



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LAS PROTEÍNAS E6 Y E6*1 DE VPH-18 SOBRE
LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL FACTOR TCF DE
LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

SANDRA OLIVIA VELÁZQUEZ CUEVAS



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. MARCELA LIZANO SOBERON**

2016

Cd.Mx.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Velázquez
Cuevas
Sandra
Olivia
26170835
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308109852

1. Datos del asesor
Dra.
Marcela
Lizano
Soberón

2. Datos del sinodal 1
Dr.
Hugo
Aníbal
Santamaría
Suárez

3. Datos del sinodal 2
Dr.
Genaro
Vázquez
Victorio

4. Datos del sinodal 3
Dr.
Benito
Estrada
Mena

5. Datos del sinodal 4
M. en C.
Janet
García
Pillado

6. Datos del trabajo escrito
Efecto de las proteínas E6 y E6*1 sobre la actividad transcripcional
del factor TCF de la vía de señalización Wnt/ β -catenina
73 p
2016

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A mi tutora la Dra. Marcela Lizano Soberón, por permitirme formar parte de su laboratorio y brindarme la confianza y el apoyo incondicional para la realización de esta tesis. Por todas sus enseñanzas académicas y morales. Agradezco su atención, paciencia, amabilidad y tiempo invertido para la elaboración de este trabajo.

Al Candidato a Dr. Omar Muñoz Bello por enseñarme todo lo necesario e importante para la elaboración de esta tesis. Por todos los consejos y puntos de vista que me permitieron desarrollar correctamente este trabajo.

A la M. en C. Leslie Olmedo Nieva por sus valiosas aportaciones durante la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Elizabeth Langley McCarron y al M. en C. Ángel Salmerón Hernández por su apoyo y consejos brindados durante los ensayos de actividad transcripcional.

A todos los integrantes del laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de virus oncogénicos, por siempre auxiliarme y brindarme soluciones ante los problemas a los que me enfrentaba. Agradezco su apoyo y su agradable compañía.

Al Dr. Hugo Aníbal Santamaría Suárez, Dr. Genaro Vázquez Victorio, M. en C. Janet García Pillado, Dr. Benito Estrada Mena por sus valiosos comentarios y aportaciones, los cuales contribuyeron a mejorar y concluir de manera satisfactoria esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) referencia PY 166808 por brindarme el apoyo económico para llevar a cabo este proyecto.

Al Programa de Inicio a la Investigación (PROBEI) por el apoyo económico otorgado durante el periodo de enero 2014 a abril del 2015.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, Marco Antonio Velázquez Rosas y Yolanda Cuevas Pérez, por darme el amor, el apoyo y la confianza que necesite en todo momento. Por ser mis mejores amigos, mis confidentes y mis maestros de vida. Gracias por hacerme feliz, por alentarme a ser una mejor persona. Gracias por siempre estar a mi lado y ser mis ejemplos de fortaleza y humildad. Todo lo que soy se los debo a ustedes; este primer logro es también suyo, LOS AMO INFINITAMENTE. A mi hermanito perro Baxter que siempre me da la mejor bienvenida al llegar a casa y por su linda compañía en mis noches de tareas ¡Te adoro!

A Omar Muñoz Bello y Leslie Olmedo Nieva, por su paciencia y apoyo para la realización de esta tesis. Gracias por confiar en mí, por ser mis guías desde el principio hasta el final. Gracias por transmitirme su gusto por la ciencia, por motivarme y enseñarme todo lo necesario para que yo pudiera concluir mi primer logro profesional. Agradezco que hayan sido mis asesores, sus observaciones, regaños, y opiniones fueron fundamentales para que yo me desarrollara mejor en el laboratorio.

A Ángel Fernando Soto Pozos, por su amor, apoyo y compañía que son mis pilares para seguir adelante. Tú siempre has estado cuando más lo necesito, no sabes lo agradecida que estoy con la vida por haberte puesto en mi camino. Eres una excelente persona, que siempre logra sacarme una sonrisa. Mi Fer, gracias por tu paciencia, por tu cariño siempre constante, por ser el mejor novio. Eres mi persona favorita al que adoro con todo mi corazón ¡TE AMO!.

A Carolina Herrera Aguilera, por ser parte especial en mi vida. Carito, muchas gracias por enseñarme lo que es una amistad sincera e incondicional; por dejarme quedarme en tu vida durante todos estos años. Gracias por estar conmigo en todo momento, por ser tan certera con las palabras que logran animarme pese a cualquier situación. Hemos culminado esta etapa académica juntas, nos esperan muchos planes, sueños y viajes que cumplir. No olvides que estoy ahí para ti ¡Te amo!

A Reyna Fabiola Chávez Matías y Gemma Nydia Villagómez Garduño, por que sin duda mis días en la Universidad no hubieran sido amenos sin su linda compañía. Gracias chicas, por su bonita y valiosa amistad. ¡Las quiero mucho!

A mis amig@s Cecy, Lalo y Viri porque a pesar de la distancia y las ocupaciones siempre me han mostrado su confianza y linda amistad.

A todos los integrantes del laboratorio: Adán, Ceci, Cesar, Freddy, Joak, Mary, Alfred, Elenaé, Ime, Dra. Adriana, Adelita, Rosy, Ali, Liz y Leo. Gracias por todos los momentos que compartimos juntos, fueron divertidos y productivos. Me llevo muy lindos recuerdos de todos y cada uno de ustedes.

A Luis Meza Arcos y a mis compañer@s de Ciencia Recreativa Universum, en especial a Diana, Sally, Mari, Ivonne, Isela y Fany por los momentos divertidos que hemos pasado juntas, gracias por su apoyo y sus enseñanzas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar, por darme la oportunidad de crecer tanto académica como profesionalmente. Es un orgullo pertenecer a esta gran casa de estudios.

¡México, Pumas, Universidad!

*The grass was greener
the light was brighter
the taste was sweeter
the nights of wonder
with friends surrounded
the dawn mist glowing
the water flowing
the endless river*

Forever and ever

High hopes, Pulse 1995

Pink Floyd

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1. Epidemiología del cáncer cervicouterino (CaCU)	2
2. Virus del papiloma humano (VPH)	3
2.1 Ciclo de vida del VPH	4
2.2 Organización del genoma del VPH.....	6
L1 y L2	7
E1	7
E2	7
E4	8
E5	8
E7	8
3. La proteína E6	9
3.1 Funciones de la proteína E6	9
3.2 Procesamiento alternativo de la proteína E6.....	10
4. La proteína E6*1	11
4.1 Funciones de la proteína E6*1.....	13
5. Vía de señalización Wnt.....	14
5.1 Vía Canónica de Wnt/ β -catenina	15
5.2 Vía de Wnt/ β -catenina en Cáncer	17
II. ANTECEDENTES	18
1. Alteración de la vía de Wnt/ β -catenina en cánceres asociados a VPH	18
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Cultivo celular.....	21
2. Plásmidos	21
3. Diseño de oligonucleótidos	21
4. Extracción de ADN genómico	21
5. Extracción de ARN.....	22
6. RT-PCR.....	23
7. Clonación del fragmento E6 de VPH-16.....	23
8. Extracción de ADN plasmídico	24
9. Electroforesis.....	25

10. Transfección en células C33A.....	25
11. Extracción de proteínas y Western blot de E6 y E6*I.....	26
12. Ensayos de luciferasa.....	28
13. Análisis estadístico.....	29
VII. RESULTADOS	30
1. La clonación del gen E6 de VPH-16 fue exitosa	30
2. Las secuencias de E6 y E6*I de VPH-AR (16 y 18) se expresan en células C33A.....	33
3. La actividad transcripcional de TCF aumenta por las proteínas E6 y E6*I de VPH-AR (16 y 18) en células C33A.....	35
VIII. DISCUSIÓN	37
IX. CONCLUSIONES	43
X. PERSPECTIVAS.....	44
XI. BIBLIOGRAFÍA	45
XII. ANEXOS.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico	PBS: Buffer de Fosfato Salino
ADNc: ADN complementario	PCP: Polaridad Celular
Akt: Ak Timoma (PKB- Proteína Cinasa B)	PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa
APC: Adenomatous polyposis coli	PKA: Proteína cinasa A
ARNm: Ácido ribonucleico	PKC: Proteína cinasa C
ATCC: American Type Culture Collection	pRb: Proteína del Retinoblastoma
ATP: Adenosil Trifosfato	RIPA: Buffer para ensayo de radioinmunoprecipitación
β - TrCP: Beta Transducina	rpm: reproducciones por minuto
BSA: Albumina de Suero Bovino	TAZ: Co-activador Transcripcional con motivo de unión a PDZ
CaCU: Cancer Cervicouterino	TBE: Tris/Borato/ EDTA
CaMKII: Cinasa dependiente de Ca ²⁺ / Calmodulina II	TBS: Tris Tamponado Salino
CBP: Proteína de unión a CREB	TBF-T: Tris Tamponado Salino con Tween
CER 1: Proteína erberus 1	TCF: Factor de células T
DED: Dominio Efecto de Muerte	Tm: Temperatura de fusión
Dlg: Discs-large	VP: Virus del papiloma
DO: Densidad óptica	VPH: Virus del Papiloma Humano
Dvl: Dishevelled	VPH-AR: Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo
E6AP: Proteína Asociada a E6	VPH-BR: Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo
E6-AR: E6 de VPH de alto riesgo	WB: Western blot
EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico	Wnt: Wingless- Int1
E6SM: Mutante en splicing de E6	YAP: Proteína Asociada a Yes
FOXM1: Forkhead box Protein M1	
Fzd: Frizzled	
GSK3β: Glicógeno Sintasa Cinasa 3 β	
HeLa: Henrietta Lacks	
hTERT: Telomerasa Reversa Transcriptasa Humana	
HS: Heparán Sulfato	
kDa: Kilodalton	
LB: Luria- Broth	
LCR: Región Larga de Control	
LEF: Factor de Unión al Potenciador Linfocitario	
LRP: Proteína Relacionada al Receptor de Lipoproteína	
MAGI: Guanilato cinasas asociada a membrana	
MCS: Sitio de Clonación Múltiple	
NFX1-91: Factor de transcripción Nuclear de unión a X-box 1-91	
ORF: Marco abierto de lectura	
pb: pares de bases	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad en el mundo y México por diferentes tipos de cáncer para el año 2012.....	2
Figura 2. Infección por VPH.....	5
Figura 3. Esquema del genoma del VPH-18.....	6
Figura 4. Vías de transformación mediadas por E6.....	10
Figura 5. Sitios donadores y aceptores de <i>splicing</i> dentro del ORF de E6 en los VPH-AR.....	11
Figura 6. Secuencia y estructura aminoacídica de E6 y E6*I de VPH-18.....	12
Figura 7. Esquematización de la vía de Wnt / β -catenina.....	16
Figura 8. Diseño de oligonucleótidos y secuencia codificante para E6 de VPH-16.....	30
Figura 9. Electroforesis en geles de agarosa del producto de amplificación de E6 de VPH-16 y restricciones del inserto con EcoRI y BglII.....	31
Figura 10. PCRs de colonias y verificación de la clonación de E6 de VPH-16.....	32
Figura 11. RT- PCR y Western Blot de E6 y E6*I de VPH-18 y 16 en células C33A transfectadas.....	34
Figura 12. Evaluación transcripcional de TCF en células C33A transfectadas con 50 ng de los plásmidos.....	35
Figura 13. Evaluación transcripcional de TCF en células C33A transfectadas con 100 ng de los plásmidos.....	36

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCU) constituye un serio problema de salud pública, ocupando la cuarta posición de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo. La infección por el virus de papiloma humano (VPH) se considera una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de CaCU. La participación de ciertos procesos celulares alterados por las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH-AR (Alto Riesgo) son requeridos para el establecimiento del fenotipo maligno. La proteína E6 es capaz de interactuar con diversas proteínas tales como factores de transcripción, proteínas involucradas en la arquitectura celular y apoptosis, llevándolas a su degradación y provocando, en consecuencia, la alteración de muchos procesos celulares. En particular, el transcrito del oncogen E6 de los VPH- AR presenta un procesamiento alternativo (*splicing*) el cual genera transcritos de menor tamaño denominados E6*. El papel de las proteínas E6* en el proceso de transformación aún no se conoce. Así mismo, una de las vías afectadas durante el desarrollo del CaCU es la vía de señalización Wnt/ β -catenina, donde se ha demostrado que la proteína E6 de VPH-16 aumenta la actividad transcripcional del factor TCF. El factor transcripcional TCF regula la expresión de genes involucrados con polaridad, proliferación y diferenciación celular cuando la vía de Wnt/ β -catenina se activa. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si las proteínas E6 y E6*1 de VPH-18, aumentan la actividad de TCF. El efecto de E6 y E6*1 se valoró realizando ensayos de actividad transcripcional mediante un vector reportero. En células de la línea C33A, se realizaron cotransfecciones de los plásmidos que contienen las secuencias del gen E6 de VPH-18, la mutante de *splicing* E6 (VPH-18), el fragmento E6*1 (VPH-18) y el gen E6 de VPH-16 con un plásmido reportero TOPFLASH que contiene sitios de unión a TCF acoplados al gen de luciferasa. Los resultados de actividad transcripcional, medida por ensayos de luciferasa, mostraron que las proteínas E6 y E6*1 de VPH-18 son capaces de provocar un aumento en la actividad transcripcional del factor TCF. Esto sugiere que E6 y E6*1 pueden ser elementos que contribuyan a la alteración de la vía de Wnt/ β -catenina.

I. INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología del cáncer cervicouterino (CaCU)

El cáncer cervicouterino (CaCU) representa un problema de salud pública siendo la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo. En el 2012, se registraron 528 000 nuevos casos, de los cuales se ha reportado que el 87% se producen en las regiones menos desarrolladas. Esta neoplasia ocupa la tercera posición en incidencia a nivel mundial (**figura 1**) (GLOBOCAN, 2012). La mayoría de las mujeres que desarrollan CaCU tienen una edad entre 45 a 50 años (Bosch y de Sanjosé, 2003).

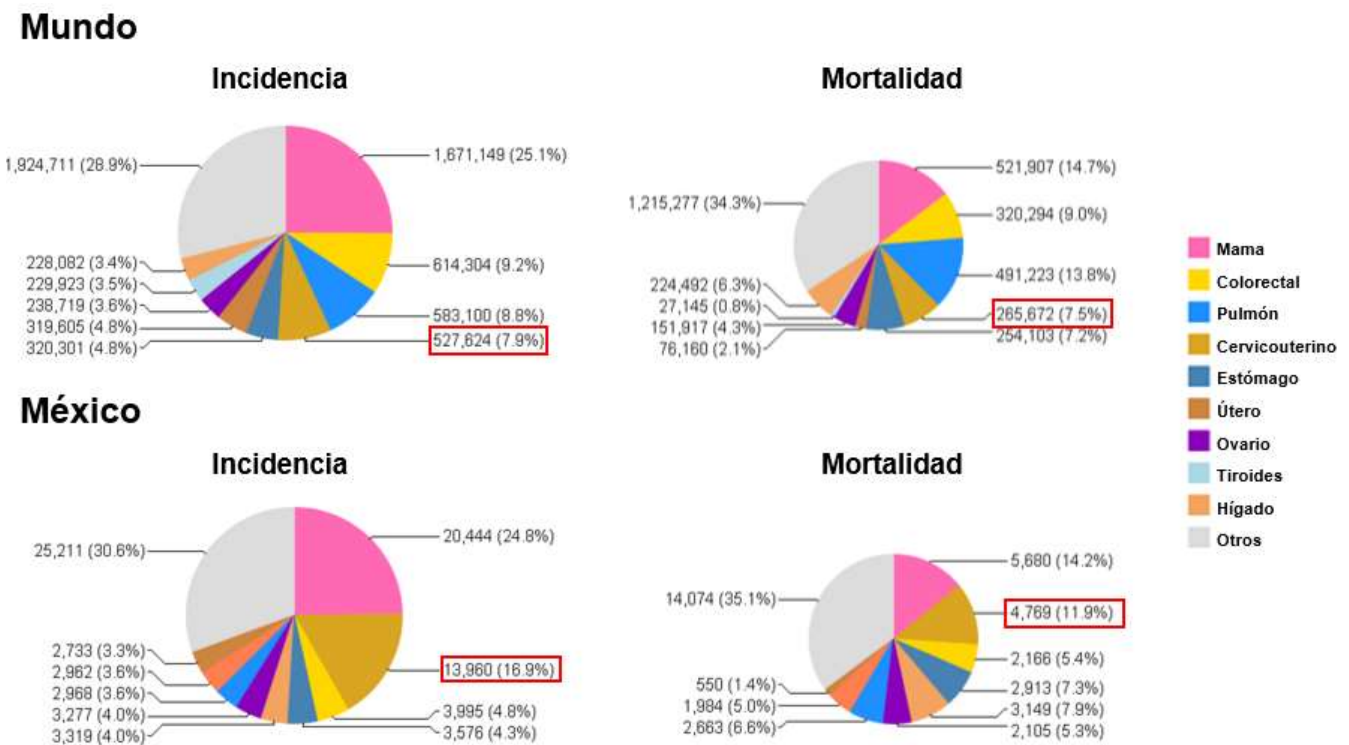


Figura 1. Incidencia y mortalidad en el mundo y México por diferentes tipos de cáncer para el año 2012. En los gráficos de pastel se observan en color mostaza las proporciones para los casos con CaCU. En cuadros rojos se resaltan el número de casos y el porcentaje. Imagen modificada de GLOBOCAN 2012.

En los países desarrollados, la incidencia y mortalidad disminuyeron de forma significativa en las últimas décadas debido al acceso a campañas de prevención y la detección temprana. Sin

embargo, en los países en vías de desarrollo no se ha observado esta tendencia, particularmente en América Latina, donde se han registrado las mayores tasas de mortalidad e incidencia por CaCU en el mundo (Bosch y de Sanjosé, 2003; Lewis, 2004). En el año 2000, en América Latina se estimaron 92,132 casos de cáncer de cuello uterino y 37,640 muertes (Lewis, 2004).

En México, en el año 2012, la incidencia de CaCU fue de 13,960 mujeres al año de las cuales murieron alrededor de 4769. Esta enfermedad fue la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres mexicanas, ocupando un 11.9 % de entre todas las neoplasias femeninas (GLOBOCAN, 2012) (**figura 1**). Sin embargo, en nuestro país, se reporta que existe una disminución en la mortalidad por CaCU, la cual es proporcional al aumento en la aplicación de la prueba del Papanicolaou y al menor índice de natalidad (Lazcano-Ponce *et al.*, 2008).

2. Virus del papiloma humano (VPH)

La infección persistente por el VPH es la causa necesaria para el desarrollo de CaCU (zur Hausen, 1996), mas no suficiente, ya que otros factores juegan un papel importante en el establecimiento del CaCU. Entre estos factores se encuentran el uso prolongado de anticonceptivos orales, tabaquismo, multiparidad, factores heredables, edad de inicio de vida sexual, variantes intratipo, entre otros. (Castellsagué y Muñoz, 2003; Giannoudis y Herrington, 2001).

Los virus del papiloma (VP) pertenecen a la familia *Papillomaviridae*. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza e infectan principalmente a mamíferos, y en menor cantidad a reptiles y aves (Rector y Ranst, 2013). Los VPHs se clasifican taxonómicamente de acuerdo a la similitud entre las secuencias del gen que codifica a la proteína estructural de la capsida L1, que es el más conservado dentro del genoma viral. Los géneros comparten menos del 60% de homología, las especies entre el 60-70%, los tipos entre un 71- 89%. Cuando existe un 90-98% de homología se reconoce un subtipo, y al encontrar más de 98% de similitud en las secuencias se habla de una nueva variante (Burd, 2003). Hasta el momento, se han descrito alrededor de

170 tipos virales, pero se han identificado otros posibles (Papillomavirus Episteme PaVE pave.niaid.nih.gov, 2014).

Según la clasificación que realizó Bernard y colaboradores en el 2010, hasta ese año, se habían identificado 29 géneros formados por 189 papillomavirus, de los cuales 120 son VPHs (Bernard *et al.*, 2010). Se consideran de importancia médica aquellos papillomavirus humanos que se encuentran dentro del género α -papilloma virus, debido a que son los que inducen lesiones en epitelios genitales tanto mucosos como escamosos (Bernard, 2005).

De acuerdo al potencial oncogénico de los distintos tipos de VPH se han clasificado en: de Bajo Riesgo (VPH-BR) a los que se asocian con verrugas y displasias benignas y de Alto Riesgo (VPH-AR) a los que se relacionan con el desarrollo de carcinoma cervical (Veríssimo *et al.*, 2013). Algunos de los tipos virales más frecuentes que incluyen a los VPHs de Bajo Riesgo son 6, 11, 42, 43 y 44, mientras que son 12 tipos de VPHs los de Alto Riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, y 59 (Doorbar *et al.*, 2012; Bernard *et al.*, 2013).

Los tipos de VPH que se han encontrado con mayor frecuencia en aproximadamente el 70% de los carcinomas son los tipos 16 y 18 (de San José *et al.*, 2010). El VPH-16 es el tipo más frecuente en tumores que se desarrollan en el epitelio escamoso del ectocérnix. Mientras que el VPH-18 es el más frecuente en adenocarcinomas, tumores que se generan en células glandulares productoras de mucosidad en el endocérnix (Clifford *et al.*, 2003).

2.1 Ciclo de vida del VPH

Para que se lleve a cabo el ciclo de vida del VPH, se necesitan diferentes factores, tales como, el sitio de infección epitelial y la presencia de hormonas y citocinas (Doorbar, 2012). La infección inicial necesita el acceso e interacción de partículas virales con las células de la capa basal, por lo que se requiere de pequeños cortes o abrasiones en el tejido epitelial (Doorbar, 2005). Se ha planteado que la infección por VPH se establece primordialmente en la zona de transformación, justo donde se encuentran las células que forman la unión escamoso-columnar, que formarán finalmente las capas epiteliales estratificadas del cérvix maduro (**Figura 2**) (Doorbar, 2012).

La unión inicial del virus con la célula infectada posiblemente es por medio de la laminina 5 presente en la matriz extracelular (Culp, *et al.*, 2006). Así mismo, estudios *in vivo* han demostrado que los VPHs se unen a los proteoglicanos asociados a heparán sulfato (PGHP) presentes en la superficie de las células de la membrana basal para realizar una infección eficiente (Giroglou *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2009). Como receptores secundarios se han sugerido a la integrina $\alpha 6$ y receptores de factores de crecimientos (Doorbar, 2012), los cuales se asocian con PGHP y con las proteínas estructurales de la cápside de VPH: L1 y L2. Tal asociación provoca un cambio estructural en la cápside del virión, lo que permite el corte y exposición del N-terminal de la proteína L2 (Raff *et al.*, 2013).

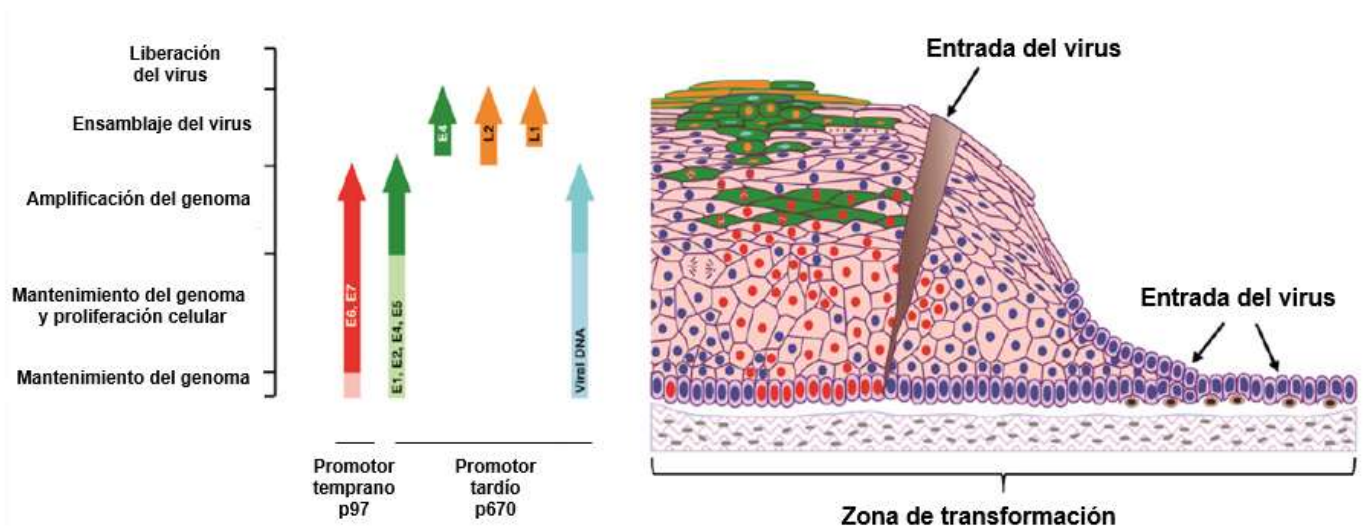


Figura 2. Infección por VPH. A través de pequeñas abrasiones en el tejido epitelial del cérvix, el VPH puede infectar las células de la capa basal que posteriormente formarán el epitelio estratificado. Las proteínas virales se expresan secuencialmente con la diferenciación del epitelio (Imagen modificada de Doorbar *et al.*, 2012).

Después de la unión inicial a la superficie celular, se ha propuesto que la cápside viral se une a la anexina A2 (Woodham *et al.*, 2012) y que la internalización del virus (al menos demostrado en los tipos: 16 y 31) se lleva a cabo por endocitosis independientemente de clatrina, caveolina, balsas lipídicas, flotilina y dinamina, pero dependiente de la polimerización dinámica de actina (Schelhaas *et al.*, 2012).

Recién infectadas las células basales del epitelio cervical, se distinguen cinco fases durante el ciclo de vida del VPH: el mantenimiento del genoma, la proliferación celular, la amplificación del genoma, el ensamblaje del virus y su liberación (Doorbar, 2012) (**Figura 2**). En la mayoría de los casos (90%), la infección por VPH es transitoria y suele eliminarse naturalmente por el sistema inmune del portador (Lizano *et al.*, 2009); sin embargo, cuando la infección es persistente, el grado de la neoplasia puede avanzar hasta culminar en un cáncer invasor (Rodríguez *et al.*, 2010).

2.2 Organización del genoma del VPH

El VPH es un virus pequeño, sin envoltura y mide aproximadamente 55 nm de diámetro. Está conformado por una cápside icosaédrica constituida de 72 capsómeros, de los cuales 60 son hexámeros y 12 son pentámeros (Buck *et al.*, 2013) (**Figura 3A**).

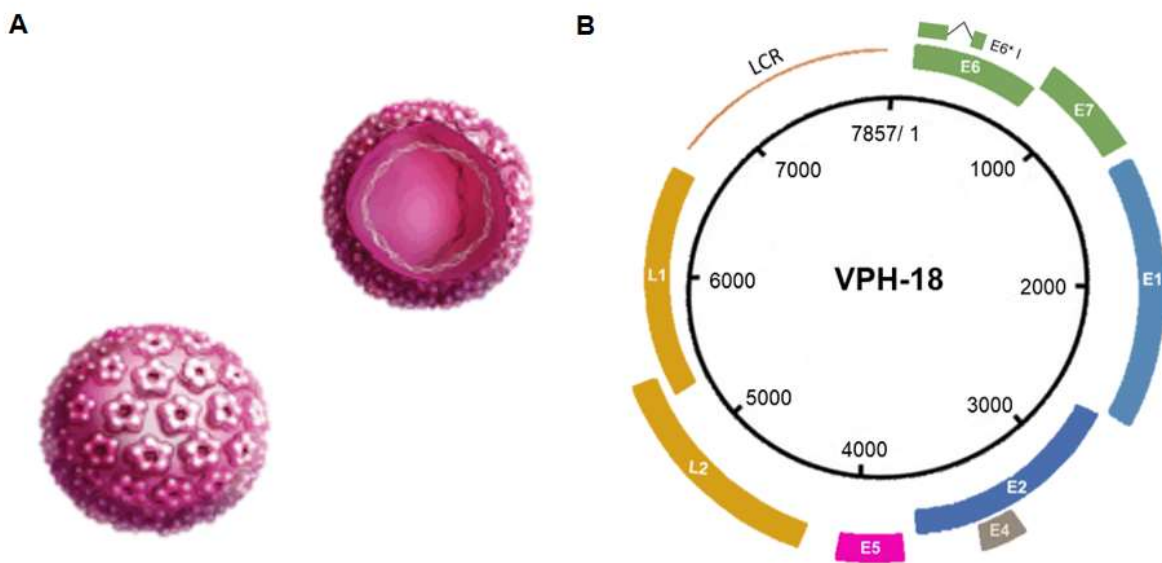


Figura 3. Esquema del genoma del VPH-18. A) Estructura de VPH. Se muestra la partícula viral y el genoma episomal en el interior B) El genoma del VPH se divide en tres regiones: la región larga de control LCR, la región temprana que contiene a los genes E1-E7 y la región tardía que contiene a los genes L1 y L2.

El genoma de VPH-18 consiste en un ADN circular de doble cadena con un tamaño de 7857 pares de bases. Para su estudio, se ha dividido en tres regiones: a) Región larga de control (LCR): la cual no posee marco de lectura abierta, se encarga de la regulación de la transcripción y replicación viral, b) Región temprana: que contiene marcos de lectura abierta que codifican proteínas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) involucradas en la replicación y mantenimiento de genoma viral, c) Región tardía: codifica para proteínas (L1 y L2) formadoras de la cápside viral (zur Hausen 1996; Burd, 2003) (**Figura 3B**).

Proteína L1 y L2

L1 y L2 son las proteínas estructurales de la cápside de los VPHs (Doorbar *et al.*, 2012). L2 posee alrededor 500 aminoácidos de longitud, lo que corresponde a un peso de 55 kDa; es el componente minoritario de la cápside y desempeña un papel importante en el inicio de la infección al introducir el ADN viral en el núcleo, y así mismo, en las etapas tardías puede ayudar en la encapsidación del genoma viral (Wang y Roden 2013). L1 es la proteína mayoritaria, pesa alrededor de 57 kDa, se expresa después de L2; la cápside viral presenta 60 copias de esta proteína y alrededor de 12 copias de L2 formando 72 capsómeros (Buck *et al.*, 2013).

Proteína E1

La proteína E1 es la más conservada entre los distintos tipos VPHs y la que presenta mayor longitud, con alrededor de 593-681 aminoácidos y con un peso 67.5 -76.2 kDa dependiendo del tipo viral (Wilson *et al.*, 2002). E1 es una proteína con actividad helicasa dependiente de ATP necesaria en la replicación del ADN viral, se divide en tres regiones: una región amino terminal, una región espaciadora de longitud variable dependiendo el tipo viral, y una región carboxilo terminal con actividad ATPasa y helicasa (Bergvall *et al.*, 2013).

Proteína E2

La proteína E2 es nuclear y codifica para una proteína de 52 kDa. Participa en la replicación y la regulación transcripcional de los oncogenes E6 y E7. Presenta tres regiones funcionales: en el extremo amino terminal se encuentra el dominio de activación, una región central de bisagra rica en prolinas, y el extremo carboxilo terminal donde reside su sitio de unión al ADN y de dimerización (Vosa *et al.*, 2012).

Proteína E4

El gen E4 se encuentra dentro del marco abierto de lectura (ORF) de E2 y aunque su marco de lectura se ubica en la región temprana, éste se expresa como un gen tardío debido a que se encuentra regulado por un promotor que responde a factores de diferenciación (Wang *et al.*, 2009). E4 se sintetiza a partir del ARNm E1^{E4}, resultando una secuencia de aproximadamente 260 pb (pares de bases) con un peso que varía de 10 a 34 kDa dependiendo del tipo viral (Roger-Gaillard *et al.*, 1992). Esta proteína se expresa durante las etapas tardías del ciclo viral, acumulándose en células diferenciadas de las capas epiteliales superiores donde provoca la ruptura de filamentos de queratina del citoplasma, permitiendo la liberación de viriones (Doorbar, 2013).

Proteína E5

El gen E5 presenta una longitud de aproximadamente 250 pb y codifica para una proteína de 83 aminoácidos con un peso menor a 10 kDa (Venuti *et al.*, 2011). Es una proteína de membrana e hidrofóbica con bajos niveles de expresión. Cuando se sobre-expresa se ubica preferentemente en el retículo endoplásmico, envoltura nuclear, y en el aparato de Golgi (Conrad *et al.*, 1993). Aunque su potencial transformante es débil, se ha demostrado que E5 inhibe la degradación de EGFR provocando el incremento de la proliferación celular (Bouvard *et al.*, 1994). Esta función de E5 está relacionada con su capacidad de unión a la subunidad de 16 kDa de V-ATPasa, lo que resulta en la alteración de la acidificación de endosomas y la retención del receptor EGFR (Straight *et al.*, 1995).

Proteína E7

E7 es una proteína pequeña de aproximadamente 100 aminoácidos con un peso de 11 a 17 kDa dependiendo del tipo viral (Armstrong y Roman, 1992). Posee en su extremo amino terminal sitios de fosforilación consenso para la caseína cinasa II, y en su carboxilo terminal, un dominio de unión a zinc, el cual utiliza para su dimerización (Roman y Munger, 2013).

Las proteínas E7 de VPH-AR, contienen tres dominios conservados CR1, CR2 y CR3 que son esenciales para su actividad transformante (Todorovic *et al.*, 2012). Un motivo conservado Leu-X-Cys-X-Glu (LXCXE) en el dominio CR2, es necesario y suficiente para la asociación de la

proteína E7 con la proteína supresora de tumores pRb (McLaughlin-Durbin y Münger, 2009) Tal asociación permite que E7 degrade a pRb vía proteosoma, y provoque la entrada inmediata a la fase de síntesis del ADN y promueva la proliferación celular (Boyer *et al.*, 1996).

3. La proteína E6

El gen E6 presenta una longitud de 450 a 500 pb y codifica para una proteína de aproximadamente 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa, posee dos dedos de zinc unidos por un interdominio de 36 aminoácidos y se encuentran flanqueados por un dominio amino terminal hidrofílico y un dominio carboxilo terminal corto, que en el caso de los tipos de VPHs-AR contienen un motivo de unión a proteínas con dominio PDZ (Thomas *et al.*, 1999). Los dos dominios dedos de zinc se contraponen entre sí simétricamente y junto con el interdominio forman una hélice que contribuye a su rigidez (Howie *et al.*, 2009).

E6 es uno de los genes que se expresan tempranamente durante el ciclo viral y su capacidad transformante está mediada por su interacción con diferentes proteínas celulares las cuales median la transcripción, la diferenciación celular, las vías de señalización apoptóticas, las uniones celulares, la polaridad y el control del ciclo celular (Tungteakkhun y Duerksen, 2008).

3.1. Funciones de la proteína E6

Las proteínas E6 de VPH-AR se unen a la proteína p53 e inducen su degradación a través de la vía de ubiquitina, por medio de la formación de un complejo con la proteína celular asociada a E6 (E6AP) también conocida como ubiquitin ligasa 3 (Narisawa- Saito y Kiyono, 2007) (**Figura 4**). Independiente de la degradación de p53, E6 puede inducir la retención de p53 en el citoplasma, impidiendo que se transloque al núcleo y con ello inhibiendo su función (Mantovani y Banks, 2001).

El complejo E6/E6AP lleva a la inmortalización impidiendo la senescencia por medio de la degradación de NFX1-91, que normalmente reprime la transcripción de la subunidad catalítica hTERT de la telomerasa celular (Gewin *et al.*, 2004). Así mismo, E6 puede afectar a proteínas

que contienen dominios PDZ provocando la pérdida de la polaridad celular y de uniones celulares (Mantovani y Banks, 2001).

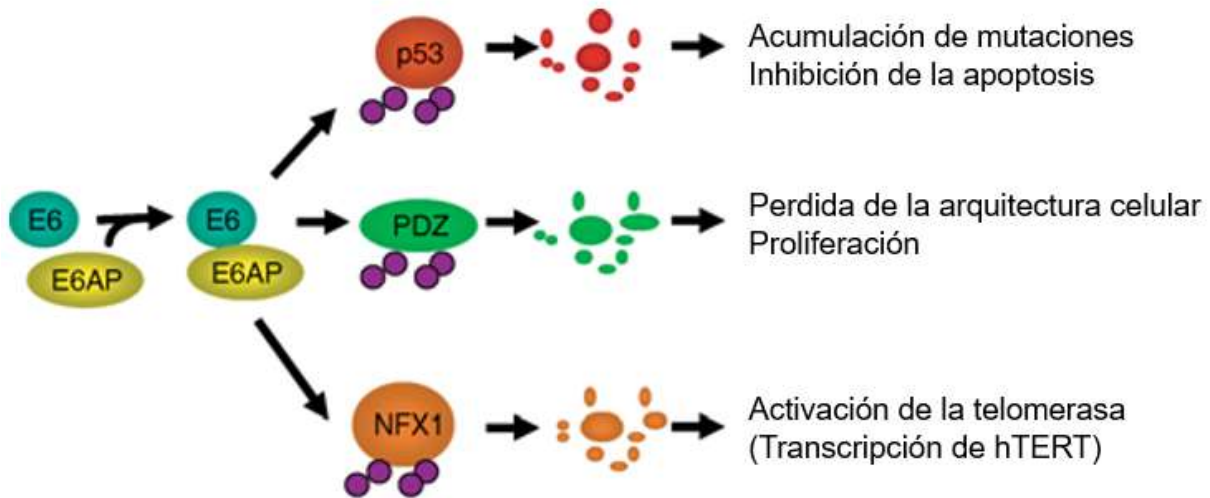


Figura 4. Vías de transformación mediadas por E6. El complejo E6/E6AP genera la degradación de p53, proteínas con dominio PDZ y NFx1. Imagen tomada de Narisawa- Saito y Kiyono, 2007.

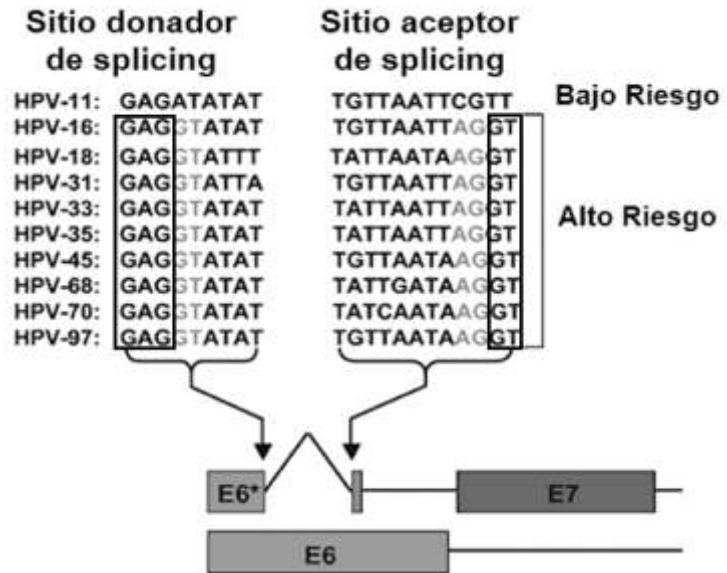
3.2. Procesamiento alternativo de E6

A diferencia de los ARNm (ARN mensajero) monocistrónicos que codifican los VPHs-BR, los VPHs-AR son bicistrónicos (Smotkin *et al.*, 1989); el ARNm E6/E7 de VPH-AR sufre procesamiento alternativo o *splicing* que genera transcritos pequeños codificados por el gen de la oncoproteína E6. Dentro del ORF de E6, hay un sitio donador altamente conservado y la mayoría, aunque no todos, también tienen un sitio aceptor de *splicing* conservado ubicado antes del inicio de E7, esto permite la remoción de un fragmento, dando como resultado un ARNm denominado E6* (**Figura 5**) (Pim *et al.*, 2009)

Existe evidencia que en líneas celulares derivadas de tumores de cérvix que presentan los VPHs 16 y 18, los ARNm que no realizan *splicing*, codifican a E6 de longitud completa, mientras que los ARNm que llevan a cabo *splicing* codifican para E7 y además E6* (Tang *et al.*, 2006). Cuando se hacen construcciones con el gen completo de E6, después de la transfección

transitoria en células de mamífero, se expresan generalmente altos niveles del ARNm para E6* (Pim *et al.*, 2009).

Figura 5. Sitios donadores y aceptores de *splicing* dentro del ORF de E6 en los VPH de alto riesgo. En los cuadros negros se indican los sitios donadores y aceptores de *splicing*. Imagen tomada y modificada de Pim *et al.*, 2009.



4. Proteína E6*I

La proteína E6*I es la versión de E6 con el carboxilo terminal truncado. E6*I se obtiene como resultado del procesamiento alternativo del transcrito de E6, dando lugar a un transcrito de menor tamaño. Según la posición del aceptor de *splicing*, en VPH-16 los patrones de *splicing* permiten la expresión de más de cuatro especies de E6*, (Ajiro *et al.*, 2012) mientras que por poseer solo un sitio de *splicing* el VPH-18, genera sólo una especie de ARNm que expresa E6*I (Pim *et al.*, 2009).

En la **figura 6A** se comparan las secuencias aminoacídicas de E6 y E6*I de VPH-18. Se observa que E6*I comparte 44 aminoácidos con la proteína E6 de longitud completa, antes del primer sitio donador de *splicing*, lo que después ocasiona que E6*I posea 13 aminoácidos únicos que derivan de las secuencias intrónicas de E6 (Pim *et al.*, 2009). A partir de este cambio en el marco de lectura, se genera un nuevo codón de paro que forma finalmente una proteína de 57 aminoácidos. El polipéptido E6*I conserva sólo la mitad del motivo de unión a zinc en el extremo amino terminal y no logra formar ninguno de los dedos de zinc característicos de E6 completo

(Figura 6B), de tal manera que el motivo de unión a dominios PDZ se pierde (Pim *et al.*, 2012). Hasta la fecha, no se conoce la estructura tridimensional de E6*1, sin embargo, se ha demostrado que es capaz de formar oligómeros y presentar diferentes conformaciones dependiendo del pH, disponibilidad de zinc y estado redox (Heer *et al.*, 2011)

A

150 aminoácidos de E6

MARFEDPTRR PYKLPDLCTE LNTSLQDIEI TCVYCKTVLE LTEVFEFAFK DLFVVYRDSI
 PHAA**CHKC**ID FYSRIREL RH YSDSVYGD TL EKL TNGLYN LLIR**CLRCQK** PLNPAEKL RH
 LNEKRRFHNI AGHYRG**QCHS** **CCNRARQERL** **QRRR****ETQV**

57 aminoácidos de E6*

MARFEDPTRR PYKLPDLCTE LNTSLQDIEI TCVYCKTVLE LTE**VPAVPET VESSRKT**

B

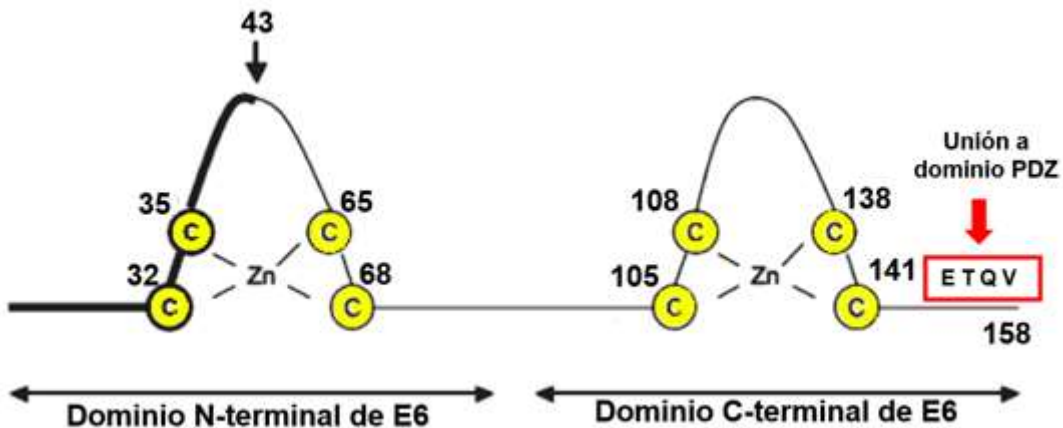


Figura 6. Secuencia y estructura aminoacídica de E6 y E6*1 de VPH-18. A) Secuencia de aminoácidos de E6 y de E6*1. En amarillo se marcan las cisteínas involucradas en la formación de los dedos de zinc. En rojo se señala el motivo de unión a dominios PDZ. En verde se muestran los aminoácidos de E6*1 generados después del *splicing* alternativo de E6. **B)** Representación esquemática de E6 con una línea negra delgada, y con una línea negra gruesa se indican los 43 aminoácidos que comparte E6 con E6*1 antes del sitio de *splicing*. El polipéptido E6*1 no logra formar ninguno de los dos dedos de zinc presentes en E6 completo. Imagen modificada de Heer *et al.*, 2011.

4.1. Funciones de E6*I

En un inicio, E6*I estaba asociado a tumores malignos infectados por VPH, por lo que se asumía que presentaba propiedades oncogénicas (Schneider-Gadicke *et al.*, 1986). Sin embargo, poco después se supo que la expresión de E6* con E6 y E7 no induce la inmortalización en queratinocitos (Sedman *et al.*, 1991).

Posteriormente, Pim y colaboradores (1997) demostraron que la expresión E6*I de VPH-18 tenía un efecto antiproliferativo en células positivas a VPH. Este efecto lo atribuyeron a la capacidad de E6*I de unirse a E6, así como a E6AP, lo que causaba una disminución en la degradación de p53. Así mismo, por medio de análisis mutacional, observaron que la región de E6*I para unirse a E6 y E6AP es la misma y se compone de 20 aminoácidos, además señalaron que el efecto antiproliferativo de E6*I es debido a la inducción de la apoptosis de manera dependiente a p53 (Thomas *et al.*, 1999).

Fillipova y colaboradores encontraron que E6 de VPH-16 se une a procaspasa 8 y acelera su degradación, mientras que la unión a E6*I a esta procaspasa la estabiliza (Fillipova *et al.*, 2007). Recientemente, se demostró que las proteínas E6 y E6*I de distintos tipos de VPH son capaces de interactuar con procaspasa 8 mediante el DED (Dominio efector de muerte), y a su vez la activan e inducen su translocación al núcleo (Manzo *et al.*, 2014).

En otro estudio, realizado en el 2009, demuestran que E6*I de VPH-18 interviene en la estabilidad de proteínas con dominio PDZ, tales como Akt, Dlg, MAGI-1, MAGI-2 y Scribble. Observaron que en presencia de E6*I se reducen los niveles de expresión Akt, Dlg, y Scribble en ausencia de E6 de longitud completa. La disminución en la expresión de Akt y Dlg, no requiere una interacción directa con E6*I, por lo que atribuyeron este efecto a proteínas relacionadas con su regulación (Pim *et al.*, 2009).

Recientemente, se demostró que la sobre expresión de E6*I de VPH-16 conduce a la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo murino, lo cual sugiere que puede actuar como un anti-oncogen *in vivo* (Fillipova *et al.*, 2014).

Pocos son los estudios que se han realizado para conocer las funciones de E6*1, y de ellos no se ha definido como una proteína oncogénica o supresora de tumores. Es por ello, que es necesario esclarecer el papel que lleva a cabo en el desarrollo del CaCU.

5. Vía de señalización Wnt

La vía de Wnt, tiene una participación fundamental durante el desarrollo, así como, la diferenciación, proliferación, adhesión y polaridad celular (Logan y Nusse, 2004). El termino Wnt es un acrónimo derivado del gen *wingless* (*wg*) responsable de la polaridad segmentaria en *Drosophila melanogaster* y del gen *Int-1* de ratón, que estimula la aparición de tumores de mama cuando se activa por la integración del virus MMTV (Nusse *et al.*, 1991). Actualmente, se conocen tres vías que son activadas después del acoplamiento de ligandos Wnt a sus receptores: la vía canónica de Wnt/ β -catenina, y dos vías no canónicas que no dependen de β -catenina: la vía de Wnt/ Ca^{+2} y la vía de polaridad celular planar.

La vía de Wnt/ Ca^{+2} conduce a la liberación de iones calcio para activar a las enzimas fosfolipasa C (PLC), proteína cinasa C (PKC), y calmodulina dependiente de Ca^{+2} (CAMKII). Esta vía regula principalmente la adhesión y motilidad celular (Antara De, 2011; Huelsken y Juergen, 2002). La vía de polaridad celular interviene en la reorganización del citoesqueleto para establecer la polaridad celular. Esta vía es requerida durante el cierre del tubo neural y la extensión de la cóclea del oído interno (Qian *et al.*, 2007).

En el genoma humano, han sido identificados 11 receptores de la familia Frizzled (Fzd), que incluye a Fzd1-Fzd10 y *smo*, así como, a 2 coreceptores LRP 5 y 6. Para estos receptores, se han descrito 19 ligandos Wnt, de los cuales los ligandos Wnt 1, 2, 3, 3a, 7a, 8, y 10b activan la vía canónica, mientras que la activación de las vías no canónicas es mediada por los ligandos Wnt 4, 5a, y 11 (<http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>).

Los genes Wnt codifican para un grupo altamente conservado de glicoproteínas ricas en cisteína; su insolubilidad se debe a que estas proteínas se encuentran palmitoiladas (Willert *et*

al., 2003). Las proteínas Wnt, secretadas al medio extracelular actúan como ligandos que se unen a receptores membranales de la familia Frizzled (Fzd), de siete dominios transmembranales y a su correceptor LRP5/6. Los ligandos Wnt y los receptores Frizzled tienen diferentes efectos dependiendo de la combinación y cantidad.

5.1. Vía canónica de Wnt/ β -catenina

a) Vía inactiva:

En ausencia del ligando Wnt, la proteína β -catenina citoplasmática es degradada por un complejo multiprotéico funcional conformado por la proteína de andamiaje Axina, CK1 α (caseína cinasa 1 α), GSK3 β (glucógeno sintasa cinasa 3 β), y APC (poliposis coli adenomatosa). El extremo amino terminal de β -catenina es fosforilado por la enzima CK1 α en la Ser45, lo que a su vez permite la fosforilación de GSK3 β en las Ser33, Ser37 y Thr41 (Liu *et al.*, 2002). Por su parte, APC incrementa la afinidad del complejo de degradación hacia β -catenina (Xing *et al.*, 2004). Las fosforilaciones del amino terminal de β -catenina, generan que YAP/TAZ reclute a β -TrCP (Beta Transducina) para provocar la ubiquitinización de β -catenina y su posterior degradación vía proteosoma (Azzolin *et al.*, 2014; Aberle *et al.*, 1997). La supresión de los niveles de β -catenina, permite que en el núcleo, la proteína Groucho se acople libremente al complejo transcripcional TCF/LEF, evitando la actividad transcripcional (Fisher y Caudy, 1998) (**Figura 7A**). Los inhibidores extracelulares de la vía de Wnt actúan en la membrana celular evitando las interacciones ligando-receptor. Se clasifican en dos grupos funcionales: el primero incluye la familia de proteínas secretadas relacionadas con Frizzled (SFRP1-5) y a las proteínas que se unen directamente a los ligandos Wnt como son: el factor inhibidor 1 de Wnt (WIF-1) y la proteína cerberus (CER1). El segundo grupo incluye la familia DKK, que son proteínas que inhiben la señalización uniéndose a los receptores LRP5/6 (He *et al.*, 2005).

b) Vía activa:

La vía de señalización canónica se activa cuando el ligando Wnt se une al complejo de receptores Fzd y LRP5/6, lo que provoca la hiperfosforilación de la proteína intracelular Dishevelled (Dvl), y promueve su interacción con Frizzled (**Figura 7B**). El complejo Dvl/Fzd, se cree que facilitan la fosforilación de la región intracelular de LRP6 por CK1 α y GSK3 β

(MacDonald *et al.*, 2009) Como consecuencia, este complejo recluta la proteína de andamiaje Axina, lo que permite la disociación del complejo de degradación y la liberación de β -catenina. Tal proceso, resulta en la acumulación en el citoplasma y la translocación de β -catenina al núcleo. La unión de β -catenina con FOXM1 promueve su translocación al núcleo (Gong *et al.*, 2012), donde β -catenina se une a miembros de la familia de TCF/LEF. El complejo TCF/ β -catenina modifica la asociación de TCF con los corepresores tales como Groucho/TLE (Daniels y Weis, 2005), permitiendo su interacción con coactivadores como CREPT, FHL2, CBP/p300 (Zhang *et al.*, 2014; Labalette *et al.*, 2004) y remodeladores de la cromatina como Brg-1 (Barker *et al.*, 2001). Este evento permite que se promueva la transcripción de genes relacionados con polaridad celular, diferenciación y proliferación, tales como, c-jun, c-myc, Cyclin D, Axin-2, Tcf-1 y β -catenina (<http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>).

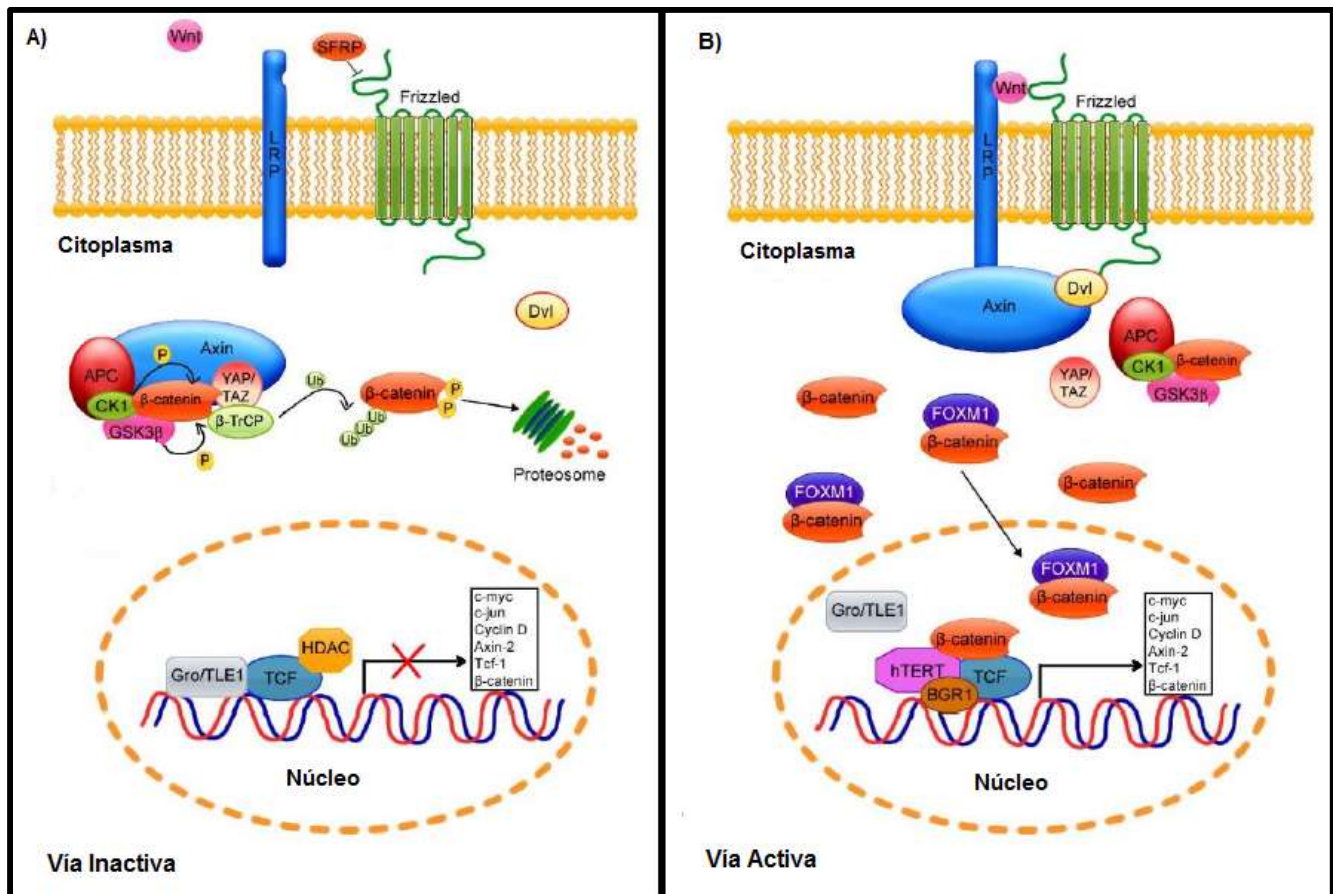


Figura 7. Esquematización de la vía de Wnt / β -catenina. A) La vía está inactiva cuando el ligando Wnt no se encuentra unido al receptor Frizzled lo que conlleva a la degradación de β -catenina vía proteosoma. **B)** La vía se activa una vez que el ligando Wnt dimeriza con Frizzled lo que provoca la estabilización de β -catenina y su translocación al núcleo (Imagen modificada de Muñoz-Bello *et al.*, 2015)

5.2 Vía de Wnt/ β -catenina en Cáncer

Las mutaciones que promueven la activación constitutiva de la vía de señalización Wnt, conducen al desarrollo de neoplasias humanas. Generalmente, en cáncer, las alteraciones de las diferentes moléculas involucradas en la vía de Wnt provocan la inapropiada estabilización y acumulación de β -catenina, así como el aumento de la expresión génica mediada por TCF (Sominski *et al.*, 2014).

Por ejemplo, la mayoría de los casos con cáncer de colon presentan mutaciones que provocan la pérdida de función del gen APC (Luo *et al.*, 2007). Sin embargo, en un estudio donde se analizaron tumores colorrectales que carecen de las mutaciones en APC, la probabilidad de encontrar una mutación en el gen de β -catenina (CTNNB1) aumentó considerablemente (Sparks *et al.*, 1998). Por otro lado, las mutaciones que producen la pérdida de función en el gen Axina se han visto relacionadas con carcinoma de células escamosas de colon, meduloblastoma y carcinoma hepatocelular (Ochoa- Hernández *et al.*, 2012). La alteración de esta vía en cáncer de mama es principalmente debido a la sobre-expresión de los ligandos Wnt y receptores Fzd (Howe y Brown 2004). Así mismo, la expresión aberrante de los ligandos Wnt se ha visto implicado en otros tipos de cáncer como leucemia, gástrico, pulmón (Ge y Wang, 2010; White *et al.*, 2012; Nakashima *et al.*, 2012) y recientemente en CaCU (Lin *et al.*, 2014; Ramos-Solano *et al.*, 2015). En el caso de CaCU, se conoce poco acerca de la vía de Wnt canónica, no obstante, recientemente se han descrito diferentes alteraciones que participan en el establecimiento de la carcinogénesis cervical.

II. ANTECEDENTES

1. Alteración de la vía de Wnt/ β -catenina en cánceres asociados a VPH

En biopsias de pacientes con CaCU, se ha observado que la acumulación de β -catenina en el citoplasma y núcleo se relaciona con la progresión tumoral (Üren *et al.*, 2005; Shinohara *et al.*, 2001). Por medio de análisis de perfiles de expresión a partir de biopsias de CaCU, Perez-Plasencia y colaboradores (2007) identificaron la sobre-expresión de genes que mantienen la regulación de la vía como son JUN, MYC, FZD2, RAC1, GSK3 β , Dvl-1 y CTNNB1 (Perez-Plasencia *et al.*, 2007).

Existe evidencia de una posible relación entre la expresión de las oncoproteínas de VPH-AR y la alteración en la vía canónica de Wnt. En diferentes estudios, se han observado que los oncogenes se pueden unir y alterar las funciones de proteínas involucradas en esta vía. Específicamente, se demostró que la represión de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16 en células de carcinoma de orofaringe, reduce los niveles de β -catenina nuclear, así mismo, la actividad transcripcional de TCF se reduce al silenciar dichas oncoproteínas (Rampias *et al.*, 2010).

En un modelo murino con ratones transgénicos, se encontró que la activación de la vía de Wnt puede ser inducida por E6 de VPH-16 (Bonilla *et al.*, 2012). Un posible mecanismo por el cual E6 pudiera activar esta vía, es por sus efectos en proteínas con dominios PDZ, como Dlg1 y Scribble, que participan en las adhesiones celulares y se asocian con APC en una región necesaria para su actividad como supresor de tumores (Bonilla *et al.*, 2012). Por otro lado, se observó que E6 del VPH-16 aumenta significativamente la actividad de TCF, dependiente de la participación de E6AP y del proteosoma pero independiente de la acumulación nuclear de β -catenina y de su unión a proteínas con dominios PDZ (Litchtig, *et al.*, 2010). Recientemente, Sominski y colaboradores (2014) demostraron que E6AP estabiliza a E6 en células activadas por Wnt y mejora el incremento de la actividad transcripcional de TCF, independientemente de su actividad catalítica de ubiquitin ligasa (Sominski *et al.*, 2014).

III. JUSTIFICACIÓN

Una de las vías afectadas en CaCU es la vía de señalización Wnt/ β -catenina, donde se ha demostrado la participación de la proteína E6 de VPH-16 en el aumento de la actividad transcripcional de TCF. Ya que hasta el momento se desconocen los efectos de las proteínas E6 y E6*1 de VPH-18 sobre la modulación de la actividad de TCF y debido a que el VPH-18 es el segundo lugar más frecuentemente asociado a CaCU, es relevante evaluar los efectos involucrados en este proceso.

IV.HIPÓTESIS

Las proteínas E6 y E6*I de VPH-18 pueden aumentar la actividad transcripcional de TCF de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina en células C33A.

V.OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de E6 y E6*I del VPH-18 en la actividad transcripcional de TCF de la vía señalización Wnt/ β -catenina en células C33A

Objetivos particulares

- Construir un plásmido con la secuencia de E6 de VPH-16 como control.
- Evaluar la expresión de los transcritos de E6, E6SM y E6*I de VPH-18 además de E6 de VPH-16.
- Evaluar la expresión de las proteínas de E6, E6SM y E6*I de VPH-18 además de E6 de VPH-16.
- Establecer el efecto de E6 y E6*I de VPH-18 sobre la actividad transcripcional de TCF.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo Celular

En este trabajo se utilizaron las células C33A, que son de origen epitelial derivadas de biopsias de carcinoma cervical y no presentan secuencias genómicas de VPH. Como controles positivos se usaron células CaSki (carcinoma cervical positiva para VPH-16) y HeLa (carcinoma cervical positiva para VPH-18). Las células CaSki contienen en su genoma de 60 a 600 copias de VPH-16. Las células HeLa, presentan en su genoma de 10 a 50 copias de VPH-18. Estas líneas celulares, se crecieron en medio de cultivo DMEM-F12 (Gibco®), suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF) de Gibco ® a una temperatura de 37 °C al 5 % de CO₂.

2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados de E618, E6SM (18) y E6*1 (18) fueron construidos previamente en el laboratorio (Olmedo Nieva, 2015). Estos plásmidos fueron clonados en el vector p3XFLAG-CMV-10 (**anexo 7**).

3. Diseño de Oligonucleótidos

Se buscó la secuencia del gen que codifica a la proteína E6 de VPH-16 en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos específicos para su amplificación (**anexo 6**). Para tal diseño se consideraron las siguientes características:

- Tamaño de los oligonucleótidos: Entre 18 y 30 nucleótidos cada uno.
- Contenido en G+C: Entre un 40 a 60 %.
- Temperatura de fusión (T_m): De 50 a 65 °C y menos de 5 °C de diferencia entre ambos oligonucleótidos.
- Secuencias complementarias. Evitar autocomplementaridad entre oligonucleótidos y la formación de dímeros.

- 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 ADN genómico

Para purificar el ADN de las células se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue Kit de Quiagen. Se realizó el procedimiento indicado por el fabricante: se añadió 20 µl de proteinasa K y 200 µl de buffer AL a la muestra, se mezcló por vortex y se incubó a 70 °C por 10 minutos. Posteriormente, se agregó 200 µl de etanol al 100 % y se mezcló por vortex. Se transfirió la mezcla dentro de una columna con un tubo colector de 2 ml. Después se centrifugó a 8 000 rpm durante un minuto, se descartó el sobrenadante y el tubo colector. Se movió la columna a un nuevo tubo colector y se adicionó 500 µl de Buffer AW1, se centrifugó por 3 minutos a 10 000 rpm y se descartó el sobrenadante. Nuevamente, se movió la columna a otro tubo colector y se adicionó 500 µl de Buffer AW2, se centrifugó durante 5 minutos a 13 000 rpm, y se descartó el sobrenadante. Por último, se movió la columna a un tubo de 1.5 ml, y se agregó 200 buffer AE directamente a la membrana de la columna. Finalmente, para obtener la elución que contenía el plásmido extraído, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó el tubo durante 5 minutos a 10 000 para cuantificar.

5. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN total de las células trasfectadas se utilizó el kit RNeasy de Quiagen. Se siguió el siguiente procedimiento para la extracción: al botón celular se le agregaron 350 µl de buffer RLT para resuspenderlo. Después, se lisaron las células, resuspendiendo 15 veces el buffer con una jeringa de 1 ml. Posteriormente, se agregaron 350 µl de etanol al 70 %, se mezcló y se cargaron los 700 µl en una columna del kit. La 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 un minuto para retirar todos los restos. Finalmente se agregaron entre 30-70 µl de agua libre de ARNsas para la elución.

6. RT-PCR

La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó mediante retrotranscripción. Al ARN extraído se trató con el kit DNA-free Ambion®, el cual excluye el ADN empleando una DNAsa. Para ello se adicionaron 0.1 volúmenes del buffer 10X, con un 1 µl de la enzima para 10 µl de reacción y se incubó la mezcla a 37°C por 30 minutos. Pasado el tiempo se añadió 0.1 volúmenes del inactivador de DNAsa y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Por último, se centrifugó a 12000 rpm durante 1.5 minutos y se rescató el sobrenadante. Obtenido el ARN libre de ADN, se llevaron a cabo las reacciones de retrotranscripción, empleando el kit SuperScript™ Reverse Transcriptase. Las cantidades y el programa para la amplificación del ADNc se indican en el **anexo 2**.

7. Clonación del fragmento de E6 de VPH-16

Al tener el fragmento puro de E6 de VPH-16 se procedió a hacer las restricciones y ligaciones para la construcción del plásmido p3X-E616, el cual fue transformado en bacterias DH5α de *Escherichia coli*. Dichas bacterias, presentan una mutación en el gen recA1 provocando una reducción en la recombinación homóloga y una mutación en el gen endA1 que inactiva a las endonucleasas que degradan a los plásmidos en distintos métodos de purificación.

- **Restricciones enzimáticas**

Para la primera restricción enzimática, se juntaron todos los reactivos con las cantidades indicadas en el **anexo 3.1**. Tal mezcla se incubó a 37°C durante una hora. Pasado ese tiempo, para la segunda restricción se agregaron los reactivos y se repitió la incubación en las mismas condiciones.

- **Ligación**

Teniendo dirigidos al plásmido y al fragmento, ambos fueron ligados empleando los reactivos para la ligación indicados en el **anexo 3.2** y la mezcla se incubó a 37°C durante una hora.

- **Células competentes**

Para realizar la transformación, fue necesario generar bacterias competentes con CaCl_2 . (**anexo 1.7**). Se inoculó medio LB (**anexo 1.1**) con una azada de bacterias de DH5 α y se incubó toda la noche a 37°C. Después, en 50 ml de medio LB se inocularon 500 μl con bacterias DH5 α , y cuando el cultivo llegó a una densidad óptica DO (a 600 nm) de aproximadamente 0.4, las bacterias se colocaron en hielo durante 15 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se descartó. El botón de células se resuspendió en 25 ml de CaCl_2 y se incubaron 30 minutos en hielo. La mezcla se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y la pastilla se resuspendió en 3.3 ml de CaCl_2 . Las bacterias competentes se mantuvieron toda la noche a 4°C.

- **Transformación**

Una vez listos tanto el plásmido a clonar como las bacterias competentes, se realizó la transformación del ADN en las bacterias. Para ello, se siguieron las instrucciones del siguiente protocolo: se agregaron 100 ng del plásmido construido, así como del plásmido vacío en tubos diferentes colocados en hielo. Posteriormente, se añadieron 200 μl de las bacterias competentes a cada uno de los tubos con ADN plasmídico y las mezclas se incubaron 30 minutos en hielo. Pasado el tiempo, se dio un choque térmico colocando los tubos durante dos minutos a 42 °C, e inmediatamente se pasaron nuevamente en hielo. Después, a los tubos se les agregó 800 μl de medio LB estéril, y se incubaron una hora a 37 °C con agitación constante a 300 rpm. Finalmente, pasado el tiempo de incubación, se sembró 100 μl de cada uno de los tubos en una placa de LB-agar (**anexo 1.2**) con ampicilina (Gold biotechnology ®) y se incubaron las placas toda la noche a 37 °C.

8. Extracción de ADN plasmídico.

El ADN plasmídico fue extraído, usando el kit PureLink® Quick Plasmid DNA Miniprep de Invitrogen®. El protocolo utilizado fue el siguiente: el botón de células obtenida de un cultivo bacteriano de 5 ml, fue resuspendida en 250 μl del amortiguador de resuspensión R3 (contiene la ADNasa A). Posteriormente, se le adicionaron 250 μl de lisis L7 y 350 μl de amortiguador de precipitación N4 y se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido

fue transferido a una columna y se centrifugó a 12 000 rpm durante un minuto. El sobrenadante se descartó, y se procedió al lavado del ADN con 700 µl de amortiguador W9, centrifugando de nuevo a 12 000 rpm por minuto y descartando el sobrenadante. Después, solo se centrifugó la columna durante un minuto sin adicionarle ningún buffer. La columna se transfirió a un tubo y se agregaron 30 µl de -amortiguador de elusión TE en el centro de la membrana. Finalmente, se centrifugó durante dos minutos, y el sobrenadante que contenía el plásmido extraído fue cuantificado.

9. Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo posterior a todas las restricciones enzimáticas y amplificaciones por PCR; las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1% en TBE 1x (**anexo 1.4**). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific®) y el colorante Gel Red (Biotium®) para todas las muestras. Para el corrimiento de cada gel, se usó un voltaje que varió entre 70 a 100 volts. El revelado de los resultados se observó por fluorescencia del colorante en la luz ultravioleta.

10. Transfección en células C33A

- **Para expresión de transcritos y proteínas**

Se sembraron 1×10^6 células C33A en placas p60 con 2 ml de medio D-MEM/F-12 al 10 % SBF y se incubaron 24 horas a 37°C y 5 % de CO₂. Al día siguiente, cuando las células presentaban una confluencia de aproximadamente 60%, se les cambió el medio con 2 ml de D-MEM/F-12. En un tubo eppendorf, se colocaron 1.5 ml de OptiMEM® para mezclarlos con 45 µl de lipofectamina y se dejó incubando mientras se preparaban las mezclas para la transfección. En tubos eppendorf se colocaron 5 µg de ADN de cada plásmido con 200 µl de Optimem, se mezclaron y se dejaron incubando durante 5 minutos. A estos tubos se les añadió 200 µl de la mezcla de OptiMEM con lipofectamina 2000, y se dejaron incubando a temperatura ambiente por 25 minutos. Luego todo el contenido de cada tubo, se colocó por goteo en diferentes placas, las cuales se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante cinco horas. Pasado el tiempo, se les

cambió el medio por 2 ml de D-MEM/F12 con 10% de SBF y se incubaron hasta completar las 24 horas posteriores a la transfección.

- **Para ensayos de luciferasa**

Se sembraron 45×10^3 células C33A en placas de 24 pozos con 500 μ l de medio DMEMF12 (Gibco®) al 10 % SBF. Las células fueron incubadas durante 24 horas a 37°C y 5 % de CO₂ hasta que alcanzaran 60% de confluencia. Pasado este tiempo, para cada caja de 24 pozos se tomaron 3 ml de OptiMEM® para mezclarlos con 30 μ l de lipofectamina y se dejó incubando mientras se preparan las mezclas para transfección de cada pozo. En tubos ependorff de 1.5 ml se colocaron 100 μ l de Optimem, 50 o 100 ng de ADN de cada plásmido, 50 ng del vector reportero TOPFLASH y 5 ng de β -galactosidasa. Debido a que cada ensayo de transfección se realizó por cuadruplicado, se hicieron cálculos para transfectar 5 pozos, de esta forma se obtuvo un exceso para compensar cualquier pérdida de volumen. Una vez hecha la mezcla, se tomaron 500 μ l del medio OptiMEM con lipofectamina y se agregaron a cada una de las muestras y se incubaron durante 25 minutos para que se formaran los complejos lipídicos con el ADN.

Transcurrido el tiempo de incubación, se aspiró el medio de cada pozo y se resuspendió la mezcla suavemente para adicionar 200 μ l de esta a cada uno de los pozos correspondientes. Se agregó a todos los pozos 100 μ l de medio D-MEM/F12 al 10% de SBF. Las placas se inclinaron hacia los lados para que la mezcla se distribuyera de forma uniforme en todos los pozos. Después, se dejó incubando por 5 horas para cambiar el medio. A las 24 horas, nuevamente se cambió el medio. A las 48 horas posteriores a la transfección, se quitó el medio y se agregaron 50 μ l de buffer de lisis (**anexo 1.14**) a todos los pozos y se almacenaron las placas a -70 °C.

11. Extracción de proteínas totales y Western Blot de E6 y E6*I

Para evaluar la expresión de las proteínas se realizaron ensayos de Western Blot. Después de las 24 horas posteriores a la transfección, las células fueron lavadas dos veces con 2 ml de PBS (**anexo 1.6**). Para la obtención de proteínas totales, las cajas con las células en monocapa se colocaron sobre hielo y a cada pozo se añadieron 300 μ l de RIPA (**anexo 1.8**) con 10 % de

inhibidores de proteasas, se frotó con un raspador de células cada placa y su contenido se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 ml. Los lisados celulares se pasaron 15 veces por jeringa de insulina y se almacenaron a -70 hasta su cuantificación.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de ácido bicinonínico, en el cual la unión entre Cu^{2+} y los grupos NH presentes en las proteínas resulta en una coloración púrpura que se correlaciona con la concentraciones presentes en cada muestra (Smith *et al.*, 1985). En una placa de 96 pozos, se llevó a cabo la curva estándar de albúmina a la par de las muestras. Para las proteínas, se tomó 2 μl de cada extracto proteico y se agregó 13 μl de RIPA. Después, se añadieron 300 μl de la solución de trabajo de ácido con sulfato de cobre a todos los pozos, se incubó por 30 minutos a 37°C y se esperó a que la reacción colorimétrica se definiera. Finalmente, se leyó en un lector de Elisa con una DO a 570 nm.

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 12% (**anexo 4**). Se cargaron 4 μl del marcador de peso molecular (Thermoscientific®) y 40 μg de las proteínas. Las muestras se corrieron con buffer de corrida al 1x a un voltaje de 100 Volts. Después, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa en una cámara húmeda a 200 mA durante 40 minutos.

Posteriormente, se bloquearon los sitios no específicos de la membrana con buffer de bloqueo (**anexo 1.13**) durante una hora. Pasado el tiempo, la membrana se lavó con TBS-Tween (**anexo 1.5**) durante 10 minutos. Para detectar a las proteínas, la membrana se incubó 24 horas a 4°C con los anticuerpos primarios específicos para cada proteína (**anexo 5**). Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS- Tween. Los anticuerpos secundarios se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Por último, se realizaron 3 lavados de 10 minutos.

Para la detección de las proteínas de interés, se empleó una reacción de quimioluminiscencia (Millipore immobilon™). Tal sistema utiliza luminol, compuesto que se oxida en presencia del anticuerpo secundario que se encuentra conjugado con peroxidasa. La emisión de luz se genera cuando reacciona con el peróxido de hidrogeno. La solución de trabajo se preparó mezclando

cantidades iguales tanto de luminol como de peroxidasa. Con dicha mezcla, se bañó la membrana previamente incubada con el anticuerpo secundario, y se incubó durante 1 minuto y la emisión de luz se detectó, exponiendo la membrana a placas de rayos X.

12. Ensayos de luciferasa

Para medir la actividad transcripcional de TCF en presencia de E6 y E6*1, se realizaron ensayos de luciferasa en células C33A transfectadas con el plásmido que contiene el gen reportero luciferasa dependiente de TCF, TOPFLASH, el cual posee tres copias de sitios de unión a TCF río arriba del promotor TK (Thymidine Kinase) (**anexo 11**). El gen luciferasa codifica para una enzima que cataliza la producción de luz en organismos biolumiscentes, como la luciérnaga *Photinus pyralis* (DeWet *et al.*, 1987). La enzima de esta luciérnaga requiere ATP, CO₂ y luciferina como sustrato. La primera reacción es la formación de un adenilato de luciferilo unido a la enzima. En la segunda reacción el complejo adenilato de luciferilo sufre una descarboxilación oxidativa que da como resultado la producción de CO₂, oxiluciferina, AMP y luz. Si se añade un exceso del sustrato, la cantidad de luz producida es proporcional a la cantidad de luciferasa (DeLuca y McElroy, 1984).

Para la normalización de la variabilidad en la actividad transcripcional del gen reportero, se utiliza como control interno a β -galactosidasa (β -gal) (Alam y Cook, 1990). En este trabajo se empleó el plásmido pCMV β , que contiene al gen LacZ el cual está bajo el control del promotor de CMV, y es capaz de expresar la enzima β -gal de *E.coli* en células de mamíferos (MacGregor y Caskey, 1989).

Para llevar a cabo las lecturas de las células transfectadas, se sacaron las cajas de 24 pozos que anteriormente habían sido almacenadas a -70 y se descongelaron en hielo durante 15 minutos. Después, se raspó cada pozo y se transfirieron 30 μ l de los lisados a tubos de luminómetro. Se ajustó el luminómetro para leer durante 20 segundos e inyectar el mismo volumen de luciferina que de lisado. Se agregó 100 μ l de buffer de reacción para luciferasa (**anexo 1.15**), se agitó suavemente y se introdujo el tubo al lector del luminómetro para obtener los valores de luminiscencia. Para la lectura de β -gal, se sacaron los tubos del luminómetro y

se les agregó 100 μ l de buffer de reacción (**anexo 1.16**) y se incubaron por una hora en obscuridad. Pasado el tiempo, se ajustó el luminómetro para leer durante 5 segundos, se agregó 100 μ l de la solución aceleradora (**anexo 1.17**) al tubo, se agitó y se volvió a introducir al luminómetro para obtener la lectura de β -gal.

13. Análisis estadístico

Para cada uno de los ensayos de luciferasa con 50 ng y 100 ng de los plásmidos (p3XFLAG, E618, E6SM (18), E6*I (18) y E616), los datos de actividad enzimática de luciferasa problema con los valores de β -galactosidasa se tabularon y graficaron. El cociente de ambas actividades provocó un ajuste de los valores de luciferasa problema con respecto a los de β -galactosidasa, eliminando el factor de variabilidad. La divergencia que existió en estos valores, se debió a la variabilidad de la técnica por la eficiencia de transfección. Dado el cociente entre ambas actividades, la actividad transcripcional se expresó en unidades relativas de luz (URL). Posteriormente, se obtuvo un promedio de los cocientes para cada categoría (p3XFLAG, E618, E6SM (18), E6*I (18) y E616) y su respectiva desviación estándar. Los promedios y desviación estándar de cada grupo se representaron luego por una gráfica de barras. Finalmente, se obtuvieron las veces de incremento de actividad de cada plásmido problema con respecto a la actividad de vector vacío p3XFLAG y se representaron en una gráfica de barras con su respectiva desviación estándar. Con una prueba t para medias de dos muestras relacionadas utilizando el programa GraphPad Prism 5 se consideraron valores de $p \leq 0.05$ como diferencias estadísticamente significativas.

VII. RESULTADOS

La clonación del gen E6 de VPH-16 fue exitosa

Con la secuencia codificante de E6 de VPH-16 obtenida del compendio HPV Sequence Database (<http://pave.niaid.nih.gov/lanl-archives/HPVcompintro4.html>), se diseñaron oligonucleótidos específicos para su amplificación. Para insertar el fragmento en el vector p3XFLAG-CMV-10, se escogieron los sitios de corte EcoRI y BglII, presentes en el sitio de multiclonación del plásmido (**anexo 8**). Como la secuencia a clonar no tenía dichos sitios de corte, fue necesario agregarlos al inicio y al final de los oligonucleótidos diseñados (**figura 8**).

Se identificó que al empalmar nuestro fragmento con el plásmido, se formaban extremos cohesivos que cambiaban el marco de lectura y por consiguiente, la secuencia de la proteína. Para corregir este problema, y conservar el marco de lectura correcto, se añadió el nucleótido Adenina (A) al final de la secuencia del sitio de corte de EcoRI (**figura 8**).

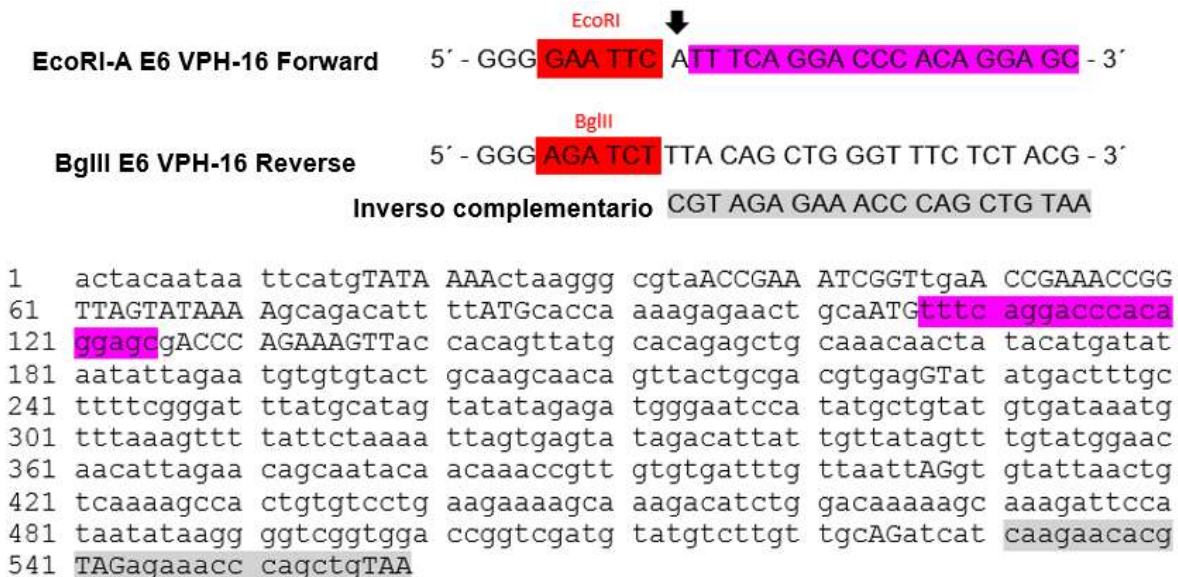


Figura 8. Diseño de oligonucleótidos y secuencia codificante para E6 de VPH-16. Con rojo se resaltan los sitios de restricción incluidos en cada uno de los oligonucleótidos. El oligonucleótido sentido está remarcado en rosa y el antisentido en gris. Se incluye una adenina para conservar el marco de lectura del gen E6 después del sitio de corte de EcoRI.

El fragmento E6 de VPH-16 fue amplificado por PCR a partir del ADN extraído de células de CaSki, que contienen fragmentos de ADN de VPH-16 integrado en su genoma celular. En la **figura 9A** se muestran los productos de E6 obtenidos de las amplificaciones por PCR, cuyo peso es de 457 pb. Una vez obtenido el amplificado a clonar, se llevaron a cabo las digestiones del fragmento y del vector p3XFLAG-CMV-10 con las enzimas EcoRI y BgIII.

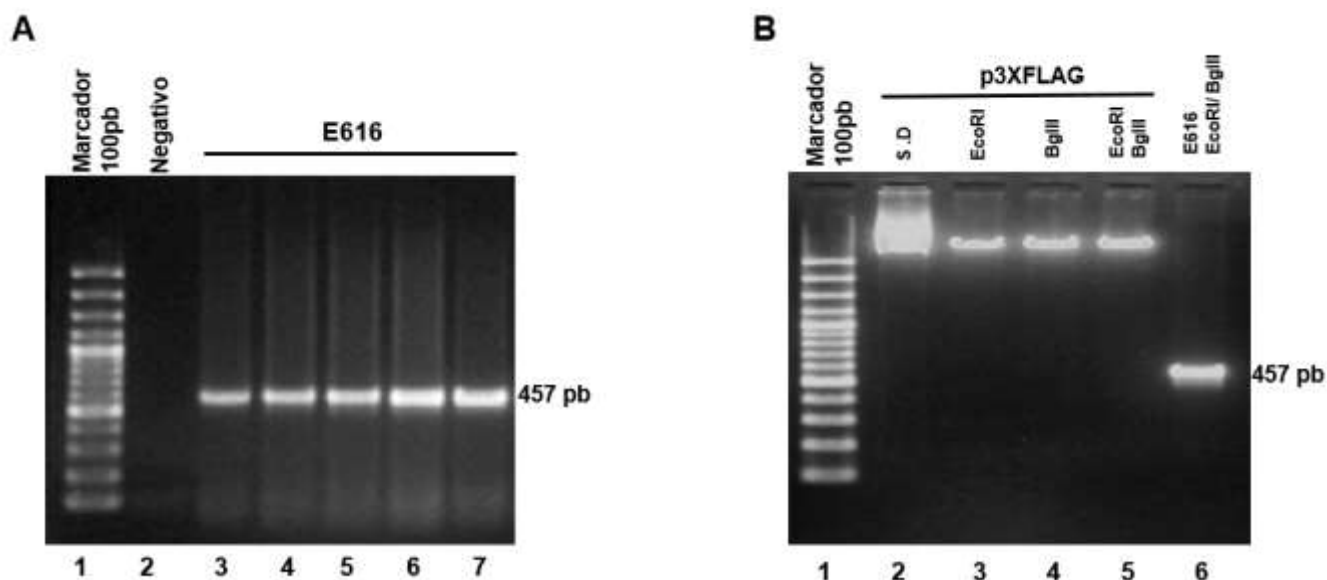


Figura 9. Electroforesis en geles de agarosa del producto de amplificación de E6 de VPH-16 y restricciones del inserto con EcoRI y BgIII. A) Del carril 3 al 7 se muestran el producto amplificado de E6 de VPH-16 con ADN de células CaSki. El carril 2 es el control negativo sin ADN. **B)** El carril 2 muestra al vector sin digerir (S.D): el carril 3, vector digerido con EcoRI; carril 4 vector digerido con BgIII; carril 5, vector digerido con ambas enzimas. El último carril 6 corresponde a la digestión del fragmento con las dos enzimas.

Para verificar que las dobles digestiones del vector y del fragmento se habían realizado de manera eficiente, se hicieron digestiones sencillas que comprobaban que cada una de las enzimas de restricción utilizadas no digirieran de manera parcial (**figura 9B**). Esto se supo, al observar que el corrimiento de las bandas, tanto de las digestiones sencillas (carriles 3 y 4) como de la doble digestión (carril 5), no presentaran un barrido de fondo, lo cual si se observa en el control sin digerir (carril 2). El marcador molecular indicó que el tamaño del vector y del fragmento correspondieran a los pesos esperados.

El vector construido fue introducido a bacterias DH5 α competentes a través del método de transformación por choque térmico. De las colonias obtenidas se eligieron cuatro y se resembraron. A las resiembras, se le hizo una PCR de colonia para comprobar que el vector sí contenía el inserto. En la **figura 10A** se observa que las cuatro colonias amplificaron el fragmento en el tamaño esperado.

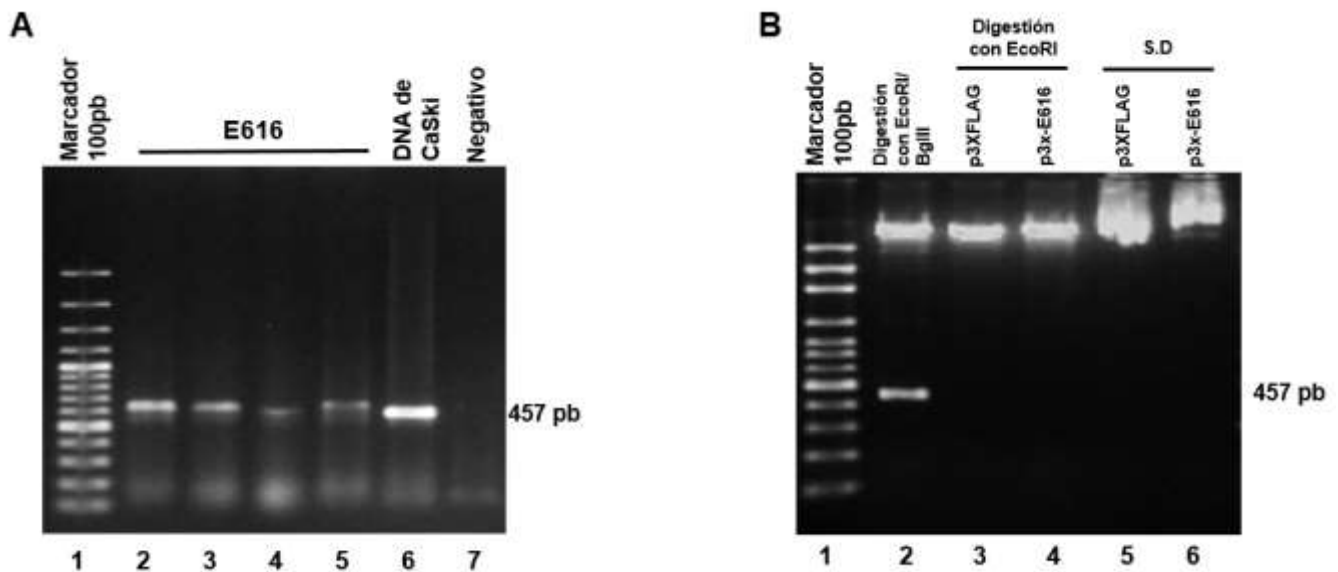


Figura 10. PCRs de colonias y verificación de la clonación. **A)** Del carril 2 al 5 se muestran las amplificaciones de E6 de VPH-16 de las 4 colonias resembradas. En el carril 6 se encuentra la reacción con ADN de CaSki como control positivo y en el carril 7 el control negativo sin ADN. **B)** En el carril 2 se observa el inserto liberado por las dos enzimas EcoRI y BglII. Los carriles 3 y 4 corresponden a la digestión con EcoRI del vector vacío y del plásmido con el inserto. Los carriles 5 y 6 muestran al vector y al plásmido con el inserto sin digerir (S.D).

De las colonias positivas, que contenían el fragmento con el peso, se eligió una de éstas para extraer el plásmido. Ya extraído el plásmido, se volvió a verificar la presencia de E6 por PCR y por liberación de inserto con las enzimas EcoRI y BglII (**Figura 10B**). Para corroborar, que el fragmento clonado estuviera en marco de lectura y presentara la secuencia correspondiente a E6 de VPH-16, el plásmido recombinante fue secuenciado a través del servicio de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas. La secuencia obtenida fue analizada con el programa Chromas, y comparada con la base de datos BLAST. Se comprobó que el vector construido contiene la secuencia correcta de E6 de VPH-16 en el marco de lectura apropiado para lograr su expresión (**anexo 9**).

Las secuencias de E6 y E6*I de VPH-AR (16 y 18) se expresan en células C33A

Las células C33A fueron transfectadas por separado con la construcción realizada y tres plásmidos que contienen las secuencias que codifican para las proteínas E618, E6 mutante (E6SM) y E6*I de VPH-18. El vector con el que fueron elaborados estos plásmidos fue el mismo que empleamos para la clonación de E6 de VPH-16. El plásmido con la secuencia de E618 genera a la proteína E6 completa así como a su producto de procesamiento E6*I. El plásmido con la secuencia de E6SM, contiene una mutación silenciosa en la secuencia nucleotídica de E6 que cambia una guanina por una adenina en la posición 233. Esta mutación disminuye el proceso de *splicing*, provocando una mayor expresión del producto completo de E6 y una menor expresión de E6*I. Dado que dicha mutación es silenciosa, durante la transcripción ambos tripletes codifican para ácido glutámico. Por último, el plásmido que expresa a la proteína E6*I, contiene exclusivamente la secuencia de E6*I, que se obtuvo a partir del cDNA.

A las 24 horas posteriores a la transfección, se extrajeron los ARN y lisados proteicos totales. La presencia de transcritos de E6 y E6*I se observó mediante RT-PCR y la expresión proteica por Western blot, utilizando el anticuerpo anti-FLAG. Además de las transfecciones con los plásmidos de interés, se transfectó por separado el vector vacío. Como control de integridad del ADN, en la reacción de PCR se utilizaron oligonucleótidos para amplificar al gen constitutivo GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y para controlar la carga proteica en el Western blot, se utilizó el anticuerpo dirigido contra la enzima GAPDH.

A nivel de transcrito, se observaron diferentes patrones de expresión de ARN de E6 y E6*I de VPH-18 y 16. Como se muestra en la **figura 11A**, las células transfectadas con E618 mostraron mayor cantidad de transcrito de E6*I que de E6. Como control positivo para VPH-18 se utilizó el ADN extraído de la línea celular HeLa, la cual también presentó un patrón similar. Las células transfectadas con E6SM (18) mostraron expresión de ambos fragmentos; sin embargo, la proporción de ARN de E6 fue mayor en comparación con las células transfectadas con E6 de VPH-18. Para el caso de E6*I (18), sólo se observó el transcrito correspondiente a ésta isoforma. En las células con E6 de VPH-16, se identificaron las expresiones de dos de las cuatro

isoformas de E6*, que por sus tamaños corresponden a E6*I y E6*II. Ambos transcritos E6* también se observaron en células CaSki que tienen integrado en su genoma el VPH-16; no obstante, la presencia del transcrito de E6 completo también se identificó pero en menor proporción.

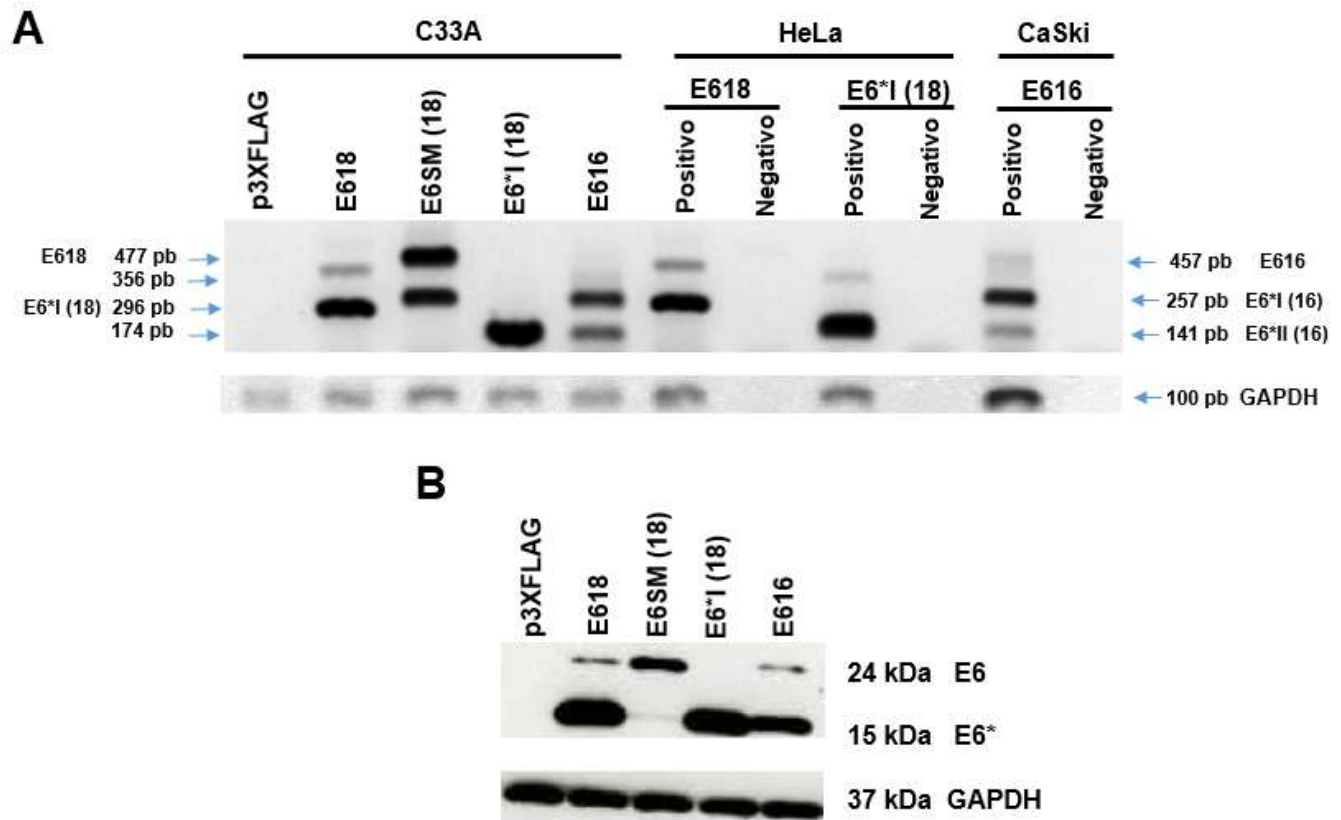


Figura 11. RT-PCR y Western Blot de E6 y E6*I de VPH-18 y 16 en células C33A transfectadas. Imágenes representativas de 2 experimentos independientes con resultados semejantes. A) Transcritos de E6 y E6*I de VPH-18 y VPH-16. Como control de integridad de ADN se amplificó al gen de GAPDH. B) Expresión proteica de E6 y E6*I. Como control de carga protéica, la membrana se incubó con anti-GAPDH.

Como se observa en la **figura 11B**, las proteínas E6 y E6*I de VPH-18 y VPH-16, se pudieron detectar mediante el epítipo FLAG. A nivel protéico, en algunos casos el patrón de expresión cambia con respecto al de los transcritos. En células transfectadas con E6 y E6*I de VPH-18, se observan coincidencias tanto en las proteínas como en los ARNm. No obstante, en las transfecciones con E6SM (18) la presencia de la proteína E6*I es poco evidente. Así mismo, una de las isoformas de E6* de VPH-16 no se identifica a nivel protéico, pero la presencia de la proteína E6 es clara.

La actividad transcripcional de TCF aumenta por las proteínas E6 y E6*I de VPH-AR (16 y 18) en células C33A

Para evaluar el efecto de E6 y E6*I sobre la actividad transcripcional de TCF, se realizaron ensayos de luciferasa en células C33A. Las células se cotransfectaron transitoriamente con el plásmido reportero TOPFLASH que contiene sitios de unión a TCF y con 50 ng (**figura 12**) y 100 ng (**figura 12**) de los plásmidos que contienen las secuencias de E6, E6SM, E6*I de VPH-18, E6 de VPH-16 así como con el vector vacío p3XFLAG.

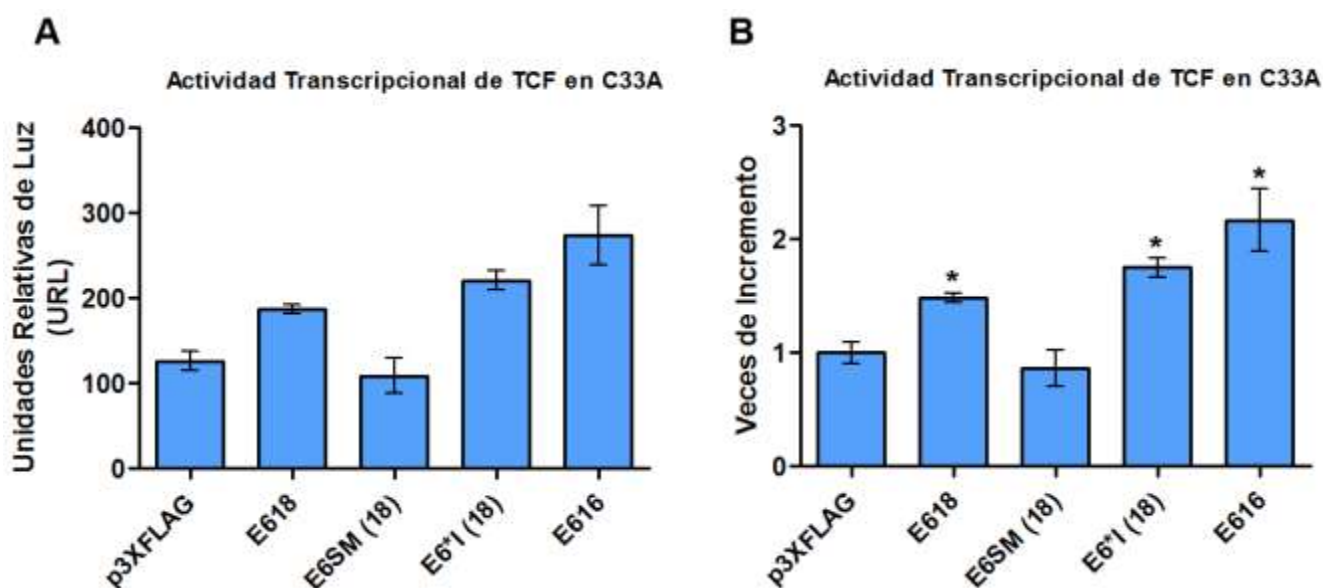


Figura 12. Evaluación transcripcional de TCF en células C33A transfectadas con 50 ng de los plásmidos. Gráficas representativas de dos experimentos independientes con la misma tendencia. **A)** Unidades relativas de luz de las cotransfecciones con el plásmido reportero TOPFLASH y con 50 ng de los plásmidos que expresan a E618, E6SM (18), E6*I (18) y E616, así como con el vector vacío p3XFLAG. **B)** Veces de incremento de la actividad transcripcional de TCF, en relación al vector vacío. Las barras representan cuantas veces aumentó la luminiscencia para cada muestra en comparación a la del vector vacío p3XFLAG. El asterisco indica la diferencia significativa $p \leq 0.5$.

En la **figura 12**, se observa que para el ensayo con 50 ng de los plásmidos, tanto E6 y E6*I de VPH-18 como E6 de VPH-16 generaron un cambio significativo en la actividad transcripcional de TCF ($p \leq 0.5$) en comparación al vector vacío p3XFLAG. En la **figura 12(A, B)**, se muestra que las veces de incremento sobre el vector vacío de E618 fueron de 0.5 y las de E6*I (18) de 0.75. En el caso de E6 de VPH-16 éste aumento fue del doble de la actividad basal del vector

vacío. Por otra parte la presencia de E6SM (18) no mostró una diferencia significativa en la actividad transcripcional de TCF.

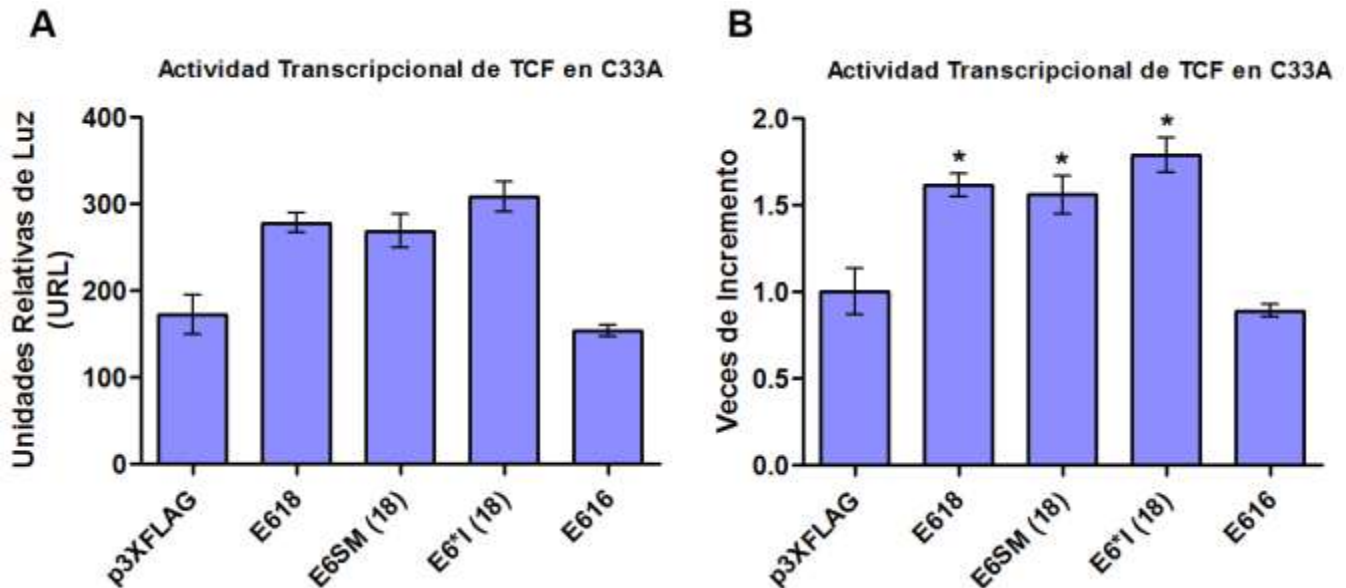


Figura 13. Evaluación transcripcional de TCF en células C33A transfectadas con 100 ng de los plásmidos. Gráficas representativas dos experimentos independientes con la misma tendencia. **A)** Unidades relativas de luz de las cotransfecciones con el plásmido reportero TOPFLASH y con 100 ng de los plásmidos que expresan a E618, E6SM (18), E6*1 (18) y E616, así como con el vector vacío p3XFLAG. **B)** Veces de incremento de las cotransfecciones. Las barras representan cuantas veces aumentó la luminiscencia para cada muestra en comparación a la del vector vacío p3XFLAG. El asterisco indica la diferencia significativa $p \leq 0.5$.

Para el ensayo de luciferasa con 100 ng de los plásmidos, de forma interesante se identificaron patrones de actividades transcripcionales diferentes que aquéllos con 50 ng. Los plásmidos de E6, E6SM, y E6*1 de VPH-18 causaron un aumento significativo sobre la actividad transcripcional de TCF ($p \leq 0.5$) en relación con el vector vacío p3XFLAG (**figura 13A**). En la **figura 13B**, se observa que las veces de incremento sobre el vector vacío de E618 fueron de 0.60 y las de E6*1 (18) de 0.80. En este ensayo, en presencia de E6SM (18) la actividad transcripcional de TCF aumento 0.55 veces. Por otra parte, la actividad transcripcional de TCF se observó disminuida y sin diferencia estadística en presencia de E6 de VPH-16.

VIII.DISCUSIÓN

La infección persistente de VPH-AR es una causa necesaria para el desarrollo del CaCU (zur Hausen, 1996). La participación de ciertos procesos celulares alterados por las oncoproteínas E6 y E7 son requeridos para el establecimiento del fenotipo maligno (Moody *et al.*, 2010).

El mecanismo de acción oncogénico de E6 en CaCU se ha estudiado ampliamente, no obstante, el papel del producto del procesamiento alternativo E6*I durante la transformación no es del todo clara. Debido a la abundante expresión de E6*I en líneas celulares positivas a VPH, así como en muestras obtenidas de tumores (de la Cruz *et al.*, 2005) han surgido estudios que tratan de esclarecer sus efectos biológicos.

Se ha demostrado que E6*I puede actuar como un modulador de algunas de las funciones de E6, por ejemplo, al inhibir la degradación de p53 mediante su interacción directa con E6 y E6AP (Pim *et al.*, 1997). Por otra parte, E6*I puede actuar de forma independiente a su posible efecto sobre E6 y afectar a proteínas involucradas en diferentes procesos celulares. Por ejemplo, E6*I es capaz de degradar a proteínas con dominio PDZ, tales como MAGI-1, MAGI-2, Akt y hDlg, que también son blancos de E6 y con ello provocar pérdida de la adhesión y polaridad celular (Pim *et al.*, 2009). Dado lo anterior, se ha sugerido que E6*I puede intervenir en la modulación de vías de señalización relacionadas con la transformación celular.

La activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina se ha propuesto como uno de los eventos necesarios para el establecimiento de CaCU (Bulut *et al.*, 2011; Perez-Plasencia *et al.*, 2007). En muestras de tejido sano de cérvix, se ha observado que β -catenina se localiza en membrana, pero conforme avanza la lesión hacia cáncer invasor, β -catenina se acumula en citoplasma y principalmente en núcleo (Shinohara *et al.*, 2001; Üren *et al.*, 2005). Estudios previos han abordado el efecto de E6 de VPH-16 en la vía de Wnt, donde han observado que la actividad transcripcional de TCF aumenta en presencia de E6 (Lichtig *et al.*, 2010; Sominsky *et al.*, 2014). Sin embargo, en esta vía se desconoce la participación de E6 de VPH-18, el cual es un tipo viral que está asociado a tumores agresivos con peor pronóstico clínico que aquellos con VPH-

16 (Burguer *et al.*, 1996). Puesto que la presencia del transcrito de E6*I es evidente, también resulta importante saber si lleva a cabo un papel funcional en la vía de Wnt.

De esta manera, nuestro objetivo fue evaluar tanto el efecto de E6, como el de E6*I de VPH-18 sobre la actividad transcripcional de TCF. Para ello, se transfectaron plásmidos que expresaran individualmente a las proteínas E6 y E6*I en células de carcinoma de cérvix C33A, que no contienen secuencias de VPH. Con el fin de comparar nuestros resultados de actividad transcripcional, generamos un plásmido de E6 de VPH-16, cuyo efecto en la vía de Wnt ya ha sido reportado previamente (Lichtig *et al.*, 2010).

En primera instancia, observamos la expresión de los transcritos de E6 y E6*I tanto de VPH-16 como de VPH-18 (**figura 11A**). Como se muestran en nuestros resultados, para la expresión mayoritaria de E6 de VPH-18 fue requerido un plásmido que tuviera un abatimiento en el procesamiento alternativo (E6SM), lo que nos permitió detectar una mayor proporción del transcrito completo de E6 en comparación al transcrito detectado en las células transfectadas con E618. Cabe mencionar, que los tamaños de E6 y E6*I son distintos dependiendo del par de oligonucleótidos que se utilicen; si se usan los oligos diseñados para E6, se detecta a E6*I con un tamaño mayor (296 vs 174 pb) debido a que se amplifica desde el codón de inicio (semejante para E6 y E6*I) hasta el codón de paro para E6. Pero cuando se emplean los oligos diseñados para E6*, el tamaño del transcrito de E6 es más pequeño (356 pb vs 477 pb) ya que se amplifica antes del codón de paro específico para esta proteína. Por otro lado, en la amplificación del ARNm de E6 de VPH-16, logramos identificar a dos isoformas E6*I y E6*II, ambas se encuentran dentro del marco de lectura de E6 (Shally *et al.*, 1996).

A nivel de proteína (**figura 11B**), en las células transfectadas transitoriamente con E618 se observan a E6 y E6*I, pero el patrón de expresión abundante de E6*I es evidente. Para el caso de las células con E6SM (18), como era de esperarse, se detecta la elevada expresión de E6 y una disminución en la expresión de E6*I. Por su parte, en las células con E6*I (18) se comprobó la presencia única de ésta isoforma. Estos resultados coinciden con los reportados con Pim y colaboradores (2009) quienes también detectan la presencia de E6*I en mayor abundancia que E6, en transfecciones transitorias en líneas celulares sin VPH.

Resulta interesante que en las células transfectadas con E6 de VPH-16, a nivel de transcrito se observan sólo las dos isoformas E6* que son E6*I y E6*II (**figura 11A**). Sin embargo, a nivel de proteína, se identificó a E6 completo en baja proporción, mientras que solamente se logra detectar de forma abundante a una sola isoforma E6* (**figura 11B**). Esto podría explicarse, porque las dos isoformas E6* expresadas a partir del gen E6 varían sólo por 5 aminoácidos en su carboxilo terminal; por lo tanto, la diferencia de tamaños entre las isoformas es demasiado pequeña para ser distinguida por western blot (Fillipova *et al.*, 2014).

Por otra parte, es importante considerar que en el presente trabajo no se determinó la funcionalidad de las proteínas expresadas, lo cual resulta necesario para asegurar que el efecto observado en la actividad transcripcional de TCF es producto de las proteínas E6 funcionales. Una forma de evaluar dicha funcionalidad, es a través de las proteínas blanco ya reportadas tanto para E6, como para E6*I. Por ejemplo, se ha demostrado que la proteína hDlg es degradada en presencia de E6 (Thomas *et al.*, 2001), como de E6*I (Pim *et al* 2009). De esta manera, valdrá la pena en estudios posteriores evaluar los niveles de hDlg en las células que expresen a E6 completa, así como en las que expresen exclusivamente a la isoforma E6*I.

Otra proteína ampliamente estudiada como blanco de E6 es p53, la cual en presencia de E6 es degradada, pero E6*I no tiene un efecto en sus niveles. En nuestro modelo experimental no resulta un buen blanco para ser analizado debido a que en las células C33A éste factor transcripcional se encuentra mutado en el sitio de reconocimiento a E6 (Crook *et al.*, 1991).

El efecto de E6 y E6*I se valoró mediante ensayos de actividad transcripcional (**figuras 12 y 13**). Se propone que dichas proteínas virales pudieran aumentar la actividad del factor transcripcional TCF sobre sus elementos de respuesta. Se realizaron cotransfecciones de los respectivos plásmidos de expresión (E618, E6SM (18), E6*I (18) y E616) y un plásmido reportero TOPFLASH que contiene sitios de unión a TCF acoplados al gen de luciferasa. Nuestros resultados preliminares indican que E6 y E6*I de VPH-18 aumentan la actividad transcripcional de TCF; se observó un cambio significativo ($p \leq 0.5$) en la actividad de TCF en las células C33A transfectadas con 50 ng de los vectores con E6 y E6*I en comparación al vector

vacío p3XFLAG (**figura 12A y B**). Recordemos que la expresión del plásmido que contiene a E6 de VPH-18 presenta en mayor proporción a E6*I, lo cual nos sugiere que probablemente el efecto observado se podría deber en mayor medida al producto de E6*I, más que a E6. Lo anterior se corrobora al observar que E6SM (18), que sólo expresa a E6, no mostró un incremento en la actividad de TCF. Este ensayo posiblemente nos indique que la presencia de E6*I es importante para provocar un incremento en la activación de TCF a dicha concentración.

En cuanto a los resultados obtenidos al transfectar 100 ng de los plásmidos (**Figura 13A y B**), observamos que también hay un aumento en la actividad transcripcional de TCF ($p \leq 0.5$) en presencia de E6 y E6*I de VPH-18. En este caso, las células transfectadas con E6SM (18) también presentaron un incremento en la actividad de TCF, lo cual fue contrario a lo observado en el ensayo con 50 ng de éste plásmido; esto nos indica que la presencia mayoritaria de E6 también es capaz de repercutir en el aumento de la actividad de TCF. Sin embargo, si observamos las **figuras 12B y 13B**, podemos identificar que para ambos ensayos en presencia de E6*I se observan las mayores veces de incremento sobre el vector vacío. En este experimento, nuestro plásmido control E6 de VPH-16 no provocó un aumento en la actividad de TCF, posiblemente por la ineficiencia de la transfección. Es por ello, que en estudios posteriores proponemos evaluar de manera cualitativa la eficacia de las transfecciones mediante ensayos con el vector reportero que expresa la proteína verde fluorescente, GFP.

Hasta este punto, nuestros resultados revelan que en presencia de E6 y E6*I hay un aumento en la actividad de TCF, sin embargo, sería importante complementar con ensayos que integren concentraciones superiores de E6 y E6*I de VPH-18 (desde 100 hasta 500 ng) con el fin de observar si éste efecto es dependiente de la dosis. De igual manera, para asegurarnos que el cambio significativo de la actividad de TCF en presencia de E6 y E6*I conlleva al incremento de la transcripción de genes de la vía de Wnt, sería preciso realizar ensayos de PCR en tiempo real con sondas específicas para la amplificación de los transcritos que codifican a los proteínas blanco de esta vía.

Cabe mencionar que en el estudio realizado por Lichtig y colaboradores (2010), señalan que la proteína E6 de VPH-16 por sí misma no induce la transcripción de TCF, por lo que fue necesario

que en sus células C33A transfectadas con E6 se les añadiera tratamiento con medio condicionado Wnt3a para activar la vía y con ello pudieran observar el efecto potenciador de E6 sobre la transcripción de TCF. En nuestro trabajo las proteínas E6 y E6*1 de VPH-18 por si mismas sí son capaces de provocar un aumento en la actividad transcripcional de TCF en células C33A, no obstante, para ensayos posteriores sería interesante añadir el tratamiento con medio condicionado Wnt3a o transfecciones con β -catenina para inducir la activación de la vía.

En otro trabajo elaborado por Sominsky y colaboradores (2014), se comprobó que las células Hek293T cuya vía de Wnt se activa mediante la adición de ligando Wnt3a, genera una disminución en los niveles de la proteína E6 de VPH-16; sin embargo, la transfección de E6AP restaura y estabiliza los niveles de E6 (Tomaic *et al.*, 2009) y con ello la activación de la vía de Wnt. Los autores concluyen que E6 requiere de E6AP para llevar a cabo su efecto sobre el factor transcripcional TCF.

Tomando en cuenta lo obtenido en nuestro trabajo surge la siguiente pregunta: ¿Cuáles serían los posibles mecanismos por los cuales E6 y E6*1 de VPH-18 tienen un efecto en la actividad transcripcional de TCF? se ha demostrado que E6 junto con E6AP pueden estabilizar los niveles de β -catenina y facilitar su translocación y acumulación en el núcleo lo cual conduce a un incremento en la transcripción de TCF (Sominski *et al.*, 2014). Aunque hasta el momento no se ha demostrado alguna interacción entre estas proteínas, se sugiere que el complejo E6/E6AP participa en el secuestro de un regulador negativo de la vía de Wnt. Así mismo, estudios *in vitro* mostraron que E6 de VPH-16 es capaz de interactuar con Dvl2, provocando la disociación del complejo de degradación, y la activación de TCF (Bonilla *et al.*, 2012). Por otro lado, se sabe que E6 de forma indirecta puede participar en la vía de Wnt, por medio de su regulación sobre FOXM1. El factor transcripcional FOXM1 puede unirse directamente a β -catenina e inducir su translocación al núcleo (Zhang *et al.*, 2011). En células que expresan E6, la transcripción de FOXM1 aumenta y esto a su vez incrementa la translocación de β -catenina al núcleo, lo que promueve la activación de la transcripción de TCF y la expresión de proteínas blanco de la vía de Wnt (Chen *et al.*, 2014). En cuanto a E6*1, no se conocen las interacciones de esta isoforma con proteínas que participan en la vía de Wnt. Filippova y colaboradores (2014) mencionan que E6*1 puede ser un elemento clave para la alteración de la vía de Wnt/ β -catenina. Por estos

motivos será necesario continuar con el estudio de posibles interacciones de E6 y E6*1 con diferentes elementos de la vía Wnt/ β -catenina, para esto sería necesario realizar ensayos de coinmunoprecipitación.

Entender los mecanismos por los cuales las proteínas E6 y E6*1 participan en la modulación de diferentes vías de señalización, entre ellas la vía de señalización Wnt/ β -catenina, nos ayudará a dilucidar aún más el proceso carcinogénico relacionado con VPH-AR.

IX. CONCLUSIONES

- La cantidad del transcrito de E6*1 (18) es mayor que la del transcrito de E6 en células C33A transfectadas con E618.
- El nivel de la proteína E6*1 (18) es mayor que el de E6 en células C33A transfectadas con E618 y poco evidente o nula en células transfectadas con E6SM (18).
- Las proteínas E6 y E6*1 de VPH-18 son capaces de aumentar la actividad transcripcional del factor TCF de la vía de Wnt/ β -catenina.

X. PERSPECTIVAS

- Determinar la funcionalidad de las proteínas E618, E6SM (18), E6*I (18) y E616, para asegurar que el efecto observado en la actividad transcripcional de TCF es producto de las proteínas E6 funcionales
- Evaluar de manera cualitativa la eficacia de las transfecciones mediante ensayos con el vector reportero que expresa la proteína verde fluorescente, GFP.
- Complementar con ensayos de luciferasa que incluyan concentraciones superiores de E6 y E6*I de VPH-18 (desde 100 hasta 500 ng) con el fin de observar si el aumento de la actividad transcripcional de TCF es dependiente de la dosis.
- Para asegurarnos que el cambio significativo de la actividad de TCF en presencia de E6 y E6*I conlleva al incremento de la transcripción de genes de la vía de Wnt, es importante realizar ensayos de PCR en tiempo real con sondas específicas para la amplificación de los transcritos que codifican a las proteínas blanco de esta vía.
- Llevar a cabo ensayos de coimmunoprecipitación para demostrar si E6 y E6*I son capaces de unirse a proteínas involucradas en la activación de TCF.

XI.BIBLIOGRAFÍA

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. (1997). Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* **16**, 3797-804.

Ajiro, M., Jia, R., Zhang, L., Liu, X. & Zheng Z. (2012). Intron Definition and a Branch Site Adenosine at nt 385 Control RNA Splicing of HPV16 E6*I and E7 Expression. *PLoS One* **7**, 1-12.

Alam, J. & Cook, J.L. (1990). Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem* **188**, 245-254.

Antara De. (2011). Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin* **43**, 745-756.

Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., Fassina, A., Cordenonsi M & Piccolo S. (2014). YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* **158**,157-170.

Armstrong, D. & Roman, A. (1992). Mutagenesis of human papillomavirus types 6 and 16 E7 open reading frames alters the electrophoretic mobility of the expressed proteins. *J Gen Virol* **73**, 1275-1279.

Barker, N., Hurlstone, A., Musisi, H., Miles, A., Bienz, M. & Clevers, H. (2001). The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with β -catenin to promote target gene activation. *EMBO J* **20**, 4935–4943.

Bergvall, M., Melndy, T. & Archambault, J. (2013). The E1 proteins. *Virology* **445**, 1-47.

Bernard, H. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* **32**, 1-6

Bernard, H., Burk, R., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H. & de Villiers (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* **401**, 70-79.

Bernard, E., Pons-Salort, M., Favre, M., Heard, I., Delarocque- Astagneau, E., Guillemer, D. & Thiébaud A. (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 Infect Dis* **13**, 1-11.

Bonilla-Delgado, J., Bulut, G., Liu, X., Cortes-Malagon, E., Schlegel, R., Flores-Maldonado, C., Contreras, R., Chung, S., Lambert, P. & Üren, A. (2012). The E6 oncoprotein from HPV16 enhances the canonical Wnt/ β -catenin pathway in skin epidermis *in vivo*. *Mol Cancer Res* **10**, 250–258.

- Bosch, F. & de Sanjosé, S. (2003).** Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* **31**, 3-13.
- Boyer, S., Wazer, D. & Band, V. (1996).** E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* **56**, 4620-4624.
- Bouvard, V., Matlashewski, G., Gu, Z., Storey, A. & Banks L. (1994).** The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology* **203**, 73-80.
- Buck, C., Day, P. & Trus, B. (2013).** The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, 1-6.
- Burd, E. (2003).** Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* **16**, 1-17.
- Bulut, G., Fallen, S., Beauchamp, E., Drebing, L., Sun, J., Berry, D., Kallakury, B., Crum, C., Toretsky, J., Schlegel, R. & Üren, A. (2011).** Beta-Catenin Accelerates Human Papilloma Virus Type- 16 Mediated Cervical Carcinogenesis in Transgenic Mice. *PLoS One* **6**, 1-10.
- Castellsagué, X. & Muñoz, N. (2003).** Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis—role of parity, oral contraceptives and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* **31**, 20-8.
- Chen, P., Cheng, Y., Wang, Y., Wu, T., Chen, C. & Lee H. (2014).** Up-regulation of FOXM1 by E6 oncoprotein through the MZF1/ NKX2-1 axis is required for Human Papillomavirus-associated tumorigenesis. *Neoplasia* **16**, 961-971.
- Clifford, G., Smith, J., Plummer, M., Muñoz, N. & Franceschi, S. (2003).** Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* **88**, 63-73.
- Conrad, M., Bubb, V. & Schlegel R. (1993).** The human papillomavirus type 6 and 16E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* **67**, 6170-6178.
- Crook, T., Wrede, D. & Vousden, K. (1991).** P53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene* **6**, 873-875.
- Culp, T., Cladel, M., Balogh, K., Budgeon, L., Mejia, A. & Christensen, N. (2006).** Papillomavirus particles assembled in 293TT cells are infectious in vivo. *J Virol* **80**, 11381–11384.
- Daniels, D. & Weis, W. (2005).** Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from TCF/LEF in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol boil* **12**, 364-71.
- de Sanjose, S., Quint, W., Alemany, L., Geraets, D., Klaustermeier, J., Lloveras, B., Tous, S., Felix, A., Bravo, L., Shin, H., Vallejos, C., de Ruiz, P., Aurelho, M., Guimera, N., Clavero, O., Alejo, M., Llombart-Bosch, A., Cheng-Yang, Ch., Tatti, S, Kasamatsu E, Iljazovic E, Odida M, Prado R, Seoud M, Grce M, Usubutun A, Jain A., Hernandez, G., Estuardo, L., Banjo, A., Menéndez, C., Domingo, E., Velasco, J., Nessa, A., Chichareon,**

S., Qiao, Y., Lerma, E., Garland, S., Sasagawa, T., Ferrera A, Hammouda D, Mariani L, Pelayo A, Steiner I, Oliva E, Meijer C, Al-Jassar, W., Cruz, E., Wright, T., Puras, A., Ladines, C., Tzardi, M., Agorastos, T., Garcia-Barriola V, Clavel C, Ordi J, Andújar M, Castellsagué C, Sánchez G, Nowakowski, A., Bornstein, J., Muñoz, N. & Bosch, X. (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* **11**, 1048-1056.

De la Cruz, E., García. A., Mohar, A., Dueña, A., Contreras, E., Perez, E., Herrera, R. & Lizano, M. (2005). Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J Gen Virol* **86**, 2459-68.

DeLuca, M. & McElroy, W. (1984). Two kinetically distinguishable ATP sites in firefly luciferase. *Biochem Biophys Res Commun* **123**, 764-770.

De Wet, J., Wood, K., DeLuca, M., Helinski, D. & Subramani, S. (1987). Firefly Luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells. *Mol Cell Biol* **7**, 725-737.

Doorbar J. (2005). The papillomavirus life cycle. *J clin virol* **32**, 7-15.

Doorbar, J., Quint, L., Banks, I., Bravo, M., Stoler, T., Broker, T. & Stanley, M. (2012). The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* **30**, 55-70.

Fisher, A. & Caudy, M. (1998). Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Dev* **12**, 1931-1940.

Fillippova, M., Evans, W., Aragon, R., Filippov, V., Williams, V., Hong, L., Reeves, M. & Duerksen-Hughes P. (2014). The small splice variant of HPV16 E6, E6*, reduces tumor formation in cervical carcinoma xenografts HPV16 E6* reduces tumor formation. *Virol* **153**-164.

Fillippova, M., Johnson, M., Bautista, M., Filippov, V., Fodor, N., Tungteakkhun, S., Williams, K. & Duerksen-Hughes, P. (2007). The large and small isoforms of Human Papillomavirus Type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J Virol* **81**, 4116-4129.

Ge, X. & Wang, X. (2010). Role of Wnt canonical pathway in hematological malignancies. *J Hematol Oncol* **33**, 3-6.

Gewin, L., Myers, M., Kiyono, T. & Galloway D. (2004). Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6AP complex. *Genes Dep* **18**, 2269-2282.

GLOBOCAN 2012 v1.0, Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Disk R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. 2013. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon. France: International Agency for Research on Cancer; <http://globocan.iarc.fr/> accesado el 22 de junio del 2014.

Giannoudis, A., & Herrington, C. (2001). Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol* **193**, 295-302.

- Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streek, R. & Sapp, M. (2001).** Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* **75**, 1565-1570.
- Gong, A. & Huang, S. (2012).** FoxM1 and Wnt/ β -catenin signaling in glioma stem cells. *Cancer Res* **72**, 5658-5662.
- He, B., Lee, A., Dadfarmay, S., You, L., Xu, Z., Reguart, N., Mazieres, J., Mikami, I., McCormik, F. & Jablons D. (2005).** Secreted Frizzled-Related Protein 4 Is Silenced by Hypermethylation and Induces Apoptosis in β -Catenin Deficient Human Mesothelioma Cells. *Cancer Res* **65**, 743-748.
- Heer A, Alonso L y Prat-Gay G. (2011).** E6*, the 50 Amino acid product of the most abundant spliced transcript of the E6 oncoprotein in High-Risk Human Papillomavirus, is a promiscuous folder and binder. *Biochemistry* **50**, 1376-1383.
- Howe, L. & Brown, A. (2004).** Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol Ther* **3**, 36-41
- Howie, H., Katzenellenbogen, R. & Galloway, D. (2009).** Papillomavirus E6 proteins. *Virology* **384**, 324-334.
- Huelsken, J. & Behren, J. (2002).** The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **113**, 3977-3978.
- Johnson, K., Kines, R., Roberts, J., Lowy, D., Schiller, J. & Day, P. (2009).** Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol* **5**, 2067-74.
- Labalette, Ch., Renard, C., Neuveut, C., Buendia, M. & Wei, Y. (2004).** Interaction and functional cooperation between the LIM protein FHL2, CBP/p300, and β -catenin. *Mol Cell Biol* **24**, 18689-10702.
- Lazcano-Ponce, E., Palacio-Mejia, L., Allen-Leigh, B., Yunes-Diaz, E., Alonso, P., Schiavon, R. & Hernandez-Avila, M. (2008).** Decreasing Cervical Cancer Mortality in Mexico: Effect of Papanicolaou Coverage, Birthrate, and the Importance of Diagnostic Validity of Cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**, 2808-2817.
- Lichtig, H., Gilboa, D., Jackman, A., Gonen, P., Levav-Cohen, Y., Haupt, Y. & Sherman, L. (2010).** HPV16 E6 augments Wnt signaling in an E6AP-dependent manner. *Virology* **396**, 47-58.
- Lewis, M. (2004).** Situational analysis of cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Pan American Health Organization Library Catalog*. 1-33.
- Lin, L., Liu, Y., Zhao, W., Sun, B. & Chen, Q. (2014).** Wnt5A expression is associated with the tumor metastasis and clinical survival in cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol* **7**, 6072-6078.

- Liu, Ch., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. & He X. (2002).** Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**, 837- 847
- Lizano-Soberon, M., Berumen, J. & García-Carrancá A. (2009).** HPV-related Carcinogenesis: Basic Concepts, Viral Types and Variants. *Arch Med Res* **40**,428-434.
- Logan, C. & Nusse, R. (2004).** The wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 781–810.
- Luo J, Chen J, Deng ZL, Luo X, Song WX, Sharff KA (2007).** Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications? *Lab Invest* **87**, 97-103.
- MacDonald, B., Tamai, K. & He, X. (2009).** Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **17**, 9-26.
- Mantovani, F. & Banks, L. (2001).** The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* **20**, 7874-7887.
- MacGregor, G. & Caskey, T. (1989).** Construction of plasmids that express E.coli (β -galactosidase in mammalian cells. *Nucleic Acid Res* **17**, 2365.
- Manzo-Merino, J., Massimi, P., Lizano, M. & Banks, L. (2014).** The human papillomavirus (HPV) E6 oncoproteins promotes nuclear localization of active caspase 8. *Virology* **450-451**, 146-152.
- McLaughlin-Drubin, M. & Münger, K. (2009).** The human Papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* **384**, 335-344.
- Moody, C. & Laimins, L. (2010).** Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* **10**, 550-560.
- Muñoz- Bello, J., Olmedo-Nieva, L., Contreras-Paredes, A., Fuentes-González, A., Leticia Rocha-Zavaleta, L. & Lizano-Soberón, M. (2015).** Regulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. *Viruses* **7**, 4734-4755.
- Nakashima, N., Liu, D., Huang, C., Ueno, M., Zhang, X. & Yokomise, H. (2012).** Wnt3 gene expression promotes tumor progression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **76**, 228-234.
- Narisawa-Saito, M. & Kiyono, T. (2007).** Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* **98**, 1505-1511.
- Nusse, R., Brown, A., Papkoff, J., Scambler, P., Shackleford, G., McMahon, A., Moon, R. & Varmus, H. (1991).** A new nomenclature for int-1 and related genes: The Wnt gene family. *Cell* **64**, 231.
- Ochoa-Hernández, A., Juárez-Vázquez, C., Rosales-Reynoso, M. & Barros-Núñez, P. (2012).** Wnt- β -catenin signaling pathway and its relationship with cancer. *Cir Cir* **80**, 389-398.

- Olmedo Nieva, L. (2015).** Efecto de las proteínas E6 y E6*1 de VPH-18 en la modulación de proteínas blanco de la vía de Wnt. Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pérez-Plasencia, C., Vázquez-Ortiz, G., López-Romero, R., Pina-Sánchez, P., Moreno, J. & Salcedo, M. (2007).** Genome wide expression analysis in HPV cervical cancer: identification of altered metabolic pathways. *Infect Agent Cancer* **2**, 16-26.
- Pim, D., Massimi, P. & Banks, L. (1997).** Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. *Oncogene* **15**, 257- 264.
- Pim, D., Tomaic, V. & Banks, L. (2009).** The Human Papillomavirus (HPV) E6* Proteins from high-risk, mucosal HPVs can direct degradation of cellular proteins in the absence of full-length E6 protein. *J Virol* **83**, 9863-9874.
- Pim, D., Bergant, M., Boon, S., Ganti, K., Kranjec, C., Massimi, P., Subbaiah, V., Thomas, M., Tomaic, V. & Banks, L. (2012).** Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting. *FEBS J* **279**, 3530-3537.
- Qian, D., Jones, Ch., Rzadzinska, A., Mark, S., Zhang, X., Steel, K., Dai, X., & Chen, P. (2007).** Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev Biol* **306**, 121-133.
- Ramos-Solano, M., Meza-Canales, I., Torres-Reyes, L., Alvarez-Zavala, M., Alvarado-Ruíza, L., Rincon-Orozco, B., Garcia-Chagollana, M., Ochoa-Hernández, A., Ortiz-Lazareno, Pablo., Rösl, F., Gariglio, P., Jave-Suárez, L. & Aguilar-Lemarroya, A. (2015).** Expression of WNT genes in cervical cancer-derived cells: Implication of WNT7A in cell proliferation and migration. *Exp Cell Res.* **335**, 39-50.
- Raff, A., Woodham, A., Raff, L., Skeate, J., Yan, L., DaSilva, D., Schelhass, M. & Kast, W. (2013).** The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol* **87**, 6062-6072.
- Ramos-Solano, M., Meza-Canales, I., Torres-Reyes, L., Alvarez-Zavala, M., Alvarado-Ruiz, L., Rincon-Orozco, B., Garcia-Chagollan, M., Ochoa-Hernandez, A., Ortiz-Lazareno, P. & Rosl, F. (2015).** Expression of WNT genes in cervical cancer-derived cells: Implication of WNT7A in cell proliferation and migration. *Exp Cell Res* **335**, 39–50.
- Rampias, T., Boutati, E., Pectasides, E., Sasaki, C., Kountourakis, P. & Weinberger, P. (2010).** Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Res* **8**,433-443.
- Rector, A. & Van Ranst, M. (2013).** Animal papillomaviruses. *Virology* **445**, 213-223.
- Rodríguez, A., Schiffman, M., Herrero, R., Hildesheim, A., Bratti, C., Sherman, M., Solomon, D., Guillén, D., Alfaro, M., Morales, J., Hutchinson, M., Katki, H., Cheung, Li., Wacholder, S. & Burk, R. (2010).** Longitudinal Study of Human Papillomavirus Persistence and Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2/3: Critical Role of Duration of Infection. *J Nat Cancer Inst* **102**, 315-324.

Roger-Gaillard, C., Breitburd, F. & Orth, G. (1992). Human Papillomavirus Type 1 E4 Proteins Differing by Their N-Terminal Ends Have Distinct Cellular Localizations When Transiently Expressed In Vitro. *J Virol* **66**, 816-823.

Roman, A. & Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology* **445**, 138-168.

Sedman, S., Barbosa, M., Vass, W., Hubbert, N., Haas, J., Lowy, D., & Schiller, J. (1991). The Full-Length E6 protein of human papillomavirus type 16 has Transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* **65**, 4860-4866.

Schelhaas, M., Shah, B., Holzer, M., Blattmann, P., Kuhling, L., Day, P., Schiller, J. & Helenius, A. (2012). Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog* **8**, 1-21.

Schneider-Gadicke, A. & Schwarz, E. (1986). Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J* **5**, 2285-2292.

Shinohara, A., Yokoyama, Y., Wan, X., Takahashi, Y., Mori, Y. & Takami, T. (2001). Cytoplasmic/nuclear expression without mutation of exon 3 of the beta-catenin gene is frequent in the development of the neoplasm of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* **82**, 450-5.

Shally, M., Alloul, N., Jackman, A., Muller, M., Gissmann, L. & Sherman L. (1996). The E6 variant proteins E6I-E6IV of human papillomavirus 16: expression in cell free systems and bacteria and study of their interaction with p53. *Virus Res.* 81-96.

Sparks, A., Morin, P., Vogelstein, B. & Kinzler, K. (1998). Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**, 1130-1134

Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Frovenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B. & Klenk, D. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* **150**, 78-85.

Smotkin, D., & F. O. Wettstein. (1986). Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 4680-4684.

Sominsky, S., Kuslansky, Y., Shapiro, B., Jackman, A., Haupt, Y., Rosin-Arbesfeld, R. & Sherman, L. (2014). HPV16 E6 and E6AP differentially cooperate to stimulate or augment Wnt signaling. *Virology* **470**, 510-523.

Straight S., Herman, B. & McCance, J. (1995). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* **69**, 3185-3192.

Tang, S., Tao, M., McCoy, P. & Zheng, Z. (2006). The E7 Oncoprotein Is Translated from Spliced E6*1 Transcripts in High-Risk Human Papillomavirus Type 16- or Type 18-Positive Cervical Cancer Cell Lines via Translation Reinitiation. *J Virol* **80**, 4249-4263.

- Thomas, M., Pim, D. & Banks, L. (1999).** The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* **18**, 7690-7700.
- Thomas, M., Glaunsinger, B., Pim, D., Javier, R. & Banks, L. (2001).** HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation. *Oncogene* **20**, 5431-5439.
- Tomaic, V., Pim, D. & Banks, L. (2009).** The stability of the human papillomavirus E6 oncoprotein is E6AP dependent. *Virology* **393**, 7–10.
- Todorovic, B., Hung, K., Massimi, P., Avvakumov, N., Dick, F., Shaw, G., Banks, L. & Mymryk, J. (2012).** Conserved region 3 of human papillomavirus 16 E7 contributes to deregulation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol* **86**, 13313-13323.
- Tungteakkhun, S. & Duerksen-Hughes, P. (2008).** Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol* **153**, 397-408.
- Üren, A., Fallen, S., Yuan, H., Usubutun, A., Kucukali, T., Schlegel, R. & Toretsky, J. (2005).** Activation of the canonical Wnt pathway during genital keratinocyte transformation: A model for cervical cancer progression. *Cancer Res* **65**, 6199-6206.
- Venuti, A., Paolini, F., Nasir, L., Corteggio, A., Roperto, S., Campo, M. & Borzacchiello, G. (2011).** Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer* **10**, 1-18.
- Veríssimo, F., Galvão, J. & Araújo J. (2013).** Biology and natural history of human papillomavirus infection. *Open Access Journal of Clinical Trials* **5**, 1-12.
- Vosa, L., Sudakov, A., Remm, M., Ustav, M. & Kurg, R. (2012).** Identification and Analysis of Papillomavirus E2 Protein Binding Sites in the Human Genome. *J Virol* **86**, 348-357
- Wang, Q., Kennedy, A., Das, P., McIntosh, P., Howell, S., Isaacson, E., Hinz, S., Davy, C. & Doorbar, J. (2009).** Phosphorylation of the human papillomavirus type 16 E1^{E4} protein at T57 by ERK triggers a structural change that enhances keratin binding and protein stability. *J Virol* **83**, 3668-3683
- Wang, J. & Roden, R. (2013).** L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology* **445**, 175-186.
- Willert, K., Brown, J., Danenberg, E., Duncan, A., Weissman, I., Reya, T., Yates, J. & Nusse, R. (2003).** Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448-452.
- Wilson, V., West, M., Woytek, K. & Rangasamy, D. (2002).** Papillomavirus E1 proteins: Form, function and features. *Virus Genes* **24**, 275-290.
- White, A., Chien, D. & Dawson, W. (2012).** Dysregulation of Wnt/beta-catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* **142**, 219-232.

- Woodham, A., Da Silva, D., Skeate, J., Raff, A., Ambroso, M., Brand, H., Isas, J., Langen, R. & Kast, W. (2012).** The S100A10 subunit of the annexin A2 heterotetramer facilitates L2-mediated human papillomavirus infection. *PLoS One* **7**, 1-15.
- Xing, Y., Clements, W., Le Trong, I., Hinds, T., Stenkamp, R., Kimelman, D. & Xu, W. (2004).** Crystal structure of a β -catenin/APC complex reveals a critical role for APC phosphorylation in APC function. *Mol Cell* **15**, 523-533.
- Zhang, Y., Liu, C., Duan, X., Ren, F., Li, S., Jin, Z., Wang, Y., Feng, Y., Liu, Z., & Chang, Z. (2014).** CREPT/RPRD1B, a Recently Identified Novel Protein Highly Expressed in Tumors, Enhances the β -Catenin TCF4 Transcriptional Activity in Response to Wnt Signaling. *J Biol Chem* **289**, 22589-22599.
- Zhang, N., Wei, P., Gong, A., Chiu, W., Lee, H., Colman, H., Huang, H., Xue, J., Liu, M., & Wang, Y. (2011).** FoxM1 promotes β -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell*. **20**, 427-442.
- zur Hausen, H. (1996).** Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim and Biophys Acta* **1288**, 55-78.

XII. ANEXOS

1. Preparación de medios de cultivo y amortiguadores

1.1 Medio Luria- Bertani o LB

Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10 g
Peptona de caseína	10 g

Se disolvieron en 100 ml de agua destilada y se esterilizó por 15 minutos a 121°C

1.2 Medio Luria-Bertani Agar

Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10 g
Peptona de caseína	10 g
Agar bacteriológico	

Se disolvieron en 1000 ml de agua destilada y se esterilizó por 15 minutos a 121°C

1.3 Medio D-MEM/F-12 pH 7.4

DMEM-F12(Gibco®)	1 sobre 15.6 g
NaHCO ₃	1.2 g

Se disolvió en 1000 ml de agua destilada

1.4 Buffer TBE 5 X pH 8

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

Se disolvieron en 1000 ml de agua destilada.

1.4 Buffer TBS 10x pH 7.5

Tris-base (1M)	60.5 g
NaCl	87.6 g

Se disolvieron en 1000 ml de agua destilada.

1.5 Buffer TBS-T 1x pH 7.5

Buffer TBS 10x	100 ml
Tween-20	1000 μ l

Se disolvieron en 900 ml de agua destilada

1.6 Buffer PBS pH 7.4

Un sobre de PBS (Sigma ®)

Se disolvió 1000 ml de agua destilada y se esterilizó durante 15 minutos a 120°C

1.7 Buffer CaCl₂- Tris pH 7.5

CaCl ₂ (100 mM)	0.55 g
Tris (10mM)	0.078 g

Se disolvieron en 50 ml de agua destilada

1.8 Buffer de lisis (40 ml) para Western blot

NaCl	0.350 g
Tris	0.096 g
Igepal CA-630	400 μ l

Se disolvieron en 40 ml de agua destilada

1.9 Buffer para gel concentrador pH 6.8

SDS	2 g
Tris-base	30.2 g

Se disolvieron en 500 ml de agua destilada

1.10 Buffer para gel separador pH 8.8

SDS	2 g
Tris-base	91 g

Se disolvieron en 500 ml de agua destilada

1.11 Buffer de corrida 5x

SDS	2.5 g
Tris-base	7.5 g
Glicina	36 g

Se disolvieron en 500 ml de agua destilada

1.12 Buffer de transferencia 1x

Tris-base	3.79 g
Glicina	18 g
Metanol	250 ml

Se disolvieron en 1000 ml de agua destilada

1.13 Buffer de bloqueo

Leche Svelty® sin grasa	5 %
BSA	2.5%

Se disolvieron en 50 ml de TBS-T

1.14 Buffer de lisis pH 7.8 para ensayos de luciferasa

K ₂ HPO ₄ (100mM)	9.15 ml
KH ₂ PO ₄ (100 mM)	0.85 ml
Triton X-100	0.2%

Se agregó 0.1 mM de DTT

1.15 Buffer de reacción para luciferasa

Glicil-glicina (25mM)	1ml
MgCl ₂ (15mM)	300 µl
ATP (5mM)	1ml

BSA 200 μ l

Se disolvió en 17.5 ml de agua destilada

1.16 Buffer de reacción para β -galactosidasa

Na₂HPO₄ (100mM) 93.2 ml
NaH₂PO₄ (100mM) 6.38 ml
MgCl₂ 100 μ l

1.17 Solución aceleradora

Acelerador 10%
NaOH

2. Reacciones para RT-PCR y PCR de punto final

2.1 Reacción y programas para PCRs

Tabla 2.1. Se presentan las cantidades necesarias de cada reactivo para la preparación de una reacción de retrotranscripción de PCR con un volumen de 20 μ l

Reactivo	Cantidades	Concentración final
Buffer 10x	2 μ l	1x
dNTPs	2 μ l	20 mM
MgCl ₂	1.6 μ l	2mM
Oligo 5'	0.1 μ l	0.25 pM
Oligo 3'	0.1 μ l	0.25 pM
Taq polimerasa gold	0.15 μ l	0.037 U/ μ l
ADN		Aprox 100 ng
Agua	Ajustar	
TOTAL	20 μ l	

2.2 Reacción y programa para RT-PCR

Tabla 2.2. Se presentan los reactivos y las cantidades correspondientes para la preparación de una reacción de retrotranscripción.

Reactivo	Cantidad	Concentración final
RNA	$n \mu\text{l}$	500 ng
Hexámeros aleatorios	1 μl	1x
dNTPs	1 μl	2mM
Agua	Ajustar a 12 μl	-
Incubación a 65°C por 5 minutos		
Buffer 5x	4 μl	1x
DTT	1 μl	0.1 M
RNasa OUT™	1 μl	40 unidades/ μl
Incubación a 25°C por 2 minutos		
SuperScript™	1 μl	200 unidades/ μl
Programa para RT-PCR		

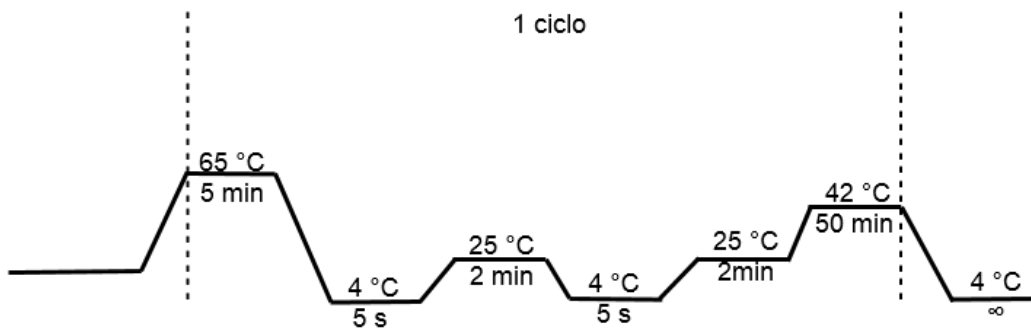


Figura 2.5. Programa para la amplificación de ADNc a partir de ARNm.

3. Reacciones para restricciones y ligación

3.1 Reacciones de restricciones

Tabla 3.1 Se presentan las cantidades necesarias de cada reactivo para la preparación de las reacciones de restricción con las dos endonucleasas EcoRI y BgIII.

Primera restricción	
Reactivo	Cantidad
Buffer 10x	2 μ l
EcoRI (Invitrogen®)	1 μ l
DNA	500 ng
Agua destilada	Ajustar a 20 μ l
Incubación a 37°C por 1hr	
Segunda restricción	
BgIII (Invitrogen®)	1 μ l
Incubación a 37°C por 1hr	

3.2 Reacción de ligación

Tabla 3.2 Se presentan las cantidades necesarias de cada reactivo para una reacción de ligación.

Reactivo	Cantidad
Ligasa T4 (Invitrogen®)	1 μ l
Buffer 5x	4 μ l
Inserto digerido	3x
Plásmido digerido	1x
Agua	Ajustar a 20 μ l
Incubación a 37°C por 1 hr	

4. Preparación de geles de poliacrilamida

Tabla 4. Se muestran las cantidades necesarias de cada reactivo para la preparación de geles de poliacrilamida de 0.15 mm. Dependiendo del número de geles a utilizar las concentraciones de cada reactivo se señalan para el gel separador y gel concentrador.

Gel Separador						
%	# de geles	Agua	Acrilamida 30%	Buffer pH 8.8	PSA 10%	TEMED
12%	1	1.75 ml	2 ml	1.25ml	15µl	5µl
	2	3.15ml	3.6 ml	2.25 ml	30µl	10µl
	3	5.45ml	6ml	3.8ml	45µl	15µl
Gel concentrador						
# de geles	Agua	Acrilamida 30%	Buffer pH 6.8	PSA 10%	TEMED	
1	1ml	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

Tabla 5. Se presentan las concentraciones a las que se usaron los anticuerpos, sus marcas y de qué animales se obtuvieron.

Anticuerpos primarios			
Anticuerpo	Concentración	Hecho en	Marca
Anti-Flag	1:1000	Ratón	Sigma
Anti-GAPDH	1:1000	Ratón	
Anticuerpo secundario			
Anticuerpo	Concentración	Hecho en	Marca
Anti-ratón	Roche	Cabra	Roche

6. Secuencias de oligonucleótidos específicos

Tabla 6. Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la clonación de E6 de VPH-16. Se indica en rojo los sitios de corte de las enzimas de restricción incluidos en al inicio de cada oligonucleótido.

Nombre	Secuencia del oligonucleótido	Pares de bases	Tm
EcoRI E6PVPH-16 Forward	GGG GAATT CATTTTCAGGA CCCACAGGAGC	30 pb	64.1 °C
BglII e6VPH-16 Reverse	GGG AGATCT TTACAGCTG GGTTTCTCTACGTG	34 pb	61.3 °C

7. Plásmido p3XFLAG-CMV

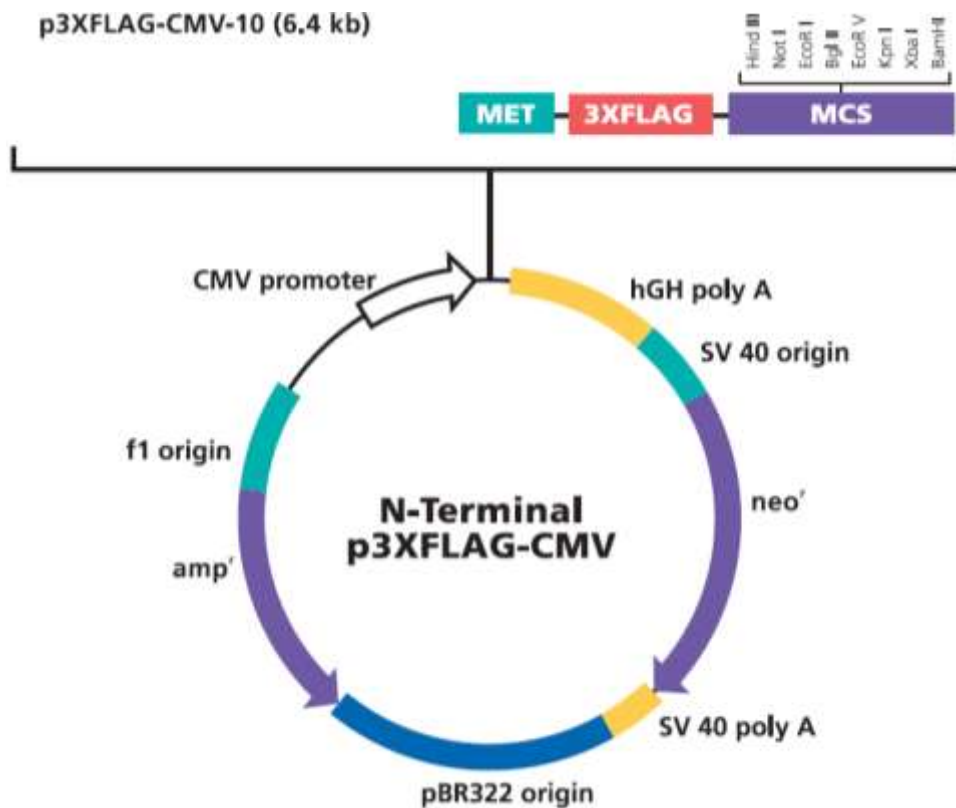


Figura 7.1 Vector de clonación p3XFLAG-CMV. Este vector de expresión permite generar proteínas de fusión con tres epitopes FLAG en su extremo amino terminal.

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

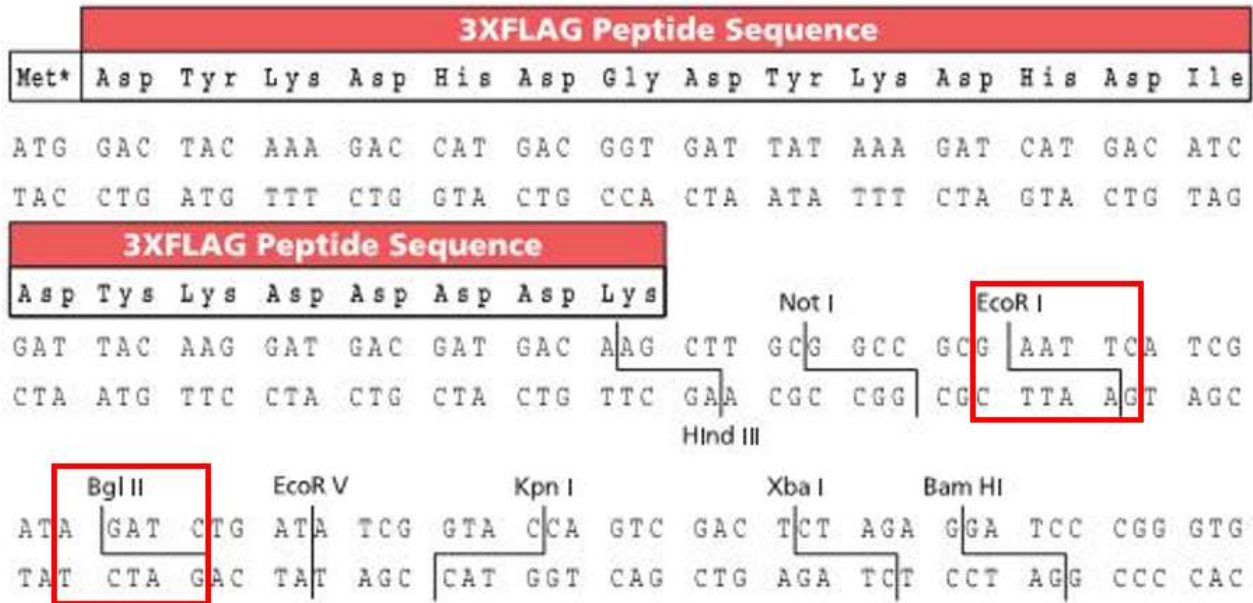


Figura 8.1 Sitio de clonación múltiple de p3XFLAG-CMV-10. En recuadros rojos se encierran los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas para la clonación de E6 de VPH-16: EcoRI y BglII. Al clonar el fragmento de E6, el sitio de corte de EcoRI provoca que el marco de lectura se recorra.

9. Secuenciación del fragmento E6 de VPH-16 clonado en el vector p3XFLAG-CMV 10.

E616

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 TTT CAG GAC CCA CAG GAG CGA CCC GGA AAG TTA CCA
CAG TTA TGC ACA GAG CTG CAA ACA ACT ATA CAT GAT ATA ATA TTA GAA TGT GTG TAC TGC AAG
CAA CAG TTA CTG CGA CGT GAG GTA TAT GAC TTT GCT TTT CGG GAT TTA TGC ATA GTA TAT AGA
GAT GGG AAT CCA TAT GCT GTA TGT GAT AAA TGT TTA AAG TTT TAT TCT AAA ATT AGT GAG TAT
AGA CAT TAT TGT TAT AGT GTG TAT GGA ACA ACA TTA GAA CAG CAA TAC AAC AAA CCG TTG TGT
GAT TTG TTA ATT AGG TGT ATT AAC TGT CAA AAG CCA CTG TGT CCT GAA GAA AAG CAA AGA CAT
CTG GAC AAA AAG CAA AGA TTC CAT AAT ATA AGG GGT CGG TGG ACC GGT CGA TGT ATG TCT TGT
TGC AGA TCA TCA AGA ACA CGT AGA GAA ACC CAG CTG TAA

Figura 9.1. Secuencia del fragmento E6 de VPH-16. En azul se indica el codón ATG y en rojo la secuencia correspondiente a las tres epítopes FLAG, ambos elementos están contenidos en el vector p3X-FLAG-CMV utilizado para la clonación. La secuencia de corte para la enzima de restricción EcoRI se resalta en verde y la adenina añadida en rosa. En gris se señala la secuencia de E6 de VPH-16 a la cual se le deletó el codón de inicio.

10. Plásmido p3XFLAG-E616

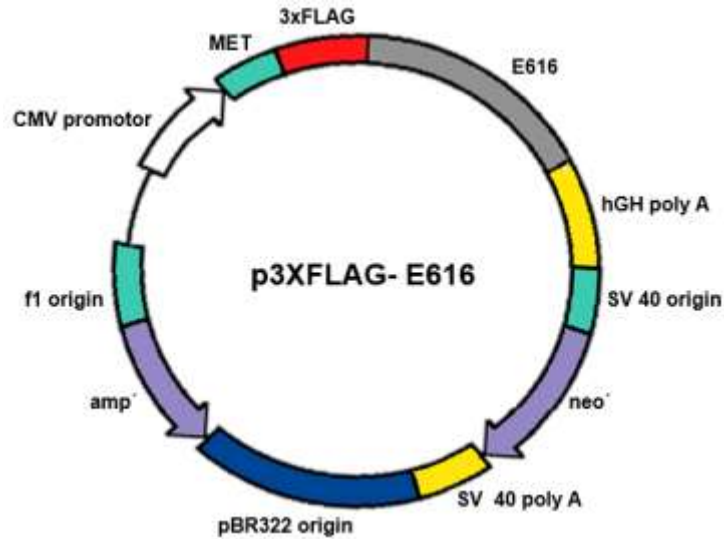


Figura 10.1. Construcción p3X-FLAG-E616. En el esquema se representa el plásmido obtenido a partir de la clonación de E6 de VPH-16 en el vector de clonación p3XFLAG-CMV.

11. Plásmido TOPFLASH

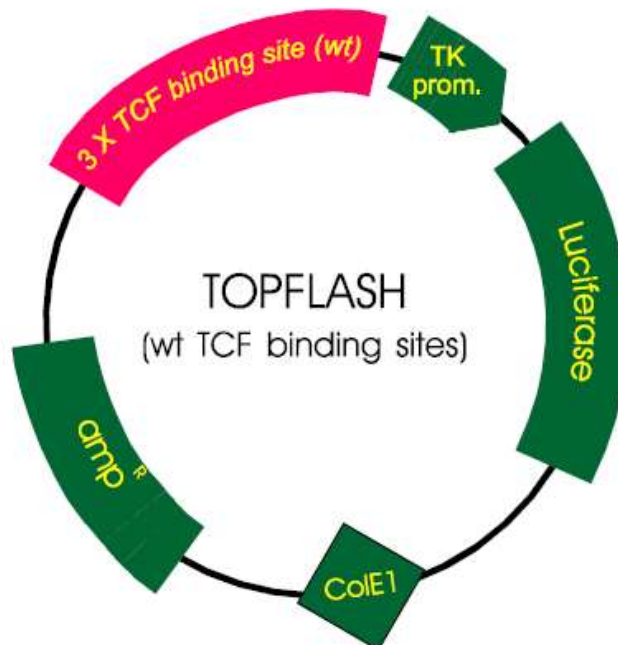


Figura 11.1. Plásmido TOPFLASH. En el esquema se representa el plásmido TOPFLASH que contiene el gen reportero luciferasa dependiente de TCF, el cual posee tres copias de sitios de unión a TCF río arriba del promotor TK (Thymidine Kinase).