus (HPV) Vaccines*. <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/prevention/HPV-vaccine> (28/05/2013)
3. **NCBI** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (28/09/2014)
4. **Diseño de oligonucleotides para PCR** http://www.bioxeo.com/bioinfo/primers_anagrande.htm
5. **Compendio de VPH** <http://pave.niaid.nih.gov/lanl-archives/compendium/94PDF/1/sm1c.pdf> (28/05/2013)
6. **Womens Health** http://www.womenshealthsection.com/content/art_images/gyno020d_1.jpg (2/04/2014)
7. **American Cancer Society** <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003094-pdf.pdf> (4/04/2014)
8. **Emory University** <http://www.cancerquest.org/index.cfm?page=4086&lang=spanish> (30/04/2014)
9. **Papillomavirus Episteme PaVE** pave.niaid.nih.gov (06/05/2014)
10. **Stanford (Role N usse)** <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/> (21/08/2014)

XII. ANEXOS

1. Amortiguadores y medios de cultivo preparados

1.1 Medio rico Luria-Broth o LB (1000 ml)

- Peptona de caseína 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 10 g

El medio se hizo disolviendo los distintos componentes en agua destilada y esterilizándolo durante 20 min a 120 °C y 15 libras de presión.

1.2 Buffer TBS 10X pH 7.6 (1000 ml)

- Tris-base 60.5 g
- NaCl 87.6 g

Disueltos en agua destilada.

1.3 Buffer TBS-T pH 7.6 (1000 ml)

- 1000 ml de buffer TBS 1X
- Tween-20 1 ml

1.4 Buffer de lisis para extracción de DNA pH 8

- Tris-HCl 10Mm
- EDTA 0.1 M
- SDS 0.5%

Disueltos en agua destilada.

1.5 Buffer PBS (200 ml)

- Una pastilla de Buffer salino de fosfatos Sigma®.

Disuelta en agua destilada y esterilizado durante 20 min a 120 °C y 15 libras de presión.

1.6 Buffer CaCl₂-Tris pH 7.5 (50 ml)

- CaCl₂ 0.55 g (100 mM)
- Tris 0.078 g (10 mM)

Disuelto en agua destilada.

1.7 Buffer TBE 10 X pH 8 (1000 ml)

- 108 g de Tris-base (1M)
- 55 g de ácido bórico (0.96 M)
- 8.4 g de EDTA (0.01 M)

Disuelto en agua destilada.

1.8 Buffer RIPA 40 ml

- 0.3506 g de NaCl
- 0.0969 g de Tris
- 400 µl de Igepal CA-630

Disuelto en agua destilada.

1.9 Solución de trabajo para cuantificación de proteínas

- 100 partes de Ac. Bicinónico
- 2 partes de Sulfato de Cu II

1.10 Buffer pH 6.8 para gel concentrador (500 ml)

- 2 g de SDS
- 30.2 g de Tris-base

Disuelto en agua destilada

1.11 Buffer pH 8.8 para gel separador (500 ml)

- 2 g de SDS
- 91 g de Tris-base

Disueltos en agua destilada.

1.12 Buffer de corrida 5X (500 ml)

- 2.5 g de SDS
- 7.5 g de Tris-Base
- 36 g de glicina

Disueltos en agua destilada.

1.13 Buffer de transferencia 1X (1000 ml)

- 3.79 g de Tris-base
- 18 g de glicina
- 250 ml de metanol

Disueltos en agua destilada.

1.14 Buffer de bloqueo

- 5 % de leche Svelty[®] sin grasa
- 2.5 % de BSA (Promega[®])

Disueltos en amortiguador TBS-T

1.15 Buffer para dilución de anticuerpos

- 2.5 % de leche Svelty[®] sin grasa
- 1.25 % de BSA

Disueltos en amortiguador TBS-T.

1.16 Solución de paraformaldehido

- 4% de paraformaldehido

Disuelto en agua destilada, en baño maría a 60 °C, durante toda la noche.

1.17 Buffer PBS-T (100 ml)

- 90 ml de buffer PBS 1X
- Tween-20 100 µl

1.18 Solución de BSA

- 10 % de BSA

Disuelta en amortiguador PBS.

1.19 Buffer de bloqueo para IF

- 3 % de solución de BSA
- 5 % de suero de cabra
- 0.1 % de Tween-20

Disueltos en amortiguador PBS.

2. Programas y reacciones para retrotranscripción y PCR

2.1 Reacción (20 µl) y programa para la retrotranscripción

Tabla 2. 1 Se muestran los reactivos y las cantidades necesarias de cada uno de estos, para la preparación de una reacción de retrotranscripción.

| REACTIVO | CANTIDAD | CONCENTRACIÓN FINAL |
|----------------------------|----------|---------------------|
| MgCl ₂ (25 mM) | 4 µl | 5 mM |
| Amortiguador para PCR 10X | 2 µl | 1X |
| Agua MIQ | 2 µl | - |
| dGTP | 2 µl | 1 mM |
| dATP | 2 µl | 1 mM |
| dTTP | 2 µl | 1 mM |
| dCTP | 2 µl | 1 mM |
| Inhibidor de RNasa | 1 µl | 1 U/µl |
| Transcriptasa reversa MuLV | 1 µl | 2.5 U/µl |
| Hexámeros aleatorios | 1 µl | 2.5 µM |
| Muestra de RNA | - | ≤ 1 µg |
| TOTAL | 20 µl | - |

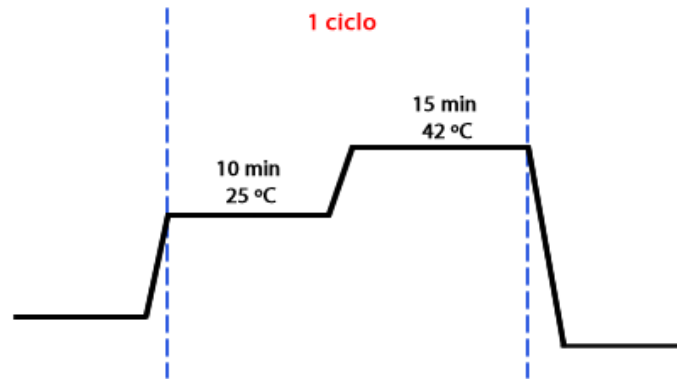


Figura 2.1. Programa para la amplificación de cDNA a partir de RNAm.

2.2 Reacción para PCRs (20 μ l) y programas para cada amplificado

Tabla 2.2 Se muestran los reactivos y las cantidades necesarias de cada uno de estos, para la preparación de una reacción de PCR.

| REACTIVO | CANTIDAD | CONCENTRACIÓN FINAL |
|---------------------------|--------------|---------------------|
| dNTPs (200 mM) | 2 μ l | 20 mM |
| Amortiguador 10X | 2 μ l | 1X |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1.6 μ l | 2 mM |
| Oligo 5' (50 pM) | 0.1 μ l | 0.25 pM |
| Oligo 3' (50 pM) | 0.1 μ l | 0.25 pM |
| Taq polimerasa gold | 0.15 μ l | 0.037 U/ μ l |
| DNA | - | Aprox. 100 ng |
| Agua | Completar | - |
| TOTAL | 20 μ l | |

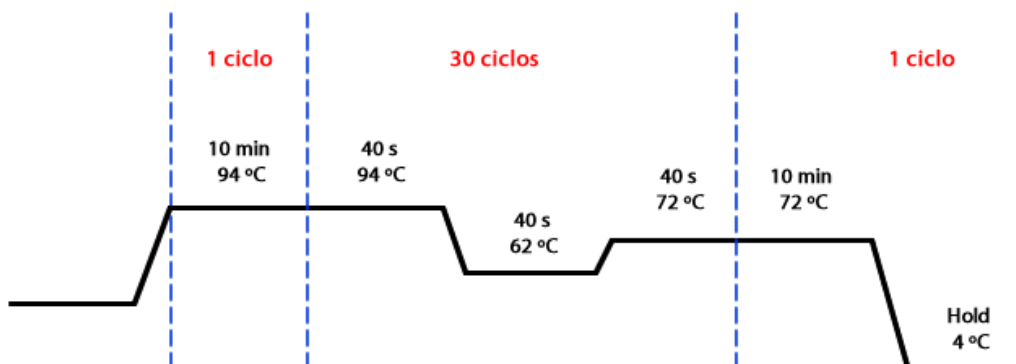


Figura 2.2. Programa para la amplificación de E6WT, E6SM, E6*I y BAP (control de transfección) a partir de cDNA.

3. Reacciones de restricción y ligación

3.1. Reacción de restricción

Tabla 3.1. Se describen los reactivos y cantidades necesarias para una reacción de restricción utilizando dos endonucleasas específicas.

| REACTIVOS 1RA RESTRICCIÓN | CANTIDAD |
|--------------------------------------|----------------------------|
| Buffer 10X H | 2 μ l |
| EcoRI (Invitrogen®) 50 U/ μ l | 1 μ l |
| DNA a digerir | 500 ng |
| Agua | Hasta completar 20 μ l |
| REACTIVOS 2DA RESTRICCIÓN | CANTIDAD |
| BglII (Invitrogen®) 10 50 U/ μ l | 1 μ l |

3.2. Reacción de ligación

Tabla 3.2. Se describen los reactivos y cantidades necesarias para una reacción de ligación.

| REACTIVOS | CANTIDAD |
|--|----------------------------|
| Ligasa T ₄ (Invitrogen®) 1 U/ μ l | 1 μ l |
| Amortiguador 5X | 4 μ l |
| Inserto digerido (E6WT, E6SM o E6*I) | 3 veces |
| Plásmido digerido | 1 vez |
| Agua | Hasta completar 20 μ l |

En el caso del inserto y el plásmido, se requiere que estos se coloquen en una relación 3:1 (inserto:plásmido). La cantidad de DNA no se especifica, pero debe < 1 μ g total.

4. Preparación de geles de poliacrilamida

Tabla 4.1. Reactivos y cantidades para la preparación de geles de poliacrilamida de 0.75 mm. Cada uno de los reactivos y las cantidades utilizadas para la preparación de geles separadores del 10 y 15 %, así como para el gel concentrador se observan en la tabla.

| GEL SEPARADOR | | | | | | |
|------------------|--------------|----------------|-------------------------|----------------------|---------|-------|
| % | No. de geles | MIQ | Acrilamida 30% | Buffer 8.8 separador | PSA 10% | TEMED |
| 10% | 1 ml | 2.15 ml | 1.6 ml | 1.25 ml | 15 µl | 5 µl |
| | 2 ml | 3.87 ml | 2.88 ml | 2.25 ml | 30 µl | 10 µl |
| | 3 ml | 6.45 ml | 4.8 ml | 3.8 ml | 45 µl | 15 µl |
| 15% | 1 ml | 2.5 ml | 5 ml | 2.8 ml | 50 µl | 5 µl |
| | 2 ml | 5 ml | 10 ml | 5.6 ml | 100 µl | 10 µl |
| | 3 ml | 7.5 ml | 15 ml | 8.4 ml | 150 µl | 15 µl |
| GEL CONCENTRADOR | | | | | | |
| No. de geles | MIQ | Acrilamida 30% | Buffer 6.8 concentrador | PSA 10% | TEMED | |
| 1 | 1 ml | 0.25 ml | 0.415 ml | 7.5 µl | 2.5 µl | |
| 2-3 | 3 ml | 0.75 ml | 1.245 ml | 25 µl | 7.5 µl | |
| 4-6 | 6 ml | 1.5 ml | 2.5 ml | 50 µl | 15 µl | |

5. Anticuerpos utilizados

Tabla 5.1. Anticuerpos utilizados. Se muestra el anticuerpo, la marca y la concentración a la que se usó.

| ANTICUERPOS PRIMARIOS | | | | |
|-------------------------|----------------|----------|----------|--------|
| Anticuerpo | Marca | Dilución | Hecho en | Ensayo |
| Anti-Flag | Sigma | 1:1000 | Ratón | WB |
| Anti-p53 | Santa Cruz | 1:1000 | Ratón | WB |
| Anti-β-catenina | Millipore | 1:1000 | Ratón | WB |
| Anti-β-catenina | Cell Signaling | 1:200 | Conejo | IF |
| Anti-c-Jun | Millipore | 1:1000 | Ratón | WB |
| ANTICUERPOS SECUNDARIOS | | | | |
| Anticuerpo | Marca | Dilución | Hecho en | Ensayo |
| Anti-ratón | Roche | 1:10 000 | Cabra | WB |
| Alexa 594 | Alexa Fluor | 1:700 | Cabra | IF |

WB. Western blot; IF. Inmunofluorescencia

6. Procesamiento alternativo del mensajero de E6 de VPH-18

```

ATG gcg cgc ttt gag gat cca aca cgg cga ccc tac aag cta cct
gat ctg tgc acg gaa ctg aac act tca ctg caa gac ata gaa ata
acc tgt gta tat tgc aag aca gta ttg gaa ctt aca ga Donador 233

gta ttt gaa ttt gca ttt aaa gat tta ttt gtg gtg tat aga gac
agt ata ccc cat gct gca tgc cat aaa tgt ata gat ttt tat tct
aga att aga gaa tta aga cat tat tca gac tct gtg tat gga gac
aca ttg gaa aaa cta act aac act ggg tta tac aat tta tta ata
ag

Aceptor 416 Nuevo codón de paro
gtg cct gcg gtg cca gaa acc gtt gaa tcc agc aga aaa act TAG

aca cct taa tga aaa acg acg att tca caa cat agc tgg gca cta
TAG agg cca gtg cca ttc gtg ctg caa ccg agc acg aca gga acg
act cca acg acg cag aga aac aca agt aTA A
  
```

Figura 6.1. Sitios de procesamiento alternativo en E6. En color verde se observan los sitios donador y aceptor de splicing. En gris vemos la parte de E6 que se pierde luego del splicing. Finalmente en rojo se resaltó el nuevo codón de paro generado por el cambio de marco de lectura.

7. Sitio de clonación múltiple del plásmido p3XFLAG-CMV 10

| 3XFLAG Peptide Sequence | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met* | Asp | Tyr | Lys | Asp | His | Asp | Gly | Asp | Tyr | Lys | Asp | His | Asp | Ile |
| ATG | GAC | TAC | AAA | GAC | CAT | GAC | GGT | GAT | TAT | AAA | GAT | CAT | GAC | ATC |
| TAC | CTG | ATG | TTT | CTG | GTA | CTG | CCA | CTA | ATA | TTT | CTA | GTA | CTG | TAG |

| 3XFLAG Peptide Sequence | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-----|-----|-----|
| Asp | Tys | Lys | Asp | Asp | Asp | Asp | Lys | | | | Not I | EcoRI | | | |
| GAT | TAC | AAG | GAT | GAC | GAT | GAC | AAG | CTT | GCG | GCC | GCG | AAT | TCA | TCG | ATA |
| CTA | ATG | TTC | CTA | CTG | CTA | CTG | TTC | GAA | CGC | CGG | CGC | TTA | AGT | AGC | TAT |

Hind III

| Bgl II | EcoRV | Kpn I | Xba I | Bam HI | | | | | | | | | |
|--------|-------|-------|-------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GAT | CTG | ATA | TCG | GTA | CCA | GTC | GAC | TCT | AGA | GGA | TCC | CGG | GTG |
| CTA | GAC | TAT | AGC | CAT | GGT | CAG | CTG | AGA | TCT | CCT | AGG | CCC | CAC |

Figura 7.1 Sitio múltiple de clonación del plásmido p3XFLAG-CMV 10. En un rectángulo rojo se ha marcado el sitio de corte para EcoRI. Analizando la secuencia puede observarse que al clonar un fragmento en dicho sitio, el marco de lectura quedaría recorrido.

8. Transfección con Lipofectamina 2000

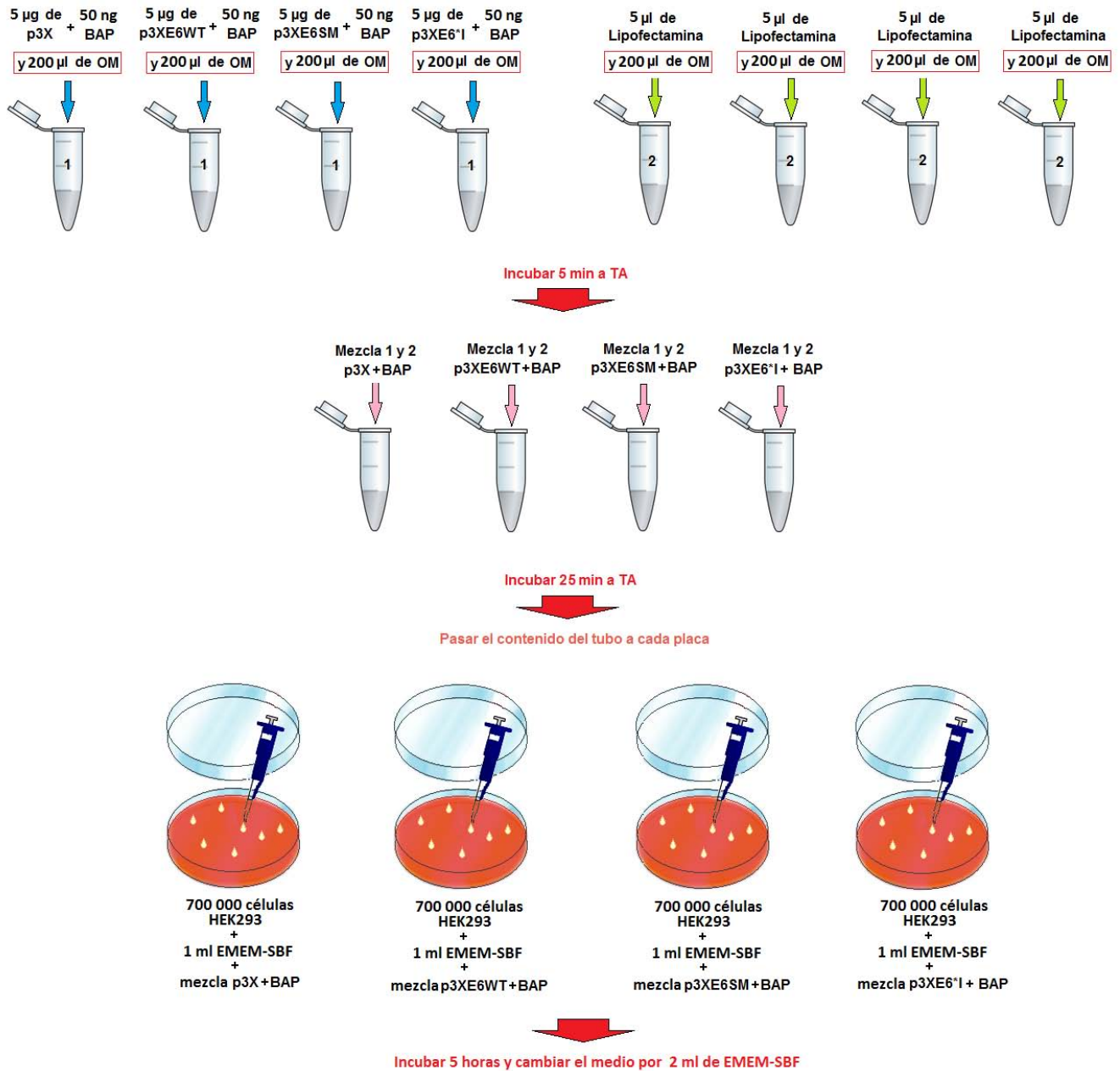


Figura 8.1. Esquema del método de transfección utilizado. Cada construcción se cotransfectó con el plásmido control BAP, utilizando lipofectamina 2000 en medio OptiMem (OM). Una vez todo junto, la mezcla se agregó cuidadosamente en las placas sembradas un día antes con las células a transfectar.

9. Secuenciación de los fragmentos E6WT, E6SM y E6*I clonados en p3XFLAG-CMV 10

E6WT

```

ATG GAC TAC AAA GAC CAT GAC GGT GAT TAT AAA GAT CAT GAC ATC GAT TAC AAG GAT
GAC GAT GAC AAG CTT GCG GCC GCG AAT TCA GCG CGC TTT GAG GAT CCA ACA CGG CGA
CCC TAC AAG CTA CCT GAT CTG TGC ACG GAA CTG AAC ACT TCA CTG CAA GAC ATA GAA
ATA ACC TGT GTA TAT TGC AAG ACA GTA TTG GAA CTT ACA GAG GTA TTT GAA TTT GCA
TTT AAA GAT TTA TTT GTG GTG TAT AGA GAC AGT ATA CCG CAT GCT GCA TGC CAT AAA
TGT ATA GAT TTT TAT TCT AGA ATT AGA GAA TTA AGA CAT TAT TCA GAC TCT GTG TAT
GGA GAC ACA TTG GAA AAA CTA ACT AAC ACT GGG TTA TAC AAT TTA TTA ATA AGG TGC
CTG CGG TGC CAG AAA CCG TTG AAT CCA GCA GAA AAA CTT AGA CAC CTT AAT GAA AAA
CGA CGA TTT CAC AAC ATA GCT GGG CAC TAT AGA GGC CAG TGC CAT TCG TGC TGC AAC
CGA GCA CGA CAG GAA CGA CTC CAA CGA CGC AGA GAA ACA CAA GTA TAA
  
```

E6SM

```

ATG GAC TAC AAA GAC CAT GAC GGT GAT TAT AAA GAT CAT GAC ATC GAT TAC AAG GAT
GAC GAT GAC AAG CTT GCG GCC GCG AAT TCA GCG CGC TTT GAG GAT CCA ACA CGG CGA
CCC TAC AAG CTA CCT GAT CTG TGC ACG GAA CTG AAC ACT TCA CTG CAA GAC ATA GAA
ATA ACC TGT GTA TAT TGC AAG ACA GTA TTG GAA CTT ACA GAA GTA TTT GAA TTT GCA
TTT AAA GAT TTA TTT GTG GTG TAT AGA GAC AGT ATA CCG CAT GCT GCA TGC CAT AAG
TGT ATA GAT TTT TAT TCT AGA ATT AGA GAA TTA AGA CAT TAT TCA GAC TCT GTG TAT
GGA GAC ACA TTG GAA AAA CTA ACT AAC ACT GGG TTA TAC AAT TTA TTA ATA AGG TGC
CTG CGG TGC CAG AAA CCG TTG AAT CCG GCA GAA AAA CTT AGA CAC CTT AAT GAA AAA
CGA CGA TTT CAC AAC ATA GCT GGG CAT TAT AGA GGC CAG TGC CAT TCG TGC TGC AAC
CGA GCA CGA CAG GAA CGA CTC CAA CGA CGC AGA GAA ACA CAA GTA TAA
  
```

E6*I

```

ATG GAC TAC AAA GAC CAT GAC GGT GAT TAT AAA GAT CAT GAC ATC GAT TAC AAG GAT
GAC GAT GAC AAG CTT GCG GCC GCG AAT TCA GCG CGC TTT GAG GAT CCA ACA CGG CGA
CCC TAC AAG CTA CCT GAT CTG TGC ACG GAA CTG AAC ACT TCA CTG CAA GAC ATA GAA
ATA ACC TGT GTA TAT TGC AAG ACA GTA TTG GAA CTT ACA GAG GTG CCT GCG GTG CCA
GAA ACC GTT GAA TCC AGC AGA AAA ACT TAG
  
```

Figura 9.1. Secuencias de los fragmentos E6WT, E6SM y E6*I de VPH-18. En la imagen se muestran los fragmentos que se obtuvieron secuenciando los plásmidos p3XFLA-E6WT, p3XFLAG-E6SM y p3XFLA-E6*I. En rojo se observa la secuencia correspondiente a los tres epítopes FLAG contenidos en el vector utilizado para la clonación y en gris la secuencia génica de interés. Puede verse que el ATG (en amarillo) se encuentra antes de los epítopes FLAG, y que a la secuencia nucleotídica clonada le ha sido deletado este codón de inicio. En verde se resalta la mutación G233A característica de la mutante splice mutant de E6.