



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EFFECTO DE LA ONCOPROTEÍNA E6 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO
TIPO 16 SOBRE EL RECEPTOR CD36 EN CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. RAMÍREZ ALCÁNTARA KATIA MONTSERRAT

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOAQUÍN MANZO MERINO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. SELMA ERÉNDIRA AVENDAÑO VÁZQUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. LORENA AGUILAR ARNAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., DICIEMBRE, 2020



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/765/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión virtual y extraordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **07 de octubre de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **RAMÍREZ ALCÁNTARA KATIA MONTSERRAT** con número de cuenta **310297783** con la tesis titulada **“EFECTO DE LA ONCOPROTEÍNA E6 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16 SOBRE EL RECEPTOR CD36 EN CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO”**, realizada bajo la dirección del **DR. JOAQUÍN MANZO MERINO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
Vocal: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
Secretario: DRA. SELMA ERÉNDIRA AVENDAÑO VÁZQUEZ
Suplente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Suplente: DRA. ADRIANA CONTRERAS PAREDES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de noviembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM**, por el apoyo académico que me permitió obtener la madurez y conocimiento necesarios para llegar a convertirme en Maestra.

Al **CONACYT** por la beca otorgada con número de becario: **923777**, que fue de gran apoyo para sostener mis estudios de Maestría. Al **Instituto Nacional de Cancerología** por su apoyo financiero a través del proyecto: (017/048/IBI) (CEI/1227/17) y al **CONACYT**, con el proyecto: “PRONAI-7-VIRUS Y CÁNCER” REF: 303044.

Al **Dr. Joaquín Manzo Merino**, tutor y guía principal de este proyecto y a la **Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez** y a la **Dra. Lorena Aguilar Arnal**, miembros esenciales de mi comité tutor.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A **mi familia**, especialmente a **mi mamá Isela**, **mi hermano Sebastian** y **mi abuelita Moni**, por haber demostrado una vez más, que están siempre para mí, para apoyarme en los buenos y malos momentos, y por ser uno de mis motores principales.

A **Joaquín Manzo Merino**, por enseñarme siempre, siempre. Por ser mi ejemplo en cuestiones académicas y además de persona. Por ser no sólo tutor sino también amigo. Por ampliar siempre mis expectativas de vida y por inculcar en mí el deseo de superación.

A la **Dra. Lizano** y a **mis compañeros de laboratorio**, por sus críticas constructivas que permitieron formarme como Maestra y además por hacerme mejor persona. Por el ambiente tan agradable tan característico de nuestro grupo.

A la **Dra. Verónica Jiménez Curihual**, por su enorme apoyo en el estudio computacional de Simulación Molecular realizado en este trabajo.

Al **Dr. Leonardo Saúl Lino Silva** del departamento de patología del INCan, por su apoyo con las lecturas de los casos de cáncer de orofaringe para determinar los niveles de CD36.

A los **miembros del Jurado: Dr. Alejandro Garrancá, Dra. Leticia Rocha, Dra. Eréndira Avendaño, Dra. Marcela Lizano y Dra. Adriana Paredes**, por sus invaluable comentarios que contribuyeron en la calidad de este trabajo.

DEDICATORIA

A mí, por la paciencia, el gran esfuerzo y por haber logrado superar todas las pruebas que se presentaron a lo largo de este pesado camino.

A mi familia, principalmente a mi mamá, por estar siempre y por hacerme más fuerte principalmente en los momentos más difíciles.

A Joaquín porque se ha convertido en uno de los principales guías en mi vida.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Cáncer	5
Cáncer de cabeza y cuello.....	6
Virus del Papiloma humano (VPH).....	6
Estructura y organización genómica del VPH	7
Función de las proteínas virales	8
Receptor CD36 en cáncer.....	11
ANTECEDENTES	12
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
General	13
Particulares	14
METODOLOGÍA	14
<i>Cultivo celular</i>	14
<i>Inmunofluorescencia indirecta</i>	14
<i>Cuantificación de ingreso de ácidos grasos</i>	15
<i>Transfección de células HaCat</i>	15
<i>Western blot</i>	15
<i>Simulación Molecular</i>	16

<i>Inmunohistoquímica</i>	18
RESULTADOS	19
La línea celular de cáncer de cabeza y cuello SCC90 (positiva a VPH16) exhibe mayores niveles del receptor CD36	19
La línea celular SCC90 (positiva a VPH16) exhibe un mayor consumo de ácidos grasos	20
La oncoproteína E6 del VPH16 induce un incremento en los niveles de la proteína CD36.....	21
La oncoproteína E6 del VPH16 interacciona fuertemente con dos sitios de la proteína CD36 en un estudio <i>in Silico</i>	22
La expresión de CD36 no está asociada a la presencia de VPH en casos de cáncer de cabeza y cuello.....	26
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	40
Anexo 1: Artículos	40
Anexo 2: Soluciones	40

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Estructura del VPH y organización de su genoma

Figura 2. Expresión del receptor CD36 en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello

Figura 3. Ingreso de ácidos grasos en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello

Figura 4. Efecto de la oncoproteína E6 del VPH16 sobre los niveles de la proteína CD36

Figura 5. Modelado del dominio C-terminal de la proteína CD36

Figura 6. Modelos de interacción estable entre la oncoproteína E6 del VPH16 y la proteína CD36 obtenidos del *docking* ciego

Figura 7. Modelo detallado del sitio de interacción entre la oncoproteína E6 del VPH16 y la proteína CD36 en el Modelo 2

Figura 8. Modelos de interacción estable entre la oncoproteína E6 del VPH16 y el dominio C-terminal de la proteína CD36

Figura 9. Estandarización de inmunohistoquímica para CD36 en adipocitos

Figura 10. Expresión de CD36 en casos de cáncer de orofaringe positivos y negativos a VPH

Tabla 1. Función de las proteínas del VPH

Tabla 2. CD36 en casos de cáncer de cabeza y cuello (n=22)

RESUMEN

La infección persistente por el Virus del Papiloma humano (VPH) se asocia al desarrollo de distintos tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de cabeza y cuello. El tipo histológico más común es el de tipo escamoso (HNSCC), siendo el sexto cáncer más común a nivel mundial. El VPH 16 es el tipo viral de mayor prevalencia. El HNSCC tiene una incidencia de metástasis del 10% en la presentación clínica inicial, mientras que un 30% la desarrollará durante el curso de la enfermedad. En general, la enfermedad metastásica representa el principal factor pronóstico. La expresión continua de las proteínas virales E6 y E7 es requisito indispensable para mantener el fenotipo maligno en los cánceres provocados por este virus. La oncoproteína E6 de los VPH de alto riesgo debe sus acciones a la capacidad de interactuar con dominios PDZ o bien con motivos LxxLL en diversas proteínas celulares desencadenando diversos procesos, que finalmente permiten la transformación celular. Esto pone de manifiesto la importancia de la interacción de la oncoproteína E6 con diversas proteínas blanco en el proceso carcinogénico.

Dentro de los procesos celulares asociados a la carcinogénesis, se encuentra la alteración en la expresión de diversos receptores. Recientemente han surgido estudios que han evaluado al receptor CD36 en diversos tipos de cáncer. El análisis *in Silico* de la secuencia de aminoácidos de CD36 indica la presencia de un motivo LxxLL, el cual es clave en la interacción con la oncoproteína E6 del VPH, sugiriendo que el VPH podría modular la función de CD36 durante el proceso carcinogénico. Adicionalmente, la internalización de ácidos grasos por CD36 induce la activación de vías de señalización implicadas en los procesos de transición epitelio mesénquima (TEM), invasión y metástasis; sin embargo, no se ha estudiado la existencia de un posible efecto del VPH sobre este receptor. Además, la internalización de ácidos grasos por CD36 activa el metabolismo de ácidos grasos favoreciendo el proceso de metástasis, estudiado en un modelo de cáncer oral negativo a VPH, por lo que los efectos de la presencia del virus sobre

este receptor en este tipo de cáncer aún permanecen sin explorar. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la oncoproteína E6 del VPH16 sobre el receptor CD36 en un modelo de cáncer de cabeza y cuello.

Con el fin de conocer los niveles del receptor CD36 en una línea celular de cáncer de cabeza y cuello positiva a VPH (SCC90) y una línea celular negativa al virus (FaDu), se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y posteriormente, para conocer la funcionalidad del receptor en estas líneas celulares, se realizaron ensayos de consumo de ácidos grasos. Se analizaron los niveles proteicos de CD36 en presencia de la oncoproteína E6 del VPH tipo 16, el tipo viral de mayor prevalencia en cáncer de cabeza y cuello, mediante la transfección transitoria en células HaCat. Para determinar la posible interacción del receptor CD36 con la oncoproteína E6 del VPH16, se realizó un estudio computacional de Simulación Molecular. Finalmente, para determinar la asociación entre la presencia de VPH y la expresión de CD36 en cáncer de cabeza y cuello, se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico en casos positivos y negativos al virus.

La señal de CD36 en la línea celular SCC90 (positiva a VPH) fue más intensa comparando con la línea celular FaDu (negativa a VPH) en ensayos de inmunofluorescencia, coincidiendo con un mayor ingreso de ácidos grasos en la línea celular SCC90. La oncoproteína E6 incrementó el nivel del receptor CD36 en el modelo de transfección empleado. Los resultados obtenidos en la Simulación Molecular sugieren dos sitios de posible interacción fuerte en la estructura de CD36 con la oncoproteína E6 del VPH16, posicionando a este receptor como un posible nuevo blanco de la oncoproteína E6. El análisis inmunohistoquímico en casos de cáncer de orofaringe no mostró asociación alguna entre la presencia de VPH y la expresión de CD36 en cáncer de cabeza y cuello. Resulta de gran interés continuar con el estudio de la interacción *in Vitro* de la oncoproteína E6 del VPH16 con el receptor CD36, además de conocer el punto específico de regulación de este receptor por parte de la oncoproteína E6 a lo largo de la carcinogénesis y la progresión del cáncer.

ABSTRACT

Persistent infection by the Human Papillomavirus (HPV) is associated with the development of different types of cancer, including head and neck cancer, among which head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the most common histological type, being the sixth most common cancer worldwide. HPV 16 is the most prevalent viral type. HNSCC has a 10% incidence of metastasis in the initial clinical presentation, while 30% will develop it during the course of their disease. In general, metastatic disease represents the main prognostic factor. The continuous expression of the viral proteins E6 and E7 is a prerequisite for maintaining the malignant phenotype in cancers caused by this virus. The E6 oncoprotein of high-risk HPVs owes its actions to the ability to interact with PDZ domains or with LxxLL motifs of various cellular proteins, triggering various processes that ultimately allow cell transformation. This highlights the importance of the interaction of the E6 oncoprotein with various target proteins in the carcinogenic process.

Within the cellular processes associated with carcinogenesis, is the alteration in the expression of various receptors. Recently, various studies have emerged that have studied the CD36 receptor in various types of cancer. An *in Silico* analysis of the amino acid sequence of CD36 indicates the presence of a LxxLL motif, which is the key to the interaction with the HPV E6 oncoprotein, suggesting that HPV could modulate CD36 function during the carcinogenic process. The internalization of fatty acids by CD36 induces the activation of signaling pathways involved in the processes of EMT (mesenchymal-epithelial transition), invasion and metastasis; however, the existence of a possible effect of HPV on this receptor has not been studied. In addition, the internalization of fatty acids by CD36 activates the metabolism of fatty acids favoring the metastasis process in head and neck cancer, where an HPV-negative oral cancer model was studied (Pascual et al., 2017), therefore the effects of the presence of the virus on this receptor in this type of cancer remains unexplored. The objective of this work was to determine the effect

of the E6 oncoprotein of HPV16 on the CD36 receptor in a model of head and neck cancer.

In order to analyze the levels of the CD36 receptor in an HPV-positive head and neck cancer cell line (SCC90) and a virus-negative cell line (FaDu), immunofluorescence assays were performed. Subsequently, to determine the functionality of the receptor in these cell lines, fatty acid consumption assays were performed. CD36 protein levels were analyzed in the presence of the E6 oncoprotein of HPV type 16, which is most prevalent viral type in head and neck cancer, in transient transfection in HaCat cells. To determine the possible interaction of the CD36 receptor with the E6 oncoprotein of HPV16, a Molecular Simulation computational study was performed. Finally, to determine the association between the presence of HPV and the expression of CD36 in head and neck cancer, an immunohistochemical analysis was carried out in positive and negative cases for the virus.

The CD36 signal in the SCC90 cell line (HPV positive) was more intense compared to the FaDu cell line (HPV negative) in immunofluorescence assays, coinciding with a higher entry of fatty acids in the SCC90 cell line. The E6 oncoprotein showed an increase in the level of the CD36 receptor in the transfection model used. The results obtained in the Molecular Simulation suggest two sites of possible strong interaction in the structure of CD36 with the E6 oncoprotein of HPV16, positioning it as a possible new target for the E6 oncoprotein. Immunohistochemical analysis did not show any association between the presence of HPV and the expression of CD36 in head and neck cancer.

It is of great interest to continue with the study of the *in vitro* interaction of the E6 oncoprotein of HPV16 with the CD36 receptor, in addition to knowing the specific regulation of this receptor by the E6 oncoprotein throughout carcinogenesis and cancer progression.

EFFECTO DE LA ONCOPROTEÍNA E6 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16 SOBRE EL RECEPTOR CD36 EN CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer se refiere a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar prácticamente cualquier parte del cuerpo y que están caracterizadas por la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos (OMS 2020: <https://www.who.int/topics/cancer/es/>).

Los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer incluyen la exposición a agentes físicos, químicos e infecciosos. Entre estos últimos se encuentran bacterias, virus y algunos parásitos, en conjunto son causantes de aproximadamente el 20% de todos los casos de cáncer a nivel mundial (Morales-Sánchez y Fuentes-Pananá, 2014).

La infección por el Virus del Papiloma humano (VPH) es considerada la infección de transmisión sexual (ETS) más frecuente a nivel mundial cuya infección persistente está asociada al desarrollo de distintos tipos de cáncer. En la actualidad, se sabe que el VPH es causante de aproximadamente el 4.5% de todos los casos de cáncer a nivel mundial. El papel etiológico del VPH en el desarrollo de cáncer fue atribuido por primera vez al desarrollo de cáncer de cérvix; sin embargo, en la actualidad se conoce ya su asociación con otros tipos de cáncer tanto de la región anogenital como el cáncer de vagina, vulva, pene y ano, así como de la región de cabeza y cuello como el cáncer de cavidad oral y orofaringe (de Sanjosé *et al.*, 2019).

Cáncer de cabeza y cuello

El cáncer de cabeza y cuello (HNC, por sus siglas en inglés) comprende un grupo heterogéneo de tumores que se originan en diversos sitios anatómicos de la vía aérea superior incluyendo la cavidad oral, la cavidad nasal, la laringe, la hipofaringe y la orofaringe, los cuales presentan asociación con diferentes factores etiológicos (Simard *et al.*, 2014). El HNC presenta una incidencia de más de 500,000 casos anuales en todo el mundo. El tipo más común de HNC es el carcinoma de células escamosas (HNSCC, por sus siglas en inglés), el cual es el sexto cáncer más común en todo el mundo. La patogénesis del HNSCC se ha asociado históricamente con el consumo de tabaco y alcohol; sin embargo, evidencia reciente ha demostrado que el VPH está involucrado hasta en un 25% de los HNSCC, particularmente en el subtipo de carcinoma orofaríngeo donde se puede presentar hasta en el 60% de estos casos (Spence *et al.*, 2016). Entre los tipos de VPH de alto riesgo involucrados en la carcinogénesis de cabeza y cuello, el VPH tipo 16 es el más común (Taberna *et al.*, 2017).

Particularmente, el HNSCC presenta una incidencia de metástasis de alrededor del 10% en la presentación clínica inicial, con un 20-30% adicional de pacientes que la desarrollarán durante el curso de la enfermedad. En general, la enfermedad metastásica representa el principal factor pronóstico en HNSCC (Pisani *et al.*, 2020).

Virus del Papiloma humano (VPH)

La clasificación del VPH se basa en la secuencia de nucleótidos de la región correspondiente al marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) que codifica para la proteína de la cápside L1. Se han clasificado cinco géneros de VPH: α -papilomavirus, β -papilomavirus, γ -papilomavirus, μ -papilomavirus y ν -papilomavirus, de los cuales el género α resulta de interés médico (Bzhalava *et al.*, 2015).

Los VPH del género α se clasifican a su vez, según su potencial carcinogénico, en VPH de alto y bajo riesgo. Los VPH de alto riesgo son responsables del desarrollo de los diversos tipos de cáncer (Kobayashi *et al.*, 2018; de Sanjosé *et al.*, 2019).

Estructura y organización genómica del VPH

El VPH es un virus no envuelto, con una cápside de estructura icosaédrica de aproximadamente 50-60 nm de diámetro, dicha cápside se encuentra formada por 72 capsómeros constituidos por las proteínas estructurales L1 y L2. EL genoma viral es de DNA circular bicatenario de aproximadamente 8000 pares de bases (Doorbar *et al.*, 2015).

Independientemente del género, el genoma del VPH ha sido dividido en tres regiones para su estudio: una región larga de control (LCR, por sus siglas en inglés) que contiene elementos reguladores (sitios de unión a factores de transcripción, elementos *enhancer* y promotores, así como el origen de replicación (*ori*)); una región que codifica para las proteínas de expresión temprana (proteínas E1-E7) y una región que codifica para las proteínas de expresión tardía (proteínas L1 y L2) (Figura 1) (Quint *et al.*, 2015).

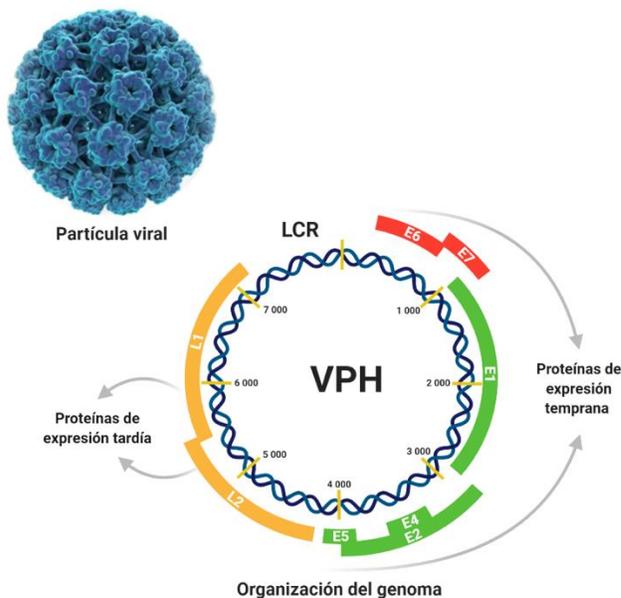


Figura 1. Estructura del VPH y organización de su genoma. El VPH es un virus no envuelto, con una cápside icosaédrica de aproximadamente 50-60 nm de diámetro, dicha cápside se encuentra formada por 72 capsómeros constituidos por las proteínas L1 y L2. Su genoma es de DNA circular bicatenario de aproximadamente 8000 pares de bases el cual contiene una LRC, una región que codifica para las proteínas de expresión temprana (proteínas E1-E7) y una región que codifica para las proteínas de expresión tardía (proteínas L1 y L2).

Función de las proteínas virales

Diversos estudios han demostrado múltiples funciones para las proteínas del VPH, las funciones más estudiadas para cada proteína viral se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Función de las proteínas del VPH

<i>Proteína viral</i>	<i>Función</i>
E1	Formación de complejos heterodiméricos con E2 y control de la replicación viral (Bergvall <i>et al.</i> , 2013).
E2	Regulación del promotor de genes de expresión temprana y en conjunto con E1 el control de la replicación viral (McBride, 2013; Ribeiro <i>et al.</i> , 2018).
E4	Liberación de las partículas virales mediante disrupción de la red de citoqueratina (Doorbar <i>et al.</i> , 2013).
E5	Evasión del sistema inmune (DiMaio <i>et al.</i> , 2013).
E6	Inactivación de proteínas celulares y es una de las principales oncoproteínas virales (Grm y Banks, 2004; Tungteakkhun y Duerksen-Hughes, 2008).
E7	Inactivación de proteínas celulares y es una de las principales oncoproteínas virales (Songock <i>et al.</i> , 2017).
L1	Proteína principal de la cápside viral (Wang y Roden, 2013).
L2	Proteína minoritaria de la cápside viral (Wang y Roden, 2013).

La expresión de las proteínas virales E6 y E7 es requisito indispensable para mantener el fenotipo maligno en los cánceres provocados por este virus (Doorbar *et al.*, 2015).

Proteína E7

La proteína E7 juega un papel central en el ciclo viral pues reprograma el entorno celular para que sea propicio para la replicación del genoma viral, así mismo E7 de los VPH de alto riesgo presenta un alto potencial transformante. El mecanismo más conocido de regulación génica inducido por E7 es sobre el sistema pRb/E2F. Las proteínas de la familia pRb, se unen al factor de transcripción E2F y reclutan diversos complejos que inhiben la transcripción en diversos promotores. E7 se une a los miembros de la familia pRb induciendo su inactivación y liberación del factor

E2F, lo cual lleva a la alteración de los complejos inhibitorios y facilita la expresión de diversas proteínas necesarias en la síntesis de DNA (Songock *et al.*, 2017).

Proteína E6

Una de las diferencias clave entre la oncoproteína E6 de los VPH de alto y bajo riesgo, es la existencia de un motivo de unión a dominios PDZ (PBM) presente en los VPH de alto riesgo pero no en los de bajo riesgo. El PBM permite la interacción y en muchos casos, la posterior degradación de proteínas que contienen un dominio PDZ (Grm y Banks, 2004). E6 interacciona con el dominio PDZ de las proteínas MAGI-1, hScrib y hDlg enviándolas a degradación y favoreciendo así la pérdida de la polaridad celular en el proceso de transformación (Ganti *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la oncoproteína E6 de los VPH de alto riesgo interacciona con el dominio PDZ de la proteína del retrómero SNX27, proteína esencial en la vía de reciclaje endosomal. La interacción de E6 con SNX27 resulta en un incremento en el reciclaje hacia la membrana celular del receptor de glucosa GLUT1, favoreciendo la captación de este nutriente, necesario en el mantenimiento del fenotipo maligno (Ganti *et al.*, 2016).

La proteína E6, en cooperación con E6AP, forma un complejo que degrada diversas de sus proteínas blanco. La proteína asociada a E6 (E6AP) es miembro de la familia de proteínas ubiquitina ligasas E3. E6 se une al motivo LxxLL en E6AP y, como heterodímero, puede inducir la degradación de p53 promoviendo la inhibición de la apoptosis y permitiendo así la progresión del ciclo celular. La oncoproteína E6 puede inducir también la degradación de proteínas pro-apoptóticas tales como Bak (Yeo-Teh *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que E6 interacciona con el motivo LxxLL de otras proteínas celulares entre las cuales se encuentra el factor 3 regulador de interferón (IRF-3) donde dicha interacción obstruye la transactivación de IRF-3 afectando así la respuesta inmune antiviral (Tungteakkhun y Duerksen-Hughes, 2008). E6 interacciona también con el motivo LxxLL de paxilina, proteína importante en las

adhesiones focales celulares, así como en la organización de la actina. La unión de E6 con paxilina interrumpe la formación de las fibras de actina contribuyendo así en la transformación celular (Tungteakkhun y Duerksen-Hughes, 2008). De esta forma se pone de manifiesto la importancia de la interacción de la oncoproteína E6 con diversas proteínas con dominios PDZ o motivos LxxLL llevando a cabo la modificación de diversos procesos celulares.

Una explicación plausible del aumento de la capacidad oncogénica de los VPH de alto riesgo y en particular del tipo VPH16 reside en la actividad de las oncoproteínas E6 y E7. Aunque la actividad E6 y E7 está presente en los tipos de alto y bajo riesgo, su papel en los tipos de bajo riesgo se limita a aumentar la producción viral y es en gran medida insuficiente para desencadenar el desarrollo de lesiones preneoplásicas y cáncer. Los tipos de VPH de alto riesgo han desarrollado varios mecanismos para evitar la respuesta inmune del huésped, que es importante para la persistencia viral y la progresión a enfermedades neoplásicas asociadas al VPH. Una de las primeras estrategias para evitar la detección es mantener un perfil muy bajo (de Sanjosé *et al.*, 2018).

El genoma viral es mantenido en un bajo número de copias en el estrato basal del epitelio y conforme la célula infectada se diferencia a lo largo de los diferentes estratos, la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 induce un incremento en la replicación del genoma viral. En la mayoría de los casos, la infección es detectada y eliminada por el sistema inmune (Doorbar *et al.*, 2015). Sin embargo, la accidental integración del genoma viral en el genoma celular en conjunto con la acción de las oncoproteínas virales pueden inducir la progresión a cáncer (McBride y Warburton, 2017). El proceso carcinogénico, iniciado con la activación de E6 y E7, debe complementarse con la acumulación de alteraciones adicionales en el huésped para dar lugar al fenotipo de cáncer invasivo (de Sanjosé *et al.*, 2018).

Si bien la infección por VPH es requisito para el desarrollo del cáncer, esta no es suficiente, dejando de manifiesto que existen alteraciones en otros procesos celulares que finalmente permiten el establecimiento de la enfermedad. Dentro de los procesos celulares asociados a la carcinogénesis, se encuentra la alteración en la expresión de diversos receptores tales como receptores de tipo tirosina cinasa (Sigismund *et al.*, 2018), receptores acoplados a proteínas G (Bar-Shavit, *et al.*, 2016), receptores implicados en vías metabólicas como CD36 (Ensiu *et al.*, 2018), entre otros.

Receptor CD36 en cáncer

Recientemente han surgido diversos estudios sobre la asociación de algunos tipos de cáncer y el receptor CD36 (Nath *et al.*, 2015; Pascual *et al.*, 2017; Ladanyi *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2019). El análisis *in Silico* de la secuencia de aminoácidos del receptor CD36 indica la presencia de un motivo LxxLL el cual es clave en la interacción con la oncoproteína E6 del VPH, sugiriendo que el VPH podría modular la función de CD36 durante el proceso carcinogénico.

El receptor CD36 es considerado la principal proteína traslocadora de ácidos grasos al interior de la célula (Glatz y Luiken, 2018). CD36 es una glicoproteína presente en la membrana de múltiples tipos celulares, entre ellas las células epiteliales. Este receptor presenta en su estructura dos dominios transmembranales, así como un largo loop extracelular y dos colas cortas citoplasmáticas (Glatz y Luiken, 2018).

El receptor CD36 se une a diversas moléculas de naturaleza lipídica, pero presenta una mayor afinidad por los ácidos grasos de cadena larga induciendo la translocación de estas moléculas al interior de la célula. Se ha demostrado que la internalización de ácidos grasos por CD36 induce la activación de vías de señalización implicadas en los procesos de transición epitelio-mesénquima (TEM), invasión y metástasis en diferentes tipos de cáncer (Nath *et al.*, 2015; Ladanyi *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018; Deng *et al.*, 2019; Pan *et al.*, 2019), además de la

sobreexpresión de proteínas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos favoreciendo también el proceso de metástasis en cáncer de cabeza y cuello (Pascual *et al.*, 2017).

ANTECEDENTES

Deng y colaboradores (2019) determinaron una alta expresión del receptor CD36 en tumores pobremente diferenciados en pacientes con cáncer de cérvix. La alta expresión del receptor estuvo también relacionada a la presencia de metástasis. En este mismo estudio, se demostró, además, una alta expresión de CD36 y su localización principalmente en membrana en las líneas celulares HeLa y SiHa, lo cual promovió los procesos de proliferación, transición epitelio mesénquima, migración, invasión e inhibió la apoptosis en estas líneas celulares, no así en la línea celular C33A, la cual mostró niveles menores de CD36. Adicionalmente, se demostró que la sobreexpresión de CD36 induce un incremento en el tamaño tumoral y la metástasis (Deng *et al.*, 2019). A pesar de la existencia de diferencias en la expresión del receptor CD36 en las líneas celulares positivas al VPH (HeLa y SiHa) y la línea celular negativa al virus (C33A), en este estudio no fue considerada la existencia de un posible efecto del VPH sobre el receptor.

En un estudio llevado a cabo por Pascual y colaboradores (2017) en cáncer de cabeza y cuello, se determinó la existencia de una población celular dentro del tumor primario la cual sobreexpresa genes asociados a metástasis además de genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos incluyendo el ingreso y transporte, β -oxidación, biosíntesis y almacenamiento intracelular, donde el receptor CD36, mostró ser uno de los marcadores de esta población celular. La sobreexpresión del receptor indujo el potencial metastásico y su delección mostró la reducción del mismo en todas las líneas celulares analizadas. La alta expresión de CD36 mostró inducir la expresión de enzimas importantes en la β -oxidación, siendo la expresión de una de ellas (ACSL1) asociada con el potencial metastásico (Pascual *et al.*, 2017). Este estudio incluyó un modelo de cáncer oral

negativo a VPH, por lo que los efectos de la presencia del virus sobre este receptor aun permanecen sin explorar. Por esta razón resulta de gran interés determinar el efecto del VPH sobre el receptor CD36 en cáncer de cabeza y cuello positivo al virus, donde se puede sugerir una posible interacción entre la oncoproteína E6 y CD36.

JUSTIFICACIÓN

El papel etiológico del VPH en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer incluyendo el cáncer de cabeza y cuello ha sido ya bien establecido. El cáncer de cabeza y cuello es un tipo de cáncer con un alto potencial invasivo y metastásico. A pesar del conocimiento sobre la participación del receptor CD36 en el proceso de progresión del cáncer, a la fecha se desconoce el efecto de la oncoproteína E6 del VPH sobre este receptor, el cual ha sido asociado a la progresión de diversos tipos de cáncer incluyendo el cáncer de cérvix y el cáncer de cabeza y cuello.

HIPÓTESIS

La oncoproteína E6 del VPH16 induce cambios en los niveles del receptor CD36 en cáncer de cabeza y cuello.

OBJETIVOS

General

- Determinar el efecto de la oncoproteína E6 del VPH16 sobre el receptor CD36 en cáncer de cabeza y cuello.

Particulares

1. Determinar las diferencias en los niveles de CD36 en un modelo celular de cáncer de cabeza y cuello positivo y negativo a VPH.
2. Determinar las diferencias en el consumo de ácidos grasos en un modelo celular de cáncer de cabeza y cuello positivo y negativo a VPH.
3. Determinar el efecto de la oncoproteína E6 del VPH16 sobre los niveles del receptor CD36 en un modelo celular negativo a VPH.
4. Determinar la interacción de la oncoproteína E6 del VPH16 con el receptor CD36 mediante técnicas de Simulación Molecular.
5. Determinar la existencia de una asociación entre la presencia de VPH y la expresión del receptor CD36 en casos de cáncer de cabeza y cuello.

METODOLOGÍA

Cultivo celular

Células HaCat (queratinocitos humanos inmortalizados negativos a VPH), células FaDu (carcinoma de faringe de células escamosas, negativas a VPH) y células SCC90 (carcinoma de lengua de células escamosas, positivas a VPH tipo 16) fueron mantenidas en medio DMEM o EMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal e incubadas a 37°C al 5% de CO₂ en atmósfera húmeda.

Inmunofluorescencia indirecta

Células FaDu y SCC90 sembradas sobre cubreobjetos en placas de 6 pozos fueron fijadas empleando medio DMEM al 10% de suero bovino fetal y 4% de paraformaldehído (PFA). Las células fueron permeabilizadas con PBS/0.1% tritón y se empleó PBS como reactivo de lavado. Se utilizó el anticuerpo primario anti-CD36 (Novus) en una dilución 1:50 y posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa (Molecular Probes, Invitrogen) anti-mouse 488 en una dilución 1:700. Las células fueron montadas con Vectashield 800 (Vector Laboratories) con DAPI para teñir el núcleo y observadas

al microscopio de fluorescencia EVOS FL (Thermo Fisher Scientific) bajo el objetivo 40X. Las imágenes obtenidas fueron procesadas y analizadas empleando el software Image J (NIH).

Cuantificación de ingreso de ácidos grasos

Células FaDu y SCC90 fueron sembradas en placas de 96 pozos y mantenidas en el medio correspondiente suplementado con 10% de suero bovino fetal e incubadas durante 4 horas a 37°C al 5% de CO₂, en atmósfera húmeda. Posterior a este tiempo fueron incubadas durante 1 hora con el medio libre de suero correspondiente. Se agregó el reactivo Fatty Acid Dye Loading Solution (Fatty Acid Uptake Kit-Sigma MAK156) y se incubó a 37°C. Después de dicha incubación, se realizó la lectura de intensidad de fluorescencia en el lector de microplacas TECAN Infinite M200 PRO (Biotek) a los 30 y 60 minutos posterior a la adición del reactivo. Los valores de unidades relativas de fluorescencia obtenidos fueron graficados.

Transfección de células HaCat

Un total de 280,000 células HaCat fueron sembradas en placas de 60mm, incubadas durante 12 horas para permitir adherencia y posteriormente transfectadas empleando el reactivo PolyFect (QIAGEN) con los plásmidos peGFP (vector) y peGFP16E6. Transcurridas 24 horas, las células fueron lavadas para obtener un lisado celular empleando *Sample buffer 2X* para el posterior análisis mediante *Western blot*.

Western blot

Cantidades iguales de proteína fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) para después realizar la transferencia a una membrana de nitrocelulosa y posterior bloqueo con BSA al 7.5%. Para la detección de las proteínas se emplearon los anticuerpos primarios anti-GAPDH (Santa Cruz), anti-CD36 (Novus) y anti-GFP (Santa Cruz) en una dilución 1:1000. Una vez incubados los anticuerpos antes mencionados se procedió a incubar las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente

(Santa Cruz) acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés), en una dilución 1:10000. La señal fue revelada mediante auto-radiografía.

Simulación Molecular

Como alternativa para la determinación de la posible interacción entre la oncoproteína E6 y la proteína CD36 se realizó un estudio de Simulación Molecular entre ambas proteínas. Dicho estudio contó con el apoyo de la Dra. Verónica Jiménez Curihual de la Universidad Andrés Bello (República de Chile). La Simulación Molecular consistió en la obtención de un modelo de la proteína E6 del VPH16, seguido de un *docking* entre E6 y CD36, para finalmente estimar la energía libre de unión mediante el método MM/GBSA (Ricci-López *et al.*, 2019). A continuación, se describen los procesos empleados.

Modelado de la proteína E6 del VPH16

Las coordenadas iniciales de la oncoproteína E6 del VPH16 fueron obtenidas del complejo cristalográfico con la proteína IRF3 (PDB código 6SJA, 1.5 Å). Puesto que la estructura cristalográfica correspondiente al código 6SJA de E6 contiene 5 mutaciones, se decidió generar un modelo por homología utilizando la secuencia sin mutaciones (Uniprot P03126) para evitar la incorporación de cambios que pudieran repercutir en el potencial de interacción durante la DM. Para ello se utilizó la herramienta de alineamiento target-template incluida en el servidor web SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). El modelo de E6 contiene 151 aminoácidos y dos iones Zn^{2+} . El estado de protonación de los residuos ionizables fue ajustado a un pH de 6.5 usando las herramientas del servidor H++ web server (<http://biophysics.cs.vt.edu/>).

Modelado de la proteína CD36

Las coordenadas iniciales de la proteína CD36 fueron obtenidas del complejo cristalográfico acoplado con la proteína PfEMP1 del parásito *Plasmodium falciparum* (PDB código 5LGD, resolución 2.07 Å). Esta estructura ha sido cristalizada sin el segmento C-terminal, que podría ser un potencial sitio de

asociación con E6 debido a la cantidad de leucinas presentes en esta región. Haciendo uso del servidor web SWISS-MODEL, se llevó a cabo el modelado por homología del dominio C-terminal de la proteína CD36 (Uniprot P16671) y posteriormente fue unido al resto de la proteína para obtener el modelo completo.

Docking ciego entre E6 de VPH16 y CD36

Se llevó a cabo un *docking* ciego para predecir posibles complejos (modelos) de interacción entre la oncoproteína E6 del VPH16 y la proteína CD36 considerando el modelo cristalográfico de esta proteína y el modelo extendido al que se añadió el dominio C-terminal. Para ello, se utilizaron los programas de *docking* proteína-proteína CLUSPRO, HADDOCK y FRODOCK. Aquellos modelos con un *score* superior y con acomplejamiento similar al reportado para el pocket de E6 con motivos LxxLL fueron seleccionados para los estudios subsecuentes.

Dinámica Molecular (DM)

Cada uno de los modelos obtenidos en el *docking* fue sometido a un protocolo estándar de Dinámica Molecular que incluye etapas de minimización, calentamiento, equilibrio y producción. Los sistemas se solvataron con agua TIP3P en una caja cúbica de 10 Å de longitud y se agregaron contraiones de Na⁺ adecuados para lograr la neutralidad eléctrica.

Las simulaciones de DM se llevaron a cabo considerando un límite de 10 Å para términos no enlazados, el enfoque de Particle-Mesh Ewald para tratar la electrostática de largo alcance y el algoritmo SHAKE para restringir los enlaces que involucran hidrógeno, entre otros parámetros de configuración. Se utilizó el programa pmemd.CUDA bajo la implementación de GPU del software Amber16. El protocolo de simulación de DM consistió en: a) 1500 pasos de minimización de descenso más pronunciado seguidos de 3500 pasos de minimización de gradiente conjugado para la relajación de las moléculas de agua; b) 1500 pasos de minimización de descenso más pronunciado seguidos de 6500 pasos de minimización de gradiente conjugado para todo el sistema; c) 500 ps de

calentamiento progresivo NVT de 0 a 300 K; d) 500 ps de equilibrio NVT a 300 K con restricciones aplicadas a átomos pesados; e) 20 ns de equilibrio NPT a 300 K y, f) 300 ns de dinámica de producción NPT sin restricción a 300 K y 1 bar de donde se recopilaron los datos de producción.

Los modelos consistentes con una asociación estable entre la oncoproteína E6 y la proteína CD36 durante la trayectoria, fueron evaluados mediante el método MM/GBSA para estimar la energía libre de unión (ΔG_{bind}).

Método MM/GBSA

Este método permite estimar de forma indirecta la energía libre de unión de proteínas en fase acuosa a partir de una combinación de cálculos de mecánica molecular para calcular la energía libre de unión del complejo en fase gaseosa y modelos de solvatación para estimar las energías de solvatación de cada uno de los componentes del complejo, así como del complejo mismo. Este método ha demostrado ser computacionalmente eficiente y es ampliamente empleado en estudios de DM para estimar interacciones proteína-proteína (Hou *et al.*, 2011).

Durante todo el proceso, el modelo de interacción de E6 VPH16 con IRF-3 (PDB código 6SJA, resolución 1.50 Å) fue utilizado como control positivo para la comparación con los resultados obtenidos en los modelos de interacción entre la oncoproteína E6 del VPH16 y la proteína CD36.

Inmunohistoquímica

Cortes histológicos de 2 μm de espesor de tejido graso embebido en parafina fueron empleados en la validación del anticuerpo anti-CD36 (Sigma). La dilución validada fue 1:100 con la cual se procesaron los casos de orofaringe correspondientes.

Cortes histológicos fueron obtenidos a partir de muestras de biopsias de cáncer de orofaringe embebidas en parafina provenientes del archivo clínico del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) para determinar los niveles de CD36, se realizó

la eliminación de parafina mediante calor y xilol y se procedió con la hidratación del tejido mediante incubaciones en porcentajes decrecientes de etanol. Posteriormente, se realizó la recuperación antigénica mediante buffer de citratos en alta presión y posterior bloqueo de peroxidasa endógena y finalmente un bloqueo específico. Se empleó el anticuerpo primario (dilución 1:100) anti-CD36 (Sigma). Se incubó con anticuerpo secundario acoplado a la enzima HRP en donde la posterior reacción con el cromógeno DAB permitió la detección de la proteína. Finalmente, se llevó a cabo la contratinción del tejido empleando hematoxilina y las laminillas fueron montadas empleando solución Entellan para su posterior evaluación por un patólogo experto del departamento de patología del INCan.

El reactivo para bloqueo de peroxidasa endógena, el anticuerpo secundario y el cromógeno corresponden al kit para inmunohistoquímica Mouse/Rabbit PolyDetector DAB HRP Brown-BSB 0205 (Bio SB).

RESULTADOS

La línea celular de cáncer de cabeza y cuello SCC90 (positiva a VPH16) exhibe mayores niveles del receptor CD36

Con el fin de determinar si la positividad a VPH induce cambios en los niveles de CD36 en líneas celulares derivadas de cáncer de cabeza y cuello, se realizó un análisis mediante inmunofluorescencia empleando las líneas celulares SCC90 (positiva a VPH16) y FaDu (negativa a VHP). Los niveles de CD36 fueron analizados mediante inmunofluorescencia indirecta, en la figura 2, se observan imágenes representativas de tres ensayos independientes donde se aprecia una señal más intensa de CD36 en la línea celular SCC90 en comparación con la línea celular FaDu.

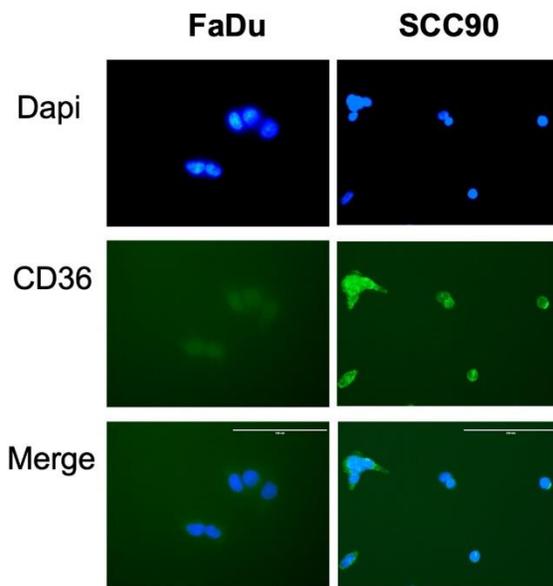


Figura 2. Expresión del receptor CD36 en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello. Sobreexpresión del receptor CD36 en la línea celular positiva a VPH16 (SCC90).

La línea celular SCC90 (positiva a VPH16) exhibe un mayor consumo de ácidos grasos

Para determinar la funcionalidad del receptor CD36 en estas células, se llevaron a cabo ensayos de consumo de ácidos grasos empleando un kit con un ácido graso marcado con una molécula fluorescente que al ser procesado por la célula emite energía que es posible detectar mediante un fluorómetro.

El tratamiento con este ácido graso marcado en las líneas celulares FaDu y SCC90 permitió realizar la medición de la intensidad de fluorescencia, donde los valores de unidades relativas de fluorescencia indican la cantidad relativa de ácido graso marcado ingresado a la célula. La intensidad de fluorescencia fue medida 30 minutos y una hora después de agregar el reactivo. La figura 3 muestra los resultados representativos de dos ensayos independientes. El análisis mediante la prueba ANOVA indicó una diferencia significativa en el consumo de ácidos grasos entre las dos líneas celulares al primer tiempo de medición (30 minutos), con un mayor consumo en la línea celular positiva a VPH (SCC90).

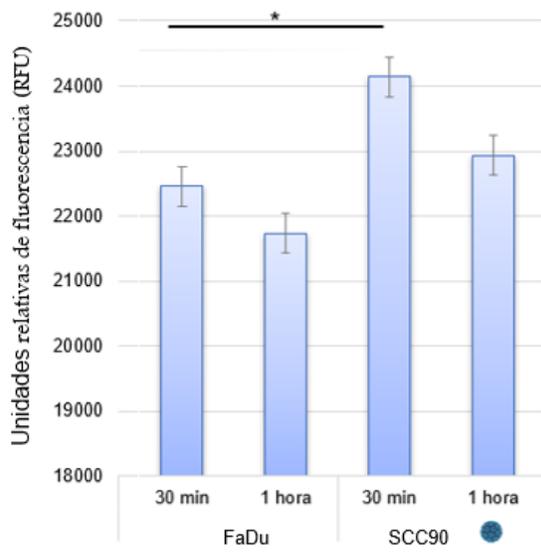


Figura 3. Ingreso de ácidos grasos en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello. El consumo de ácidos grasos en la línea celular positiva a VPH16 (SCC90) es mayor, con una diferencia significativa ($*p < 0.05$) entre ambas líneas al primer tiempo de medición (30 minutos).

La oncoproteína E6 del VPH16 induce un incremento en los niveles de la proteína CD36

El análisis de la secuencia aminoacídica de CD36 indicó la presencia de un motivo LxxLL en el receptor. Diversos estudios han demostrado un efecto en proteínas celulares con motivos LxxLL resultado de la interacción con la oncoproteína E6 (Tungteakkhun, S. y Duerksen-Hughes, 2008; Yeo-Teh *et al.*, 2018). Además, es importante resaltar que entre los tipos de VPH de alto riesgo involucrados en la carcinogénesis de cabeza y cuello, el VPH tipo 16 es el más común (Taberna *et al.*, 2017).

Para conocer el efecto de la oncoproteína E6 del VPH16 sobre la proteína CD36, se realizó la transfección transitoria en células HaCat (queratinocitos inmortalizados negativos a VPH) con el plásmido peGFP-16E6 que posee el gen de E6 del VPH16. Debido a la carencia de anticuerpos confiables para detectar la proteína E6 (Ganti *et al.*, 2016, Manzo-Merino *et al.*, 2014, Manzo-Merino *et al.*, 2018), el tag de GFP fue utilizado para la detección. La figura 4 muestra el resultado representativo de dos ensayos diferentes. Se observa que los niveles de la proteína CD36 incrementan cuando la oncoproteína E6 del VPH16 se encuentra

presente comparando con el vector (peGFP) (Figura 4A). El análisis de la presencia de las proteínas GFP y GFP-16E6 (Figura 4B) confirma la correcta expresión de las mismas en el modelo celular.

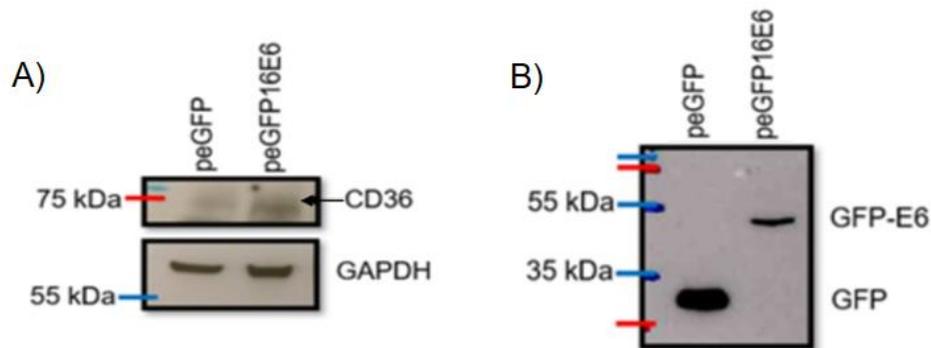


Figura 4. Efecto de la oncoproteína E6 del VPH16 sobre los niveles de la proteína CD36. A) Los niveles de la proteína CD36 incrementan en presencia de la oncoproteína E6 del VPH16. B) Confirmación de expresión de las proteínas GFP y GFP-E6.

La oncoproteína E6 del VPH16 interacciona fuertemente con dos sitios de la proteína CD36 en un estudio *in Silico*

Diversos procesos celulares son alterados por el VPH gracias a la interacción de la oncoproteína E6 con diversos blancos celulares (Grm y Banks, 2004; Tungteakkhun y Duerksen-Hughes, 2008; Manzo-Merino *et al.*, 2013), por ello, para determinar la capacidad de E6 para interactuar con CD36 se realizó un análisis de Simulación Molecular. Primeramente, se obtuvo como base la estructura cristalográfica de CD36 (código PDB 5DLG), la cual carece del dominio C-terminal (Figura 5A). Dado que el dominio C-terminal de la proteína CD36 presenta una región rica en leucinas parecida al motivo LxxLL, posible sitio de interacción con la oncoproteína E6, se decidió realizar el modelado de dicho dominio (en color rojo) para la obtención de la proteína completa. Al fusionar ambos modelos, la unión del dominio C-terminal al resto de la proteína no indujo

cambios conformacionales significativos en CD36 (Figura 5B) por lo cual fue empleada para los análisis subsecuentes.

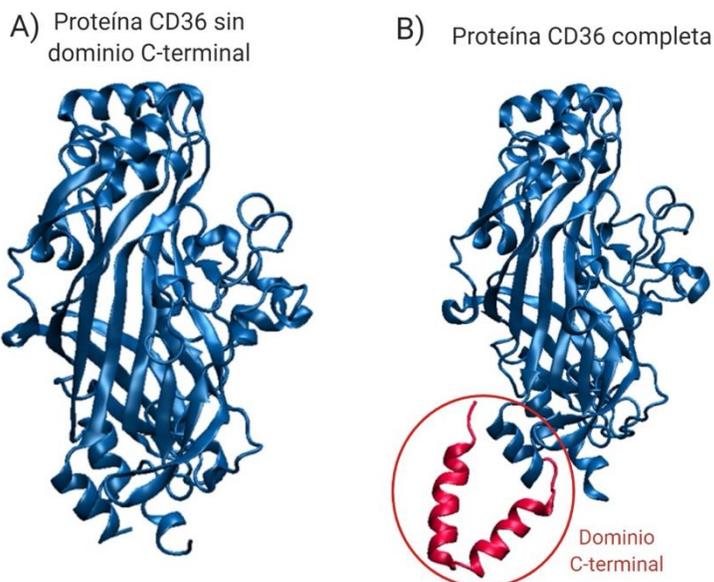


Figura 5. Modelado del dominio C-terminal de la proteína CD36. A) Modelo de la proteína CD36 sin su dominio C-terminal. B) Modelado por homología del dominio C-terminal de la proteína CD36. La unión del dominio C-terminal no indujo cambios conformacionales significativos en el resto de la proteína.

Dada la presencia de más de un posible sitio de interacción, se decidió realizar un *docking* ciego en la búsqueda de todos los posibles sitios de unión entre la oncoproteína E6 y la proteína CD36.

Una vez obtenidos los resultados de la DM realizada sobre los modelos obtenidos del *docking* ciego entre la oncoproteína E6 del VPH16 y la proteína CD36, tres de los modelos presentaron una alta estabilidad (Figura 6). El modelo 1 (Figura 6A) muestra una interacción de la oncoproteína E6 (en color cian) con la proteína CD36 (en color azul) en una región cercana al motivo LxxLL, la estimación de la energía libre de unión mediante el método MM/GBSA para este modelo, indicó un valor de $\Delta G_{\text{bind}} = -28.2 \pm 2.5$ kcal/mol. En el modelo 2 (Figura 6B) la interacción de la oncoproteína E6 es específicamente con el motivo LxxLL (en color anaranjado) de la proteína CD36, con un valor de $\Delta G_{\text{bind}} = -60.5 \pm 2.4$ kcal/mol. Finalmente, el modelo 3 (Figura 6C) muestra la interacción de una región diferente al pocket de la oncoproteína E6 con una región de la proteína CD36 opuesta al sitio donde se

encuentra el motivo LxxLL, con un valor de $\Delta G_{\text{bind}} = -25.8 \pm 4.2$ kcal/mol. Estos valores indican que el modelo 2 presenta la interacción de mayor fuerza entre la oncoproteína E6 del VPH16 y la proteína CD36.

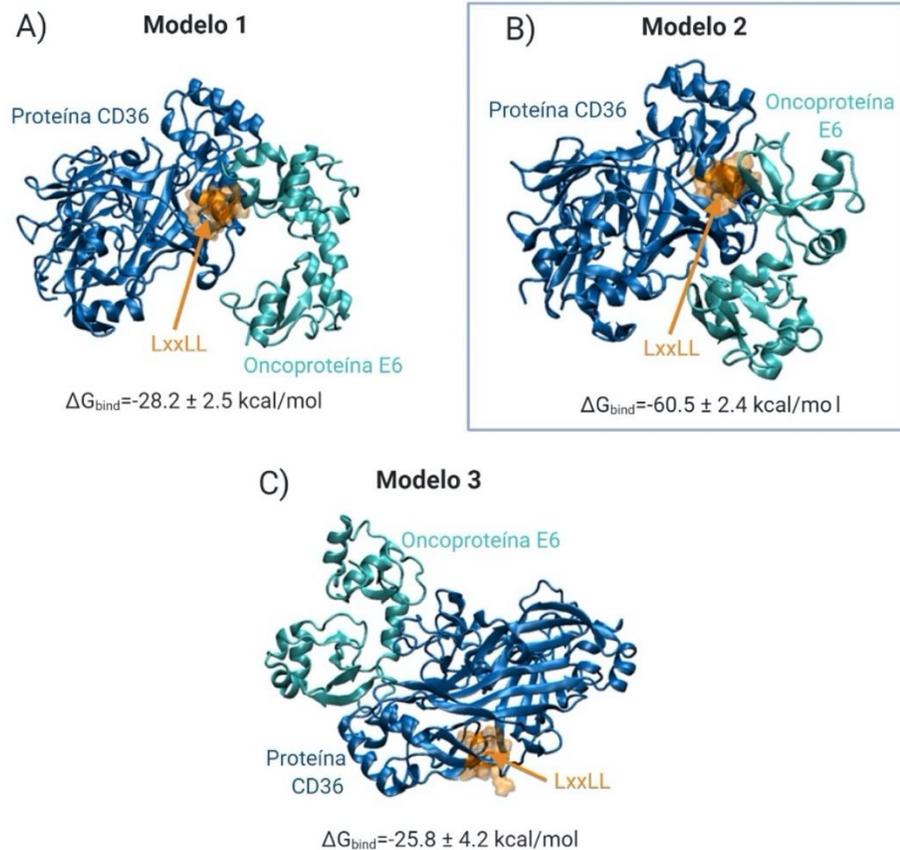


Figura 6. Modelos de interacción estable entre la oncoproteína E6 del VPH16 y la proteína CD36 obtenidos del *docking* ciego. Tres de los modelos analizados mediante DM presentaron una alta estabilidad. A) Modelo 1. Interacción de la oncoproteína E6 con la proteína CD36 en una región cercana al motivo LxxLL. B) Modelo 2. Interacción de la oncoproteína E6 específicamente con el motivo LxxLL de la proteína CD36. Modelo con mayor fuerza de interacción. C) Modelo 3. Interacción de una región diferente al pocket de la oncoproteína E6 con una región de la proteína CD36 opuesta al sitio donde se encuentra el motivo LxxLL.

Con el fin de establecer los residuos implicados en la interacción observada del modelo 2 que pudieran explicar la fuerte interacción entre la oncoproteína E6 del VPH16 y la proteína CD36, se realizó un modelo más detallado del sitio de

interacción (Figura 7), con el cual se determinó que el pocket de la oncoproteína E6 al presentar residuos catiónicos, específicamente argininas (en color morado), establece interacciones muy estables con residuos aniónicos (en color amarillo) cercanos al motivo LxxLL de la proteína CD36. Existe, además, un serie de interacciones proteína-proteína, también de tipo electrostático, que involucran enlaces de hidrógeno, las cuales estabilizan el complejo. El estudio de todas estas interacciones resulta de gran interés ya que pueden ser obstruidas por diversos medios con fuerzas iónicas muy fuertes empleados en ensayos *in Vitro*.

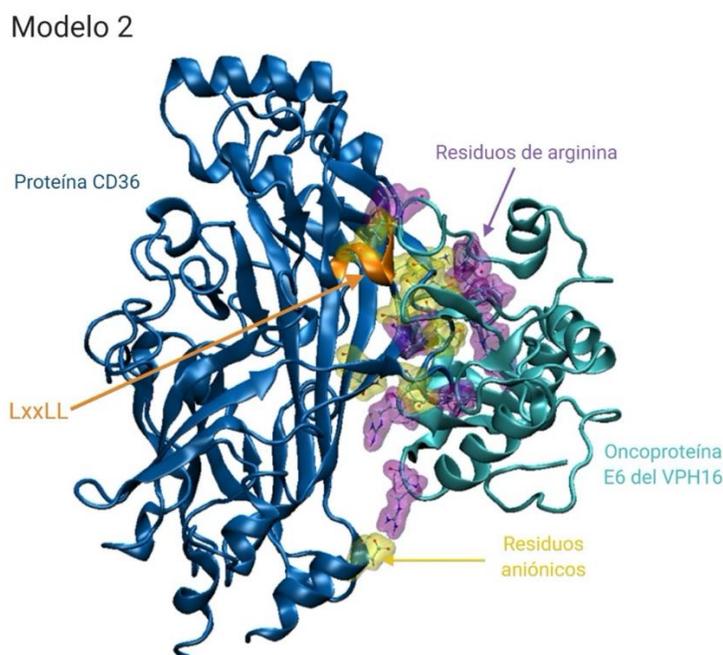


Figura 7. Modelo detallado del sitio de interacción entre la oncoproteína E6 del VPH16 y la proteína CD36 en el Modelo 2. El pocket de la oncoproteína E6 presenta residuos catiónicos, específicamente argininas (en color morado), que establecen interacciones muy estables con residuos aniónicos (en color amarillo) cercanos al motivo LxxLL de la proteína CD36.

Finalmente, se realizó un *docking* dirigido hacia el motivo C-terminal de la proteína CD36 y la oncoproteína E6 del VPH16. Posterior a la DM, cinco modelos fueron estables (Figura 8), siendo el Modelo 5 (Figura 8E) el que presentó mayor fuerza de interacción con un valor de $\Delta G_{\text{bind}} = -41.7 \pm 3.9$ kcal/mol; sin embargo, este valor

fue mayor al obtenido para la interacción estimada de la oncoproteína E6 y el motivo LxxLL de la proteína CD36 ($\Delta G_{\text{bind}} = -60.5 \pm 2.4$ kcal/mol).

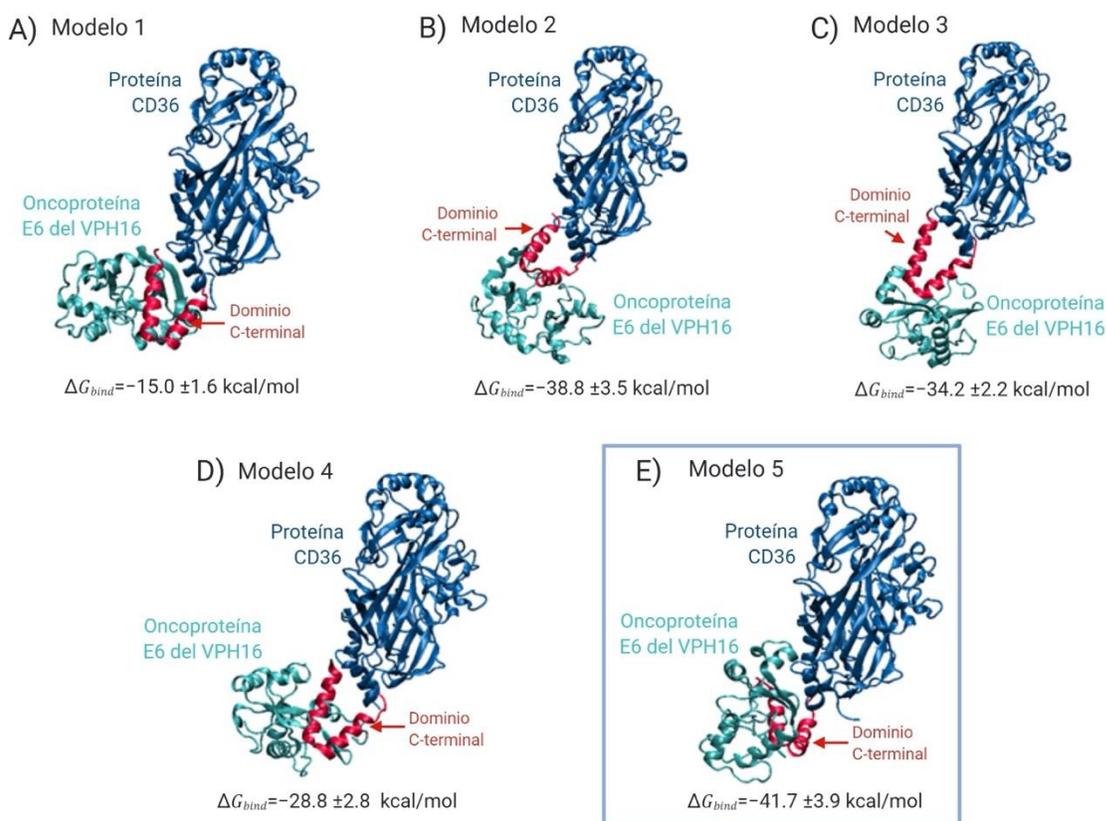


Figura 8. Modelos de interacción estable entre la oncoproteína E6 del VPH16 y el dominio C-terminal de la proteína CD36. Cinco de los modelos analizados mediante DM presentaron una alta estabilidad siendo el Modelo 5 el de mayor fuerza de interacción.

En conjunto, los resultados obtenidos a partir del *docking* y la Dinámica Molecular sugieren fuertemente una interacción entre la proteína E6 del VPH16 con CD36.

La expresión de CD36 no está asociada a la presencia de VPH en casos de cáncer de cabeza y cuello

Se realizó la estandarización de las condiciones de inmunohistoquímica para CD36 en tejido rico en adipocitos (células positivas a CD36) para la determinación

de la dilución óptima para el procesamiento de casos. Se emplearon las diluciones 1:50 y 1:100 (Figura 9) del anticuerpo primario anti-CD36 (Sigma), donde la dilución 1:100 fue aprobada por los patólogos para el procesamiento de los casos de cáncer de cabeza y cuello.

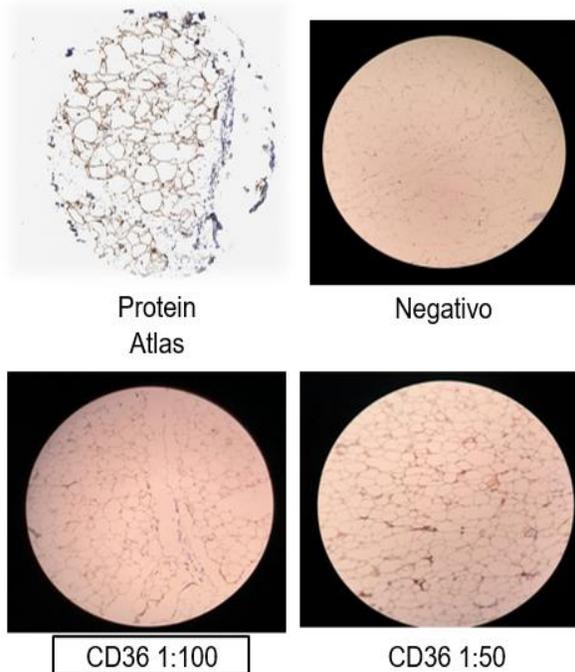


Figura 9. Estandarización de inmunohistoquímica para CD36 en adipocitos. La dilución 1:100 mostró ser óptima para la evaluación de CD36 y se empleó en el posterior procesamiento de casos. Se utilizó un corte de tejido de cáncer de mama que presentaba presencia de tejido graso para evaluar la presencia del receptor CD36.

Con el fin de determinar una asociación entre los niveles de CD36 y la presencia de VPH en cáncer de cabeza y cuello, cortes histológicos de cáncer de orofaringe obtenidos a partir de muestras de biopsias embebidas en parafina provenientes del archivo clínico del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) fueron analizadas mediante inmunohistoquímica. Un total de 22 casos fueron procesados y analizados por un patólogo experto. Adicionalmente, se contaba con datos sobre la detección del VPH y la positividad a p16 en estos casos, donde 5 de los casos analizados (22.7%) fueron positivos a VPH (VPH+) y 10 de los casos (45.45%) fueron positivos a p16 (p16+).

Al analizar la expresión de CD36, se encontró que este receptor estuvo presente en la zona tumoral tanto en los casos positivos como negativos al virus, así como

en los casos con expresión positiva de p16, siendo un total de 12 casos (54.5%) positivos a CD36 (CD36+), de los cuales 8 (66.6%) presentaron al receptor en la membrana en una intensidad de moderada a alta. La figura 10 muestra imágenes representativas de un caso CD36+ en la zona tumoral, con sus respectivos controles positivo y negativo. Sólo 2 de los casos analizados (9%) presentaron positividad tanto a VPH como a CD36 en la zona tumoral (VPH+/CD36+). La tabla 2 resume los resultados obtenidos.

Tabla 2. CD36 en casos de cáncer de cabeza y cuello (n=22).

Variable		n (%)
Presencia viral	VPH+	5 (22.7)
	VPH-	17 (77.3)
Marcador subrogado a VPH	p16+	10 (45.45)
	p16-	12 (54.54)
Positividad a CD36	CD36+ en zona del tumor	12 (54.5)
	CD36 en estroma	22 (100)
Intensidad de CD36	débil	4 (33.33)
	moderada o alta	8 (66.6)
Combinación de variables	VPH+/CD36+	2 (9%)
	p16+/CD36+	3 (13.63%)

El análisis estadístico mediante la prueba de Chi cuadrada (χ^2) o prueba exacta de Fisher demostró que no existe asociación estadísticamente significativa entre la expresión de CD36 y la presencia de VPH ($p=0.62$) o entre CD36 y la expresión de p16 ($p=0.083$). Los resultados obtenidos mostraron diferentes intensidades de expresión de CD36 en la zona del tumor, así como diferentes porcentajes en membrana, los cuales tampoco mostraron alguna asociación con la positividad a VPH después del análisis estadístico. De manera interesante, el estroma en todos los casos analizados fue positivo a la expresión de CD36 (Tabla 2), indicando otras posibles funciones de CD36 en este tipo de cáncer.



A) Control positivo

B) Control negativo

C) Cáncer de orofaringe

Figura 10. Imagen representativa de la expresión de CD36 en casos de cáncer de orofaringe. La expresión de CD36 fue analizada mediante inmunohistoquímica. A) Control positivo, expresión de CD36 en colon. B) Control negativo, colon, carente de anticuerpo primario. C) Caso de cáncer de orofaringe. Se observa alta intensidad de CD36 en la zona tumoral.

DISCUSIÓN

El receptor CD36 es considerado el principal transportador de ácidos grasos al interior de la célula siendo una proteína importante en el metabolismo de lípidos (Glatz y Luiken, 2018). Este receptor ha mostrado jugar un papel importante en diversas patologías incluyendo el cáncer, donde promueve procesos asociados a TEM, invasión y metástasis (Nath *et al.*, 2015; Pascual *et al.*, 2017; Ladanyi *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2019; Deng *et al.*, 2019).

Un estudio realizado en líneas celulares de cáncer de cérvix ha mostrado una mayor expresión y localización principalmente en membrana del receptor CD36 en la línea celular positiva al VPH16 (SiHa), comparando con una línea celular negativa al virus (C33A). Una mayor expresión de CD36 se asoció con la promoción de procesos de migración, invasión, proliferación y TEM (Deng *et al.*, 2019). Sin embargo, la existencia de una regulación del VPH16 sobre el receptor

CD36, tanto en este tipo de cáncer como en otros tipos de cáncer asociados a la infección como lo es el cáncer de cabeza y cuello, aún no ha sido estudiada.

Dado que se conoce ya la asociación directa de la infección por VPH con el desarrollo de cáncer de cabeza y cuello (de Sanjosé *et al.*, 2019), un tipo de cáncer donde la implicación de los lípidos en el desarrollo y progresión de la enfermedad no es aún clara (Chen *et al.*, 2019), resulta de gran interés determinar la existencia de alguna asociación entre la presencia de VPH, específicamente de sus oncoproteínas, y el metabolismo de lípidos, siendo uno de los receptores de ácidos grasos, CD36, uno de los ya descritos (Pascual *et al.*, 2017). La alta expresión de CD36 en cáncer oral negativo a VPH mostró inducir la expresión de enzimas importantes en la β -oxidación, donde la expresión de ACSL1 se asoció con el potencial metastásico en cáncer de cabeza y cuello (Pascual *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia en este trabajo, mostraron una mayor señal de CD36 en la línea celular de cáncer de cabeza y cuello positiva a VPH: SCC90, comparando con la línea celular negativa: FaDu. Estos resultados en conjunto con los obtenidos en los ensayos de ingreso de ácidos grasos y el trabajo de Deng y colaboradores (2019), sugieren una posible regulación del receptor CD36 por parte del VPH.

La inducción de la expresión de CD36 en la membrana celular ha mostrado coincidir con un incremento en el ingreso de ácidos grasos a la célula y de forma contraria, dicho ingreso es suprimido tras la inhibición del receptor (Ladanyi *et al.*, 2018). En este estudio, una mayor señal del receptor en la línea celular SCC90, positiva al VPH16, coincidió con un mayor consumo de ácidos grasos. La determinación de la localización específica de CD36 en la línea celular SCC90 resulta aún necesaria.

De forma interesante se ha determinado que casos de HNSCC positivos a VPH han mostrado un mayor porcentaje de metástasis en comparación con aquellos casos negativos al virus (Sacks *et al.*, 2020), lo cual podría estar explicado

parcialmente, por los efectos de las oncoproteínas virales, donde el receptor CD36 podría resultar importante. Por esta razón se hacen necesarios mayores investigaciones que permitan descifrar la dependencia de procesos metastásicos inducidos por el VPH en relación a la regulación sobre CD36.

La regulación de receptores a nivel membranal por las proteínas del VPH ha sido descrita. Se sabe que la proteína E5 es capaz de intervenir en la acidificación endosomal induciendo el reciclaje de receptores hacia la membrana plasmática, entre ellos EGFR, de esta manera mantiene activa la señal de proliferación (DiMaio et al., 2013). Por otra parte, Ganti y colaboradores (2016) mostraron que la oncoproteína E6 de diferentes tipos virales de alto riesgo, entre ellos el VPH16 y VPH18, mediante su interacción con la proteína SNX27 induce un incremento en el reciclaje del transportador de glucosa GLUT1 favoreciendo un incremento en la captación y disponibilidad de este nutriente en la célula cancerosa, necesario para el mantenimiento del fenotipo maligno (Ganti *et al.*, 2016). En este trabajo, se encontró que la presencia de E6 del VPH16 aumenta los niveles proteicos de CD36, poniendo de manifiesto que la oncoproteína puede regular no sólo receptores implicados en el metabolismo de la glucosa, sino también del metabolismo de lípidos.

Cabe señalar que los efectos del VPH sobre diversos blancos celulares involucran su capacidad de interacción con proteínas celulares, evento que ha sido caracterizado a nivel cristalográfico. Entre los estudios que describen la estructura cristalográfica del complejo E6 con una proteína con motivo LxxLL, se encuentra el que describe la interacción de la oncoproteína E6 del VPH16 con la proteína celular E6AP (Zanier *et al.*, 2013). Dicho estudio describe la interacción del motivo LxxLL de la proteína E6AP con un pocket hidrofóbico formado por los dos dominios de zinc y una hélice de la oncoproteína E6, en un modo de asociación que ha sido descrito para diferentes proteínas celulares tanto *in Vitro*, *in Vivo* como *in Silico*. La interacción E6-LxxLL es una de las que poseen mayor impacto en

términos biológicos al ser necesaria para la degradación de diversos supresores tumorales (Vande y Klingelhutz, 2013).

Además, las Simulaciones Moleculares proporcionan una técnica poderosa que permiten predecir y comprender además de la estructura, la función, la dinámica y las interacciones de las biomoléculas. Estudios de Simulación Molecular han sido realizados para determinar interacciones entre la oncoproteína E6 del VPH y proteínas celulares con motivos LxxLL, con la finalidad de encontrar posibles inhibidores de dicha interacción en el desarrollo de drogas anti-VPH (Ricci-López *et al.*, 2019, Kolluru, *et al.*, 2019). El uso del *docking* ciego en la búsqueda de todos los posibles sitios de unión de una molécula a la oncoproteína E6 ha sido de gran ayuda en estudios que buscan posibles drogas que puedan unirse y bloquear la unión de esta oncoproteína con sus blancos celulares (Kolluru, *et al.*, 2019). Además, el método MM/GBSA que permite estimar de forma indirecta la energía libre de unión de proteínas en fase acuosa a partir de una combinación de cálculos de mecánica molecular para calcular la energía libre de unión del complejo en fase gaseosa y modelos de solvatación para estimar las energías de solvatación de cada uno de los componentes del complejo, así como del complejo mismo, ha mostrado ser computacionalmente eficiente en el cálculo de la energía libre de unión para diversos sistemas (Hou *et al.*, 2011).

Estudios previos han indicado la existencia de una fuerte interacción entre la oncoproteína E6 del VPH16 y luteolina, una molécula inhibidora de la unión E6-E6AP por unión al pocket de E6, con un valor de energía libre de unión calculado mediante el método MM/GBSA de aproximadamente $\Delta H_{\text{bind}} = -35$ kcal/mol (Ricci-López *et al.*, 2019). Para el caso del complejo CD36/E6 el valor de la energía libre de unión ($\Delta G_{\text{bind}} = -60.5 \pm 2.4$ kcal/mol y $\Delta G_{\text{bind}} = -41.7 \pm 3.9$ kcal/mol) superó el de luteolina, indicando una muy fuerte interacción entre la oncoproteína E6 del VPH16, el tipo viral de mayor prevalencia (Kobayashi *et al.*, 2018; de Sanjosé *et al.*, 2019) y el receptor. Posicionando a CD36 como un posible nuevo blanco de la oncoproteína E6.

En la simulación molecular entre CD36 y E6 llevada a cabo en este trabajo, se encontró que el pocket de la oncoproteína E6 mostró varios residuos de arginina que estabilizan la interacción con la proteína CD36. Estudios previos han mencionado ya que este grupo de residuos de arginina forman una tapa sobre el surco de la hélice del pocket en la oncoproteína E6, estos residuos ofrecen funciones compensatorias en la unión y el reconocimiento de moléculas incluso pequeñas (Rietz *et al.*, 2016).

A pesar de la existencia de diferencias en el ingreso de ácidos grasos en líneas celulares positivas y negativas a VPH, además de los ensayos de inmunofluorescencia, el análisis de la expresión de CD36 por inmunohistoquímica de casos de cáncer de cabeza y cuello, indicó que no existe alguna asociación entre la expresión de este receptor y la presencia del virus. Este fenómeno podría ser explicado debido a que los casos analizados fueron en su mayoría estadios avanzados o bien, que el efecto observado de E6 sobre el receptor CD36 sea importante en las primeras etapas de la enfermedad encontrando que la infección persistente por VPH es requisito para el desarrollo de cáncer. Sin embargo, hacen falta mayores estudios que permitan estimar el verdadero significado de las alteraciones en CD36 inducidas por el VPH en este tipo de cáncer. A este respecto, ha sido reportada una diferencia en los niveles de expresión de la proteína CD36 dependiendo del estado de diferenciación del tumor en cáncer de cérvix (Deng *et al.*, 2019) no así para cáncer de cabeza y cuello, abriendo la posibilidad de abordar este tipo de cáncer y determinar el potencial papel de VPH sobre la alteración de CD36.

Finalmente, resulta de gran interés el estudio de la interacción de la oncoproteína E6 de los VPH de alto riesgo con el receptor CD36, dados los resultados del estudio *in Silico* obtenidos en este trabajo, donde se obtuvieron dos interacciones fuertes predichas para la oncoproteína E6 del VPH16, el tipo viral de mayor prevalencia en cáncer de cabeza y cuello. Adicionalmente, estudiar la potencial

regulación del receptor por parte de la oncoproteína E6 a lo largo de la carcinogénesis y la progresión del cáncer permitirá describir los eventos implicados en la historia natural de la enfermedad, así como proponer futuros blancos terapéuticos.

CONCLUSIONES

1. La línea celular SCC90 (positiva a VPH16) presenta mayores niveles del receptor CD36 y un mayor consumo de ácidos grasos que la línea celular FaDu (negativa a VPH16).
2. La oncoproteína E6 del VPH16 induce un incremento en los niveles del receptor CD36.
3. La estructura proteica de CD36 posee dos sitios de fuerte interacción con la oncoproteína E6 del VPH16.
4. No existe una asociación entre la presencia del VPH y la expresión de CD36 en casos de cáncer de cabeza y cuello.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bar-Shavit, R., Maoz, M., Kancharla, A., Nag, J., Agranovich, D., Grisaru-Granovsky, S. y Uziely, B. 2016. G Protein-Coupled Receptors in Cancer. *International journal of molecular sciences*. 17(8): 1320.
2. Bergvall, M., Melendy, T., y Archambault, J. 2013. The E1 proteins. *Virology*. 445 (0): 35–56.
3. Bzhalava, D., Eklunt C. y Dillner, J. 2015. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*. 476: 341-344.
4. Chen, Y., Lee, Y., Li, S., Li, Q., Chen, C, Hsu, W., Lou, P., Zhu, C., Pan, J., Shen, H., Ma, H., Cai, L., He, B., Wang, Y., Zhou, X., Ji, Q., Zhou, B., Wu,

- W., Ma, J., Kawakita, D., Boffetta, P., Zhang, Z., Dai, M. y Hashibe, M. 2019. Body mass index and the risk of head and neck cancer in the Chinese population. *Cancer Epidemiology*. 60: 208–215.
5. Deng, M., Cai, X., Long, L., Xie, L., Ma, H., Zhou, Y., Liu, S., y Zeng, C. 2019. CD36 promotes the epithelial-mesenchymal transition and metastasis in cervical cancer by interacting with TGF- β . *Journal of translational medicine*. 17(1): 352.
 6. de Sanjosé, S., Brotons, M. y Pavón, M. 2018. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 47: 2-13.
 7. de Sanjosé, S., Serrano, B., Tous, S., Alejo, M., Lloveras, B., Quirós, B., Clavero, O., Vidal, A., Ferrándiz-Pulido, C., Pavón, M., Holzinger, D., Halec, G., Tommasino, M., Quint, W., Pawlita, M., Muñoz, N., Bosch, F. y Alemany, L. 2019. Burden of Human Papillomavirus (HPV)-Related Cancers Attributable to HPVs 6/11/16/18/31/33/45/52 and 58. *JNCI Cancer Spectrum*. 2(4): pky045.
 8. DiMaio, D. y Petti, L. 2013. The E5 proteins. *Virology*. 445 (1-2): 99–114.
 9. Doorbar, J. 2013. The E4 protein; structure, function and patterns of expresión. *Virology*. 445 (issues 1-2): 80-98.
 10. Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C. y Murakami, I. 2015. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*. 25: 2-23.
 11. Ganti, K., Broniarczyk, J., Manoubi, W., Massimi, P., Mittal, S., Pim, D., Szalmas, A., Thatte, J., Thomas, M., Tomaić, V. y Banks, L. 2015. The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy. *Viruses*, 7(7): 3530–3551.
 12. Ganti, K., Massimi, P., Manzo-Merino, J., Tomaić, V., Pim, D., Playford, M. P., Lizano, M., Roberts, S., Kranjec, C., Doorbar, J. y Banks, L. 2016. Interaction of the Human Papillomavirus E6 Oncoprotein with Sorting Nexin 27 Modulates Endocytic Cargo Transport Pathways. *PLoS Pathogens*. 12 (9): e1005854.

13. Glatz, J. y Luiken, J. 2018. Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. *Journal of lipid research*. 59(7): 1084–1093.
14. Grm, H. y Banks, L. 2004. Degradation of hDlg and MAGIs by human papillomavirus E6 is E6-AP-independent. *J.Gen Virol*. 85: 2815–2819.
15. Hou, T., Wang, J., Li, Y. y Wang, W. 2011. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. *Journal of chemical information and modeling*. 51(1): 69–82.
16. Kobayashi, K., Hisamatsu, K., Suzui, N., Hara, A., Tomita, H. y Miyazaki, T. 2018. A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *Journal of clinical medicine*. 7(9): 241.
17. Kolluru, S., Momoh, R., Lin, L., Mallareddy, J. y Krstenansky. 2019. Identification of potential binding pocket on viral oncoprotein HPV16 E6: a promising anti-cancer target for small molecule drug discovery. *BMC Molecular and Cell Biology*. 20:30.
18. Ladanyi, A., Mukherjee, A., Johnson, A., Mitra, A., Sundaresan, S., Nieman, G., Pascual, G., Montag, A., Yamada, S., Abumrad, N. y Lengyel, E. 2018. Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis. *Oncogene*. 1-17.
19. Manzo-Merino, J., Contreras-Paredes, A., Vázquez-Ulloa, E., Rocha-Zavaleta, L., Fuentes-Gonzalez, A. M. y Lizano, M. 2014. The Role of Signaling Pathways in Cervical Cancer and Molecular Therapeutic Targets. *Archives of Medical Research*. 45(7), 525–539.
20. Manzo-Merino, J., Lagunas-Martínez, A., Contreras-Ochoa, C. O., Lizano, M., Castro-Muñoz, L. J., Calderón-Corona, C., Torres-Poveda, K., Román-Gonzalez, A., Hernández-Pando, R., Bahena-Román, M. y Madrid-Marina, V. 2018. The Human Papillomavirus (HPV) E6 Oncoprotein Regulates CD40 Expression via the AT-Hook Transcription Factor AKNA. *Cancers*. 10(12), 521.

21. Manzo-Merino, J., Thomas, M., Fuentes-Gonzalez, A., Lizano, M., Banks, L. 2013. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 17 (11): 1357-1368.
22. McBride A. 2013. The Papillomavirus E2 proteins. *Virology*, 445(1-2), 57–79.
23. McBride, A. y Warburton, A. 2017. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS pathogens*. 13(4): e1006211.
24. Morales-Sánchez, A. y Fuentes-Pananá, E. 2014. Human Viruses and Cancer. *Viruses*. 6: 4047- 4079.
25. Nath, A., Li, I., Roberts, L. R. y Chan, C. 2015. Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Scientific reports*. 5: 14752.
26. Quint, K., Genders, R., Koning, M., Borgogna, C., Gariglio, M., Bavinck, J., Doorbar, J. y Feltkamp, M. 2015. Human Beta-papillomavirus infection and keratinocyte carcinomas. *Journal of Pathology*. 235: 342-354.
27. Pan, J., Fan, Z., Wang, Z., Dai, Q., Xiang, Z., Yuan, F., Yan, M., Zhu, Z., Liu, B. y Li, C. 2019. CD36 mediates palmitate acid-induced metastasis of gastric cancer via AKT/GSK3 β / β -catenin pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 38:52.
28. Pascual, G., Avgustinova, A., Mejetta, M., Martín, M., Castellanos, A., Attolini, C., Berenguer, A., Prats, N., Toll, A., Hueto, J., Bescós, C., Di Croce, L. y Benitah, S. 2017. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*. 541: 41-45.
29. Pisani, P., Airoidi, M., Allais, A., Aluffi Valletti, P., Battista, M., Benazzo, M., Briatore, R., Cacciola, S., Cocuzza, S., Colombo, A., Conti, B., Costanzo, A., Della Vecchia, L., Denaro, N., Fantozzi, C., Galizia, D., Garzaro, M., Genta, I., Iasi, G. A., Krenkli, M., Landolfo, V., Lanza, G., Magnano, M., Mancuso, M., Malordi, R., Masini, L., Merlano, M., Piemonte, M., Pisani, S., Prina-Mello, A., Prioglio, L., Rugiu, M., Scasso, F., Serra, A., Valente, G., Zannetti, M. y Zigliani, A. 2020. Metastatic disease in head & neck oncology. *Acta otorhinolaryngologica Italica*. 40 (SUPPL. 1): S1–S86.

30. Ribeiro, A., Caodaglio, A. y Sichero, L. 2018. Regulation of HPV transcription. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 73 (suppl 1): e486s.
31. Ricci-López, J., Vidal-Limon, A., Zúñiga, M., Jiménez, V. A., Alderete, J., Brizuela, C. y Aguila, S. 2019. Molecular modeling simulation studies reveal new potential inhibitors against HPV E6 protein. *PloS one*. 14(3): e0213028.
32. Rietz, A., Petrov, D., Bartolowits, M., DeSmet, M., Davisson, V. J. y Androphy, E. 2016. Molecular Probing of the HPV-16 E6 Protein Alpha Helix Binding Groove with Small Molecule Inhibitors. *PloS one*. 11(2): e0149845.
33. Sigismund, S., Avanzato, D. y Lanzetti, L. 2018. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular oncology*. 12(1): 3–20.
34. Simard, E., Torre, L. y Jemal, A. 2014. International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomic site. *Oral oncology*. 50: 387-403.
35. Songock, W., Kim, S. y Bodily, J. 2017. The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription. *Virus research*. 231: 56–75.
36. Spence, T., Bruce, J., Yip, K. y Liu, F. 2016. HPV Associated Head and Neck Cancer. *Cancers*. 8(8): 75.
37. Taberna, M., Mena, M., Pavón, M., Alemany, L. Gillison, M. y Mesía, R. 2017. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Annals of oncology*. 28: 2386-2396.
38. Tungteakkhun, S. y Duerksen-Hughes, P. 2008. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Archives of virology*, 153(3): 397–408.
39. Vande, S. y Klingelutz, A. 2013. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*. 445: 115-137.
40. Wang, J. y Roden, R. 2013. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445(1-2): 175–186.
41. Yang, P., Su, C., Luo, X., Zeng, H., Zhao, L., Wei, L., Zhang, X., Varghese, Z., Moorhead, J., Chen, Y. y Ruan, X. 2018. Dietary oleic acid-induced CD36 promotes cervical cancer cell growth and metastasis via up-regulation Src/ERK pathway. *Cancer Letters*. 438: 76-85.

42. Yeo-Teh, N., Ito, Y. y Jha, S. 2018. High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 19 (6): 1706.
43. Zanier, K., Chanbonnier, S., Ould Sidi, M., McEwen, A., Ferrario, M., Poussini, P., Cura, V., Brimer, N., Ould Babah, K., Ansari, T., Muller, I., Stote, R., Cavarelli, J., Vande, S. y Travé G. 2013. Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins, *Science*. 339 (6120): 694-698.

ANEXOS

Anexo 1: Artículos

1.1 Publicados

- Ayala-Díaz, S., Jiménez-Lima, R., Ramírez-Alcántara, K. M., Lizano, M., Castro-Muñoz, J., Reyes-Hernández, D. O., Arroyo-Ledezma, J. y Manzo-Merino, J. 2019. Presence of Papillomavirus DNA sequences in the canine transmissible venereal tumor (CTVT). PeerJ. 7:e7962.

1.2 Enviados

- Evasion of the immune response induced by the Human Papillomavirus (HPV) E5, E6 and E7 oncoproteins.

Anexo 2: Soluciones

2.1 Geles de acrilamida al 12%

<i>Reactivo</i>	<i>Gel concentrador</i>	<i>Gel separador</i>
Acrilamida 30%/ N,N'-biscarilamida	400 µL	4 mL
Tris-HCl 1.5M pH 6.8	320 µL	- -
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	- -	2.8 mL
SDS 10% p/v	25 µL	100 µL
Persulfato de amonio 10%	25 µL	66 µL
N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)	2 µL	6 µL

2.2 Buffer de corrida 1x

Tris base 3.03 g

Glicina 14.42 g

SDS 1.0 g

H2O destilada aforar a 1L

2.3 Buffer de transferencia

Tris-base 3.03 g

Glicina 14.42 g

SDS 1.0 g

Metanol 25%

H₂O destilada aforar a 1L

2.4 TBS-T 1x

Tris base 2.42 g

NaCl 8.0 g

Tween-20 1.0 %