



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

**MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE LA SUBUNIDAD 26S DEL PROTEASOMA POR LAS  
ONCOPROTEINAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) Y SU ASOCIACIÓN CON  
LA RESPUESTA A TRATAMIENTO EN CÁNCER DE OROFARINGE**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**QFB. MORAN TORRES ADRIANA**

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

**COTUTORA DE TESIS: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MARZO, 2022**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE LA SUBUNIDAD 26S DEL PROTEASOMA POR LAS  
ONCOPROTEINAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) Y SU ASOCIACIÓN CON  
LA RESPUESTA A TRATAMIENTO EN CÁNCER DE OROFARINGE**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**QFB. MORAN TORRES ADRIANA**

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

**COTUTORA DE TESIS: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2022**

**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA**

**OFICIO CPCB/192/2022**

**ASUNTO: Oficio de Jurado**

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **6 de diciembre de 2021** 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 **MORAN TORRES ADRIANA** con número de cuenta **519020665** con la tesis titulada **“MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE LA SUBUNIDAD 26S DEL PROTEASOMA POR LAS ONCOPROTEÍNAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA A TRATAMIENTO EN CÁNCER DE OROFARINGE”**, realizada bajo la dirección del **DR. JOAQUÍN MANZO MERINO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Vocal: DRA. SARA HUERTA YEPEZ  
Vocal: DR. CARLO CESÁR CORTÉS GONZÁLEZ  
Vocal: DRA. MARTHA ROBLES FLORES  
Secretario: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 24 de febrero de 2022

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM**, por el apoyo académico que me permitió obtener el conocimiento y desarrollarme en el campo de la investigación científica para llegar a convertirme en Maestra en Ciencias.

Al **CONACYT** por la beca otorgada con número de becario: 959466, que fue de gran apoyo para sostener mis estudios de Maestría.

Al **Instituto Nacional de Cancerología (INCAN)** 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.

A la **Dra. Leticia Rocha Zavaleta** y al **Dr. Alejandro García Carrancá** por formar parte de mi comité tutorial así como por su apoyo y aportaciones a este proyecto de tesis.

## **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL**

**A Dios**, por permitirme vivir, por darme salud, por enseñarme lo hermosa que es la vida y dejarme disfrutar de ella cada día.

**A mi familia, a mi padre, mi madre y hermana.** Por siempre brindarme su apoyo incondicional y creer en mí. Por darme la libertad de tomar mis decisiones, aprender y madurar, por su inspiración para ser mejor cada día y dar siempre mi mejor esfuerzo en cada situación en la vida. Por permitirme desarrollarme académica y profesionalmente, aunque eso significara alejarme de ellos. Por ser mi principal motor para cumplir mis sueños.

**A mis amigos**, se dice que los amigos se cuentan con los dedos de una mano y que se conocen en situaciones de dificultad, sin embargo, a mi faltan dedos para contar a los amigos que la vida me ha dado la dicha de conocer. Les quiero dar las gracias por siempre estar para mí en todas las situaciones, compartiendo conmigo momentos de felicidad y de tristeza. Por brindarme siempre su apoyo y guía cuando la he necesitado. Por convertirse en parte de mi familia.

**Al Dr. Joaquín Manzo Merino**, por ampliar mis expectativas de la vida y siempre motivarme para ser mejor en todos los aspectos, tanto personales como académicos. Por ser un ejemplo a seguir, por siempre brindarme su ayuda y consejos en los momentos difíciles, por ayudarme a crecer académica y personalmente, en resumen, gracias por convertirte en mi amigo.

**A mis compañeros de laboratorio del INCAN**, a Diego, Katy, Silvia, Diana, Sergio, Mashe, Omar, Leslie, Josué. Por siempre brindarme su apoyo y conocimiento para mi desarrollo académico y personal, por todos los momentos agradables que pasamos juntos, por sus comentarios y aportaciones para mejorar mi proyecto de tesis, por convertirse en mis amigos.

**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 expresión de PSMD9.

**A Iris Coronado Martinez** por proporcionarme la proteína de las células C33A que recibieron un tratamiento con radiación para medir los niveles de PSMD9, contribuyendo en este proyecto.

## ÍNDICE

### ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

### ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>1.0 RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>2.0 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
2.1 CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO .....	5
2.2 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO: DIVERSIDAD, CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y TROPISMO CELULAR DEL VPH .....	6
2.3 TRANSMISIÓN .....	7
2.4 ESTRUCTURA DEL VPH .....	8
2.5 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL.....	9
2.5.1 <i>Ciclo de replicación del VPH</i> .....	10
2.5.2 <i>Potencial oncogénico del VPH</i> .....	11
2.6 MECANISMO ONCOGENICO DEL VPH .....	12
2.6.1 <i>E6 y su participación en el mecanismo oncogénico</i> .....	13
2.6.2 <i>E7 y su participación en el mecanismo oncogénico</i> .....	14
2.7 VPH EN HNSCC.....	16
2.8 CARCINOMA ESCAMOSO DE LA OROFARINGE (OPSCC) .....	18
2.9 EPIDEMIOLOGIA .....	19
2.10 PRONOSTICO .....	20
2.11 DIFERENCIAS ENTRE LOS OPSCC VPH+ Y VPH-.....	21
2.12 RESPUESTA A RADIOTERAPIA .....	23
2.13 SISTEMA-UBIQUITINA PROTEASOMA Y CÁNCER .....	24
2.13.1 <i>Ubiquitina</i> .....	24
2.13.2 <i>Protesoma 26S</i> .....	25
2.13.3 <i>Partícula central</i> .....	26
2.13.4 <i>Partícula regulatoria</i> .....	26
2.13.5 <i>Proteólisis</i> .....	27
2.14 PROTESOMA 26S COMO BIOMARCADOR DE RESPUESTA A RADIOTERAPIA .....	27
2.14.1 <i>Protesoma 26S y VPH</i> .....	28
2.14.2 <i>PSMD9</i> .....	28
<b>3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>29</b>
<b>4.0 JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>30</b>
<b>5.0 HIPÓTESIS</b> .....	<b>30</b>
<b>6.0 OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
6.1 OBJETIVO GENERAL .....	30
6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	30
<b>7.0 METODOLOGÍA</b> .....	<b>31</b>
7.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....	31
7.2 DIAGRAMA DE TRABAJO .....	32
7.3 METODOLOGIA .....	33
7.3.1 <i>Modelos celulares</i> .....	33
7.3.2 <i>Transfección</i> .....	33

7.3.3 Western Blot .....	35
7.3.4 Inmunofluorescencia .....	37
7.3.5 Pull Down .....	38
7.3.6 Inmunohistoquímica .....	39
7.3.7 Evaluación de los niveles de expresión de PSMD9 en biopsias de CaOF .....	41
7.3.8 Generación de base de datos .....	41
7.3.9 Extracción de DNA .....	41
7.3.10 Detección del VPH .....	42
7.3.11 Análisis estadístico .....	43
<b>8.0 RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
8.1 La presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 no modifican los niveles de expresión de PSMD9 ....	43
8.2 E6 del VPH16 interactúa con PSMD9 .....	45
8.3 Los niveles de PSMD9 se modifican en cáncer positivo de VPH .....	46
8.4 Los niveles de expresión y localización de PSMD9 se modifican en la línea celular HaCaT y C33A con expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH .....	47
8.5 Los niveles de PSMD9 aumentan después del tratamiento con radiación en presencia de VPH 16 .....	49
8.6 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE PSMD9 COMO BIOMARCADOR DE RESPUESTA A RADIOTERAPIA .....	50
8.6.1 Generación de base de datos .....	50
8.6.2 Determinación de la prevalencia y tipo de VPH en OPSCC .....	51
8.6.3 Estandarización de condiciones de IHQ para la detección de PSMD9.....	52
8.6.4 No se encontró asociación entre PSMD9 y la respuesta a tratamiento de los pacientes con CaOF .....	54
8.6.5 Los niveles de PSMD9 no se asocian con la CG en CaOF .....	55
<b>9.0 DISCUSIÓN .....</b>	<b>58</b>
<b>10.0 SUMARIO .....</b>	<b>62</b>
<b>11.0 CONCLUSIÓN .....</b>	<b>63</b>
<b>12.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>
<b>13.0 ANEXOS .....</b>	<b>68</b>
13.1 Carta de aceptación para presentación de este proyecto en modalidad poster en el XII Congreso Nacional de Virología .....	68
13.2 Reconocimiento de presentación de trabajo en el XII Congreso Nacional de Virología .....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

### Figuras

- Figura 1.** Estructura del Virus del Papiloma Humano.
- Figura 2.** Organización del genoma del VPH.
- Figura 3.** Ciclo de replicación del VPH.
- Figura 4.** Oncoproteínas E6 y E7 del VPH de alto riesgo y su papel en la activación del ciclo celular y la pérdida del supresor tumoral p53.
- Figura 5.** Oncoproteínas E6 y E7 del VPH-AR.
- Figura 6.** Número de casos anuales estimados de cáncer atribuibles al VPH por sexo, tipo de cáncer y tipo de VPH.
- Figura 7.** Sitios y subsitios anatómicos afectados por el Cáncer de Cabeza y Cuello (HNC, por sus siglas en inglés).
- Figura 8.** Tasas estimadas de incidencia estandarizadas en 2018 para HNC (en el mundo).
- Figura 9.** Sistema Ubiquitina Proteasoma.
- Figura 10.** Composición del proteasoma 26S.
- Figura 11.** Esquema de la transfección transitoria de la línea celular HaCaT.
- Figura 12.** Representación esquemática del manejo de la línea celular C33A con expresión estable del vector p3X y las oncoproteínas E6 y E7 del VPH.
- Figura 13.** Representación esquemática de la técnica de WB.
- Figura 14.** Representación esquemática de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta.
- Figura 15.** Representación esquemática de la técnica de pull-down.
- Figura 16.** Protocolo de Inmunohistoquímica.
- Figura 17.** Representación esquemática de la técnica de extracción de DNA.
- Figura 18.** Confirmación de la correcta transfección de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH en la línea celular HaCaT.
- Figura 19.** Los niveles de expresión de PSMD9 no se modifican en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH en la línea celular HaCaT.
- Figura 20.** Confirmación de la expresión de E6 y E7 del VPH en la línea celular C33A.
- Figura 21.** Los niveles de expresión de PSMD9 no se modifican en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH en la línea celular C33A.
- Figura 22.** PSMD9 interactúa con E6 del VPH16.
- Figura 23.** Los niveles de expresión de PSMD9 son mayores en las líneas celulares de cáncer de

cérvix positivas al VPH.

**Figura 24.** Los niveles de expresión de PSMD9 son mayores en las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello comparadas con la línea celular HaCaT.

**Figura 25.** Los niveles de expresión de PSMD9 aumentan en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH en el modelo celular HaCaT.

**Figura 26.** Los niveles de expresión de PSMD9 aumentan en la línea celular C33A con expresión estable de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH.

**Figura 27.** Los niveles de expresión de PSMD9 aumentan en presencia de las oncoproteína E6 del VPH después del tratamiento de radiación en el modelo celular C33A.

**Figura 28.** Prevalencia de VPH en casos de CaOF atendidos en INCAN en el periodo 2000 – 2015.

**Figura 29.** Expresión de PSMD9 mediante IHQ en cortes histológicos de piel.

**Figura 30.** Los niveles de expresión PSMD9 son mayores en las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello.

**Figura 31.** Curva de Sobrevida Global en relación con la expresión de PSMD9.

**Figura 32.** Curva de Sobrevida Global en relación con la presencia del VPH determinada mediante INNo-Lipa

**Figura 33.** Curva de Supervivencia Libre de Enfermedad en relación con la expresión de PSMD9.

**Figura 34.** Curva de Supervivencia Libre de Enfermedad en relación con la presencia del VPH determinada mediante INNo-Lipa.

## Tablas

**Tabla 1.** Diferencias principales entre los pacientes con HNSCC VPH (+) y VPH (-).

**Tabla 2.** Anticuerpos utilizados en los ensayos de Wester Blot.

**Tabla 3.** Datos demográficos y factores de riesgo de la población

**Tabla 4.** Localización celular e intensidad de expresión de la proteína PSMD9 en biopsias de pacientes con CaOF tratados en el INCAN del 2000 al 2015.

**Tabla 5.** Tabla de asociación entre la presencia de VPH y PSMD9 con la respuesta a tratamien

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>C33A</b>	Línea celular de carcinoma de cuello uterino
<b>CaOF</b>	Cáncer de orofaringe
<b>CDC</b>	Centro de control de enfermedades
<b>CP</b>	Partícula central
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado de Gibco Dulbecco
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>EMEM</b>	Medio esencial mínimo de Eagle
<b>EUA</b>	Estados Unidos
<b>GST</b>	Glutación-S-transferasa
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>HaCaT</b>	Células de queratinocitos humanos
<b>HNC</b>	Cáncer de cabeza y cuello
<b>HNSCCs</b>	Cáncer de cabeza y cuello de células escamosas
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>HSPG</b>	Proteoglicanos de sulfato de heprano
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>INCAN</b>	Instituto Nacional de Cancerología
<b>LCR</b>	Región Larga de Control
<b>NCCN</b>	Pautas Nacionales de la Red Integral de Cáncer
<b>OPSCC</b>	Carcinoma de Células Escamosas Orofaríngeo
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura
<b>pA</b>	Sitio de poliadenilación
<b>PDZ</b>	Combinación de las iniciales de las 3 primeras proteínas que contienen ese dominio
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PSMD9</b>	Subunidad reguladora del proteasoma 26S no ATPasa 9
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RP</b>	Partícula regulatoria
<b>RT</b>	Radioterapia
<b>SiHa</b>	Células de cáncer de cuello uterino VPH16
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>SEER</b>	Repositorio del programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>SG</b>	Sobrevida Global
<b>SLP</b>	Supervivencia libre de progresión
<b>TBS-T</b>	Solución salina tamponada con tris
<b>Ub</b>	Ubiquitina

<b>UPS</b>	Sistema ubiquitina-proteasoma
<b>VPH</b>	Virus del Papiloma Humano
<b>VPH-AR</b>	Virus del Papiloma Humano de alto riesgo oncogénico
<b>VPH-BR</b>	Virus del Papiloma Humano de bajo riesgo oncogénico
<b>WB</b>	Western Blot

## 1.0 RESUMEN

### **Modulación de los niveles de la subunidad 26S del proteasoma por las oncoproteínas del Virus del Papiloma Humano (VPH) y su asociación con la respuesta a tratamiento en cáncer de orofaringe.**

**Introducción:** Se estima que el VPH es responsable del 7-8% de todas las neoplasias humanas (Cobos et al., 2014) de acuerdo con un estudio realizado por el Centro para el Control y Prevención de enfermedades (CDC, del inglés Center for Disease Control and Prevention) aproximadamente el 90 % del cáncer cervical y anal, 70% del cáncer orofaríngeo, vaginal y vulvar y el 60% del cáncer de pene son atribuibles a la presencia del VPH (CDC report, 2017). La alta prevalencia de la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) hace de esta un problema de salud pública a nivel global.

La transmisión del VPH es causada primariamente por contacto sexual y el contacto oral/ genital puede llevar a una infección por VPH tanto en la cavidad oral como en la orofaringe, representando un factor importante en la etiología del cáncer en estos sitios anatómicos (Pytynia et al., 2014). Reportes recientes ubican al VPH como agente causal del OPSCC hasta en un 80% de los casos y se espera que la incidencia del Cáncer de orofaringe (CaOF) supere en número a los de cáncer de cérvix en los próximos años (Chaturvedi et al., 2011, De Martel et al., 2012), hecho que ha incluso ya ha sido declarado por la CDC en la población de Estados Unidos (EUA) (CDC report, 2017).

Así mismo, el cáncer de orofaringe está asociado a un pobre pronóstico con una tasa de supervivencia a 5 años menor al 50%, sin que existan factores pronósticos claros que definan el comportamiento clínico en esta neoplasia (Rocco et al., 2015).

De manera interesante, se ha determinado que los tumores positivos al VPH poseen una mejor tasa de respuesta a tratamiento basado en radiación, sin que a la fecha se conozcan los mecanismos implicados en la respuesta a tratamiento inducida por el VPH (Ang *et al.*, 2010). Es bien sabido que la regulación de proteínas celulares por parte de la oncoproteína E6 del VPH involucra una serie de interacciones mediadas por el motivo LXXLL y dominios PDZ impactando en procesos como proliferación, diferenciación, adhesión y motilidad celular. Recientemente, la expresión de la sub-unidad 26S del proteasoma, llamada PSMD9, fue

descrita como factor de mal pronóstico en cáncer de mama en pacientes que recibieron radioterapia (Langlands *et al.*, 2014). PSMD9 pertenece a un conjunto de proteínas que han mostrado ser blanco de interacción de la oncoproteína E6 del VPH (Tomaić *et al.*, 2013), además de que posee en su estructura un dominio PDZ lo cual la hace susceptible a ser regulada por la proteína E6. Por estas razones, resulta importante conocer el efecto que las oncoproteínas del VPH podrían ejercer sobre PSMD9, así como la relación entre la presencia del VPH en los niveles de PSMD9 con el desenlace clínico de los pacientes con CaOF que recibieron tratamiento con fines curativos con el objetivo de proponer biomarcadores específicos y confiables que ayuden a pronosticar el desenlace de la enfermedad.

**Objetivo:** Determinar si los niveles de PSMD9 cambian en presencia del VPH 16E6 y evaluar el valor predictivo de PSMD9 en respuesta a radioterapia.

**Metodología y resultados:** mediante la técnica de inmunofluorescencia se encontró que los niveles de expresión de PSMD9 aumentan y la localización de esta proteína se concentra en el núcleo en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16. Además, en un modelo celular de cáncer de orofaringe, se realizaron ensayos en células transfectadas con las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 y luego irradiadas (6 Gy), a continuación, se determinó la expresión de PSMD9, encontrándose que los niveles de PSMD9 aumentan en presencia de la oncoproteína E6 después del tratamiento con radiación. Además, usando pruebas inmunohistoquímicas, se encontró que los niveles de expresión de PSMD9, antes del tratamiento, no están asociados con el resultado clínico de los pacientes con cáncer de orofaringe.

**Discusión:** El VPH podría incrementar la expresión de PSMD9 como mecanismo de supervivencia aprovechando su papel en el núcleo como factor de transcripción de genes implicados en la proliferación celular.

**Conclusión:** la modulación de PSMD9 por VPH podría estar involucrada en mecanismos de radiorresistencia, hecho que es importante investigar en el futuro

## 1.1 ABSTRACT

### **Modulation of the levels of the 26S subunit of the proteasome by the oncoproteins of the Human Papilloma Virus (HPV) and its association with the response to a treatment in oropharyngeal cancer.**

**Introduction:** It is estimated that HPV is responsible for 7-8% of all human neoplasms (Cobos et al., 2014) according to a study carried out by the Center for Disease Control and Prevention (CDC) approximately 90% of cervical and anal cancer, 70% of oropharyngeal, vaginal, and vulvar cancer, and 60% of penile cancer are attributable to the presence of HPV (CDC report, 2017). The high prevalence of Human Papillomavirus (HPV) infection makes this a global public health problem.

HPV transmission is caused primarily by sexual contact and oral / genital contact can lead to HPV infection in both the oral cavity and the oropharynx, representing an important factor in the etiology of cancer at these anatomical sites (Pytynia et al., 2014). Recent reports place HPV as the causal agent of OPSCC in up to 80% of cases and it is expected that the incidence of oropharyngeal cancer (CaOF) will outnumber those of cervical cancer in the coming years (Chaturvedi et al., 2011, De Martel et al., 2012), a fact that has even already been declared by the CDC in the United States (USA) population (CDC report, 2017).

Likewise, oropharyngeal cancer is associated with a poor prognosis with a 5-year survival rate of less than 50%, with no clear prognostic factors that define the clinical behavior in this neoplasm (Rocco et al., 2015).

Interestingly, it has been determined that HPV-positive tumors have a better response rate to radiation-based treatment, without the mechanisms involved in the response to treatment induced by HPV being known to date (Ang et al., 2010). It is well known that the regulation of cellular proteins by the HPV E6 oncoprotein involves a series of interactions mediated by the LXXLL motif and PDZ domains, impacting processes such as proliferation, differentiation, adhesion, and cell motility.

Recently, the expression of the 26S subunit of the proteasome, called PSMD9, was described as a poor prognostic factor in breast cancer in patients who received radiotherapy (Langlands et al., 2014). PSMD9 belongs to a set of proteins that have been shown to be the target of interaction of the HPV E6 oncoprotein (Tomaić et al., 2013), in addition to having a PDZ

domain in its structure which makes it susceptible to being regulated by the protein E6. For these reasons, it is important to know the effect that HPV oncoproteins could exert on PSMD9, as well as the relationship between the presence of HPV in PSMD9 levels and the clinical outcome of patients with CaOF who received treatment for curative purposes with the objective of proposing specific and reliable biomarkers that help to predict the outcome of the disease.

**Objective:** To determine if PSMD9 levels change in the presence of HPV16 E6 and to evaluate the predictive value of PSMD9 in response to radiotherapy.

**Methodology and results:** using the immunofluorescence technique, it was found that the expression levels of PSMD9 increase and the localization of this protein is concentrated in the nucleus in the presence of the E6 and E7 oncoproteins of HPV16. In addition, in a cellular model of oropharyngeal cancer, tests were carried out in cells transfected with the E6 and E7 oncoproteins of HPV16 and then irradiated (6 Gy), then the expression of PSMD9 was determined, finding that the levels of PSMD9 increase in presence of E6 oncoprotein after radiation treatment. Furthermore, using immunohistochemical tests, it was found that PSMD9 expression levels, before treatment, are not associated with the clinical outcome of patients with oropharyngeal cancer.

**Discussion:** HPV could increase the expression of PSMD9 as a survival mechanism, taking advantage of its role in the nucleus as a transcription factor for genes involved in cell proliferation.

**Conclusion:** modulation of PSMD9 by HPV could be involved in radioresistance mechanisms, a fact that is important to investigate in the future.

# 1. INTRODUCCIÓN

## *1.1 Cáncer de cabeza y cuello y Virus del Papiloma Humano*

El cáncer de cabeza y cuello de células escamosas (HNSCCs, del inglés *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*) comprende un grupo heterogéneo de malignidades que se originan en las células epiteliales de los revestimientos mucosos de la vía aérea superior y los conductos alimentarios, incluyendo la cavidad oral, orofaringe, laringe e hipofaringe (Leemans *et al.*, 2018). El HNSCC se ubica como el sexto cáncer más común en todo el mundo (GLOBOCAN 2020). Estos tumores están vinculados por varias características en común incluyendo predominio masculino (4:1), mayor prevalencia en la quinta y sexta década de la vida, además de un fuerte vínculo etiológico con el consumo de alcohol y tabaco (Sturgis *et al.*, 2011). En las pasadas tres décadas, a pesar del descenso en consumo de tabaco, se presentó un estancamiento de los casos seguido de un incremento en la incidencia de Carcinoma de Células Escamosas Orofaríngeo (OPSCC, del inglés *oropharyngeal squamous cell carcinoma*). Este incremento sitio específico ha sido notorio particularmente en hombres blancos de mediana edad (frecuentemente no fumadores) comparados con los pacientes tradicionales de OPSCC, que involucra hombres mayores con un historial significativo de consumo de alcohol y tabaco (Pytynia *et al.*, 2014). La creciente incidencia de OPSCC se atribuye ahora a la presencia del Virus del Papiloma Humano (VPH). La transmisión del VPH es causada primariamente por contacto sexual y el contacto oral/ genital puede llevar a una infección por VPH tanto en la cavidad oral como en la orofaringe, representando un factor importante en la etiología del cáncer en estos sitios anatómicos (Pytynia *et al.*, 2014).

Reportes recientes ubican al VPH como agente causal del OPSCC hasta en un 80% de los casos y se espera que la incidencia del Cáncer de orofaringe (CaOF) supere en número a los de cáncer de cérvix en los próximos años (Chaturvedi *et al.*, 2011, De Martel *et al.*, 2012), hecho que ha incluso ya ha sido declarado por la CDC en la población de Estados Unidos (EUA) (CDC reporte, 2017).

La naturaleza oncogénica de los VPH de alto riesgo se debe a las propiedades de inmortalización y transformación de sus oncoproteínas E6 y E7, las cuales interfieren con las vías supresoras de tumores p53 y pRb respectivamente, lo que hace que las células infectadas sean susceptibles a mutaciones y desarrollo de cáncer (Oh *et al.*, 2013 y Rampias *et al.*, 2009).

El CaOF positivo a VPH afecta principalmente a varones jóvenes lo cual lo convierte en un tópico de interés en salud pública, al afectar a una población económicamente activa. Así mismo, el cáncer de orofaringe está asociado a un pobre pronóstico con una tasa de supervivencia a 5 años menor al 50%, sin que existan factores pronósticos claros que definan el comportamiento clínico en esta neoplasia (Rocco *et al.*, 2015).

De manera interesante, se ha determinado que los tumores positivos al VPH poseen una mejor tasa de respuesta a tratamiento basado en radiación, sin que a la fecha se conozcan los mecanismos implicados en la respuesta a tratamiento inducida por el VPH (Ang *et al.*, 2010). Es bien sabido que la regulación de proteínas celulares por parte de la oncoproteína E6 del VPH involucra una serie de interacciones mediadas por el motivo LXXLL y dominios PDZ impactando en procesos como proliferación, diferenciación, adhesión y motilidad celular. Recientemente, la expresión de la sub-unidad 26S de la proteasoma, llamada PSMD9, fue descrita como factor de mal pronóstico en cáncer de mama en pacientes que recibieron radioterapia (Langlands *et al.*, 2014). PSMD9 pertenece a un conjunto de proteínas que han mostrado ser blanco de interacción de la oncoproteína E6 del VPH (Tomaić *et al.*, 2013), además de que posee en su estructura un dominio PDZ lo cual la hace susceptible a ser regulada por la proteína E6. Por estas razones, resulta importante conocer el efecto que las oncoproteínas del VPH podrían ejercer sobre PSMD9, así como la relación entre la presencia del VPH en los niveles de PSMD9 con el desenlace clínico de los pacientes con CaOF que recibieron tratamiento con fines curativos con el objetivo de proponer biomarcadores específicos y confiables que ayuden a pronosticar el desenlace de la enfermedad.

### ***1.2 Virus del Papiloma Humano: diversidad, clasificación taxonómica y tropismo celular***

Los Virus del Papiloma Humano pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, la cual comprende un grupo diverso de virus que infectan tanto a humanos como animales e incluye 227 diferentes genotipos descritos (The Papillomavirus Episteme: [pave.niaid.nih.gov](http://pave.niaid.nih.gov)). Con base en la secuencia nucleotídica del gen L1, la familia *Papillomaviridae* se divide en 39 géneros designados con una letra del alfabeto griego, dicha identidad debe ser del 60% o mayor.

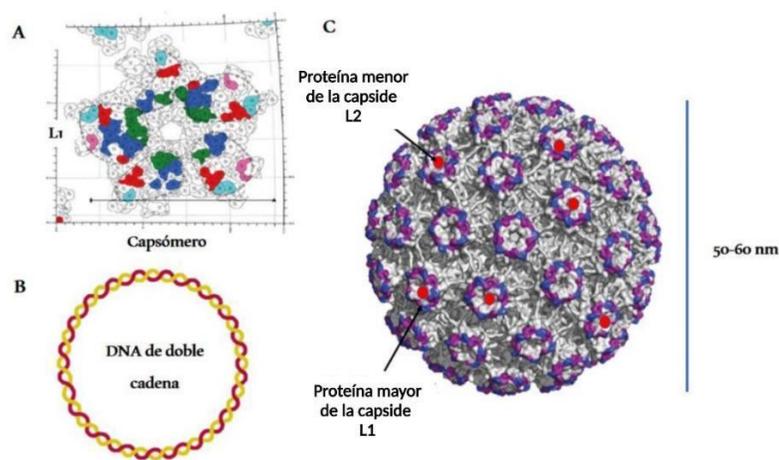
Específicamente, los VPH se dividen en 5 géneros: alpha (65 tipos, incluyendo VPH 16, 18, 31, 33, etc.), beta (53 tipos, incluyendo VPH5, 9,49, etc.), gamma (98 tipos incluyendo VPH 4,48,50, etc.), mu (3 tipos, incluyendo VPH1, 63 y 204) y nu (VPH 41; [www.hpvcenter.se](http://www.hpvcenter.se), Egawa *et al.*, 2017 y Doorbar *et al.*, 2016). Entre los géneros de VPH, los alphapapilomavirus son los más exhaustivamente estudiados ya que se sabe que son los responsables del 5% del total de casos de cáncer en todo el mundo (De Martell, 2017). Además, se subdividen en tipos virales cutáneos y mucosos basándose en su capacidad de infectar las células del epitelio escamoso o el revestimiento interno de los tejidos, respectivamente. El VPH muestra tropismo por las células de la capa basal epitelial, las cuales son células indiferenciadas responsables de la renovación constante del epitelio (Brianti P., et al. 2017). Se piensa que el tropismo del VPH es controlado principalmente a nivel de la expresión génica del virus, a través de elementos regulatorios contenidos dentro de la región larga de control (LCR, del inglés *Long Control Region*) del genoma viral, lo cual es un determinante importante del tropismo (Steinberg *et al.*, 1989). La regulación a nivel de infectividad también puede influir en el sitio de infección, con una marcada diferencia en la carga de distribución reportada entre los viriones cutáneos y mucosos (Mistry *et al.*, 2008).

### ***1.3 Transmisión***

La transmisión del VPH requiere del contacto con la piel, mucosas o líquidos corporales de una pareja con lesiones verrucosas o con infección subclínica. Por medio de un epitelio lesionado (con microabrasiones) es posible que el VPH tenga acceso a las células basales, las cuales se convierten en reservorios del virus una vez que son infectadas (Alfaro *et al.*, 2013). El VPH además de infectar el trato genital, es capaz de infectar y desencadenar el desarrollo de cáncer en el tracto respiratorio superior incluyendo la cavidad oral, orofaringe, laringe e hipofaringe. La transmisión del VPH primariamente es causada por contacto sexual y el contacto oral/genital puede llevar a una infección por VPH oral/orofaringe (Pytynia *et al.*, 2014). La práctica de sexo oral es un factor determinante para la transmisión del VPH en esta región anatómica, siendo la cantidad de parejas sexuales con las que se ha practicado sexo oral a lo largo de la vida el factor más fuertemente asociado con el desarrollo del OPSCC (Taberna 2017).

### 1.4 Estructura del VPH

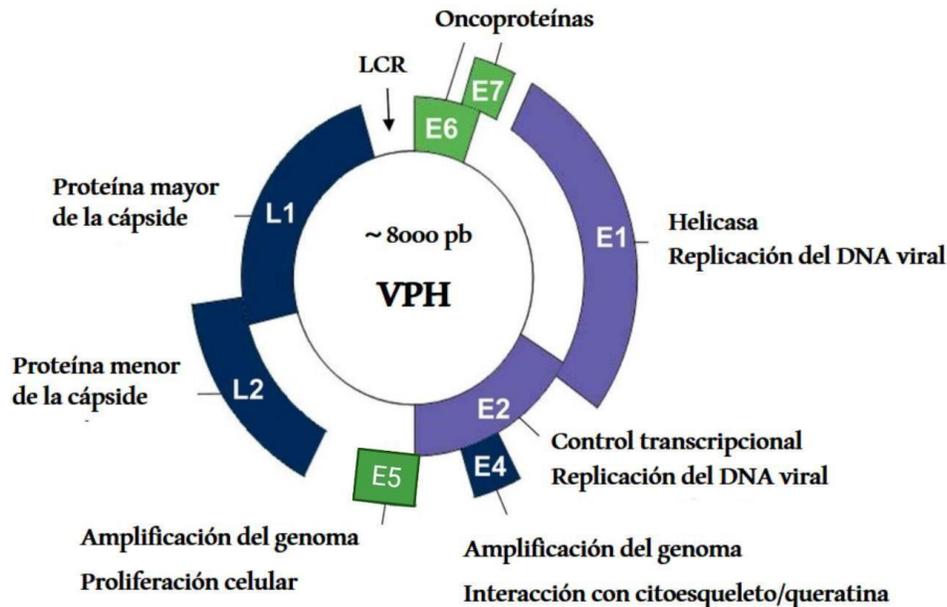
Todas las partículas de VPH, independientemente del género al que pertenezcan, comparten una estructura común icosaédrica no envuelta de 50-60 nm de diámetro. Sus genomas comprenden DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases, el cual contiene diversos marcos de lectura abiertos (ORFs del inglés *Open Reading Frame*) (Doorbar *et al.*, 2016). La cápside de los VPH está compuesta por dos proteínas estructurales, la proteína mayor (L1) y la proteína menor (L2). La cápside contiene 360 moléculas de la proteína L1 arregladas en 72 capsómeros, cada uno formado por 5 moléculas de L1 (Chen *et al.*, 2000) (Figura 1). La interacción entre capsómeros se da entre los extremos C- terminal de la proteína L1, la cual se extiende en dirección a los capsómeros vecinos y los une en su base mediante puentes disulfuro (Chen *et al.*, 2001 y Wolf *et al.*, 2010). La partícula viral también contiene un número variable de moléculas L2, las cuales no se encuentran totalmente expuestas en la superficie del virión, a excepción de los aproximadamente 120 aminoácidos que forman su extremo N- terminal (Rubio *et al.*, 2011). Se cree que L2 puede estar presente en el centro de los capsómeros pentavalentes en los vértices del virión (Modis *et al.*, 2002). Ambas proteínas juegan un papel muy importante en mediar la eficiencia de la infectividad del virus (Doorbar *et al.*, 2006 y Modis *et al.*, 2002).



**Figura 1. Estructura del Virus del Papiloma Humano.** A) Capsómero del VPH, cada uno de ellos está formado por 5 moléculas de la proteína L1. B) El genoma viral comprende un DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases. C) El virus tiene una estructura icosaédrica no envuelta de 50-60 nm de diámetro. La cápside contiene 360 moléculas de la proteína L1 arregladas en 72 capsómeros además contiene un número variable de moléculas L2. (Tomada y modificada de Xiao *et al.*, 2016).

### 1.5 Organización del Genoma viral

Se han identificado en el genoma viral tres regiones: La región de codificación temprana (E: *early*), región de codificación tardía (L: *late*) y la región larga de control (LCR: *Long Control Region*) (Revisado por Asmita y Rita 2020) (Figura 2). El genoma viral se encuentra dividido por dos sitios de poliadenilación (pA): el pA temprano y el pA tardío. El extremo 5' del genoma del VPH empieza con la región de codificación temprana representando alrededor del 45% del genoma viral que contiene 6 marcos abiertos de lectura (ORFs, del inglés *Open Reading Frames*) (Revisado por Asmita y Rita 2020 y Picconi *et al.*, 2013), que codifican para proteínas involucradas en la transcripción viral (E2), la replicación del DNA viral (E1 y E2), la proliferación celular (E5, E6 y E7) y algunos pasos tardíos del ciclo viral (E4) (Picconi *et al.*, 2013).



**Figura 2. Organización del genoma del VPH.** Representación esquemática del genoma circular del VPH16 donde se muestra la ubicación de los genes tempranos (E), tardíos (L1 y L2), y de la región larga de control (LCR). El genoma del VPH codifica ocho proteínas bien caracterizadas, cuyas funciones se indican en la imagen. Entre ellos se encuentran las proteínas de replicación viral E1 y E2 (violeta) y los oncogenes virales E6, E7 y E5 (verde), los cuales han sido validados como esenciales para la patogénesis viral.

La región tardía, comprende alrededor del 40% del genoma viral y contiene dos marcos de lectura abiertos, esenciales para la fase viral productiva. L1 codifica para la proteína principal de

la cápside, mientras que L2 codifica para la proteína menor de la cápside y muestra marcadas diferencias aun entre los tipos que infectan a una misma especie (Picconi, 2013).

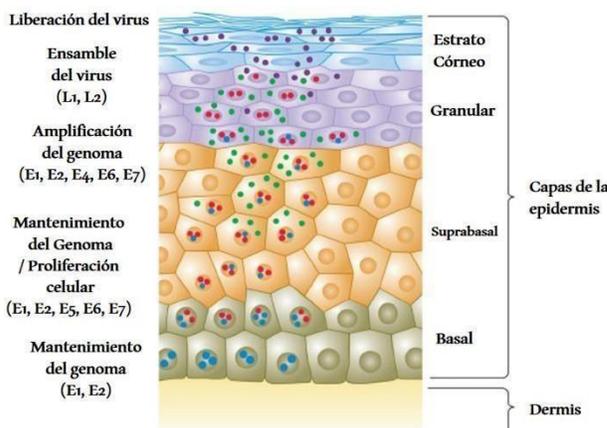
El ensamble de las partículas virales ocurre en el núcleo de la célula, la proteína L1 se autoensambla en partículas similares a virus (Handler et al., 2015), mientras que la proteína L2 interviene en la entrada del virus a las células, en la localización de los componentes virales en el núcleo, en la unión al DNA, en la formación de la cápside y en la estabilidad (Martinic *et al.*, 2008). La región larga de control (LCR) o región no codificante, representa el 15% del genoma viral, se encuentra ubicada entre el final del gen L1 y el inicio de la región temprana, contiene elementos promotores, sitios de unión a factores transcripcionales, regiones palindrómicas reconocidas por E2 y el origen de replicación (Picconi, 2013).

### ***1.5.1 Ciclo de replicación del VPH***

El ciclo de infección del VPH está estrechamente relacionado con el estatus de diferenciación del queratinocito. El VPH inicia su ciclo productivo infectando a las células poco diferenciadas de las capas basales del epitelio, donde inicia la transcripción de sus genes. La forma en que el VPH alcanza las células de los estratos bajos del epitelio es a través de lesiones, microheridas y abrasiones del tejido (Premoli et al., 2005). El VPH infecta las células epiteliales a través de la interacción con los receptores de la superficie celular (Cox et al., 2016). Hay controversia sobre la naturaleza del receptor viral, pero se cree que son los proteoglicanos heparán sulfato (HSPGs) los receptores iniciales. Se ha observado que la proteína L2 de todos los virus VPHs secuenciados, contienen en su extremo amino terminal una secuencia consenso que es escindido por furina, una pro-proteína convertasa (Day *et al.*, 2008), y esta escisión se cree es necesaria para la unión y entrada del virus a la célula, ya que esto provoca un cambio conformacional de la cápside viral, seguido de la liberación de los HSPGs para la posterior asociación con un receptor putativo secundario, que se cree es una integrina 6 (Bosch *et al.*, 2002, Modis *et al.*, 2002 y Richards *et al.*, 2006). Una vez ocurrida la infección, el virus se establece dentro del núcleo de las células basales donde el minicromosoma viral permanece en estado episomal, replicándose a niveles muy bajos en coordinación con la división celular. Cuando las células infectadas se diferencian y migran desde la capa basal hacia el estrato espinoso del epitelio, la replicación viral se estimula, produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo.

En esta etapa del ciclo viral la participación de E6y E7 juegan un rol esencial en producir la re-entrada a la fase S del ciclo celular en las capas superiores del epitelio para permitir la amplificación del genoma viral. También se requiere de la participación de las proteínas E1 y E2 las cuales incrementan su abundancia en la célula por la sobreexpresión del promotor tardío (p670 en VPH16) (Bodily *et al.*, 2011). La expresión de los genes tardíos se observa únicamente en los queratinocitos totalmente diferenciados de los estratos córneos, donde ocurre el ensamblado de las cápsides virales quedando lugar a la formación de viriones (Puig-Tintoré *et al.*, 2002).

Para que se complete el ciclo productivo del VPH se necesita la expresión de la proteína L2, la salida del ciclo celular y la expresión de la proteína mayor de la cápside L1 para permitir el empacamiento del genoma. Así mismo, la proteína E4 se ensambla en las fibrillas amiloides que disrumen la estructura de la queratina y compromete el ensamblado normal del estrato córneo (Doorbar *et al.*, 2016). Los VPHs no presentan una fase lítica, por lo que se valen de las características propias de las células que los albergan para propagar su progenie, los cuales son liberados cuando las células terminales del estrato córneo sufren el proceso de descamación (Premoli *et al.*, 2005), causando así la infección en las células vecinas (Figura 3).



**Figura 3. Ciclo de replicación del VPH.** El VPH infecta las células basales del epitelio a través de microabrasiones. Una vez ocurrida la infección, el virus se establece dentro del núcleo manteniendo su genoma en forma episomal y expresando los genes tempranos E1-E7, replicándose a niveles bajos y en coordinación con la división celular. En las capas intermedias del epitelio el virus aumenta su tasa de replicación y comienza la expresión de los genes tardíos L1, L2, así como E4 y E5. Posteriormente se ensamblan los viriones y estos aprovecha las características propias de las células que infecta y se libera cuando el epitelio sufre un proceso de descamación.

### 1.5.2 Potencial oncogénico del VPH

Diversos estudios epidemiológicos y moleculares han permitido clasificar a los VPH de acuerdo a su potencial oncogénico en VPHs de alto riesgo (VPH-AR) y de bajo riesgo (VPH-BR). Por lo menos 15 tipos de VPH (VPH16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73 y -83) son clasificados como de alto riesgo, los cuales se asocian con el desarrollo de cáncer de cérvix, pene, vagina, ano, vulva y orofaringe (Dunne *et al.*, 2013).

Dentro de los cuales el VPH16 es el más prevalente. Cabe destacar que el DNA de los VPH-AR se ha encontrado presente en el 99.7% de los especímenes de cáncer de cérvix (Walboomers *et al.*, 1999) y en un 70% de los cánceres de orofaringe (CDC report, 2017). Por su parte, los VPH-BR están asociados únicamente al desarrollo de papilomas y condilomas, siendo los VPH6 y 11 los más prevalentes de este grupo (Alfaro *et al.*, 2013).

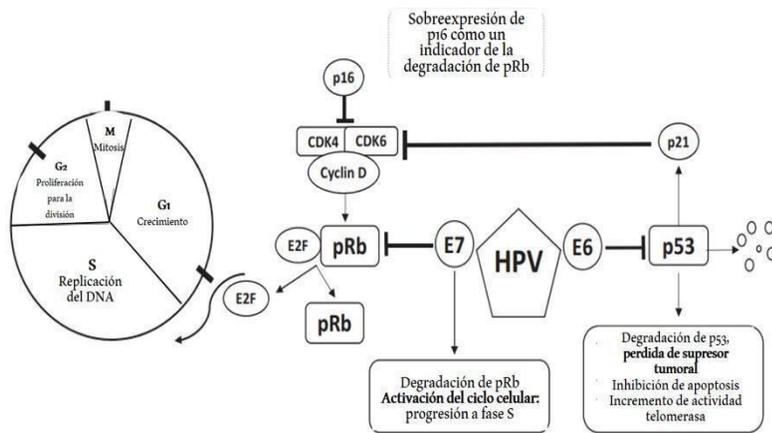
### ***1.6 Mecanismo oncogénico del VPH***

Si bien es cierto que una infección por VPH-AR está asociada al desarrollo de cáncer, esta no es suficiente, ya que existen una serie de factores propios del hospedero que están involucrados en dicho proceso, como su genética y el estado de inmunosupresión que lo podría llevar a desarrollar una infección persistente, misma que juega un papel fundamental en el establecimiento de la neoplasia (Sasagawa *et al.*, 2010).

El genoma del VPH puede integrarse con el genoma del hospedador representando un punto clave en el inicio del proceso carcinogénico. El incremento de la expresión de las proteínas E6 y E7 se encuentra asociada con la integración del DNA viral en el genoma del hospedero, la transformación maligna y en última instancia con la progresión a cáncer (Forcier *et al.*, 2010). La integración del genoma viral con el del hospedador lleva a la disrupción de la secuencia del gen E2 provocando una disminución en la cantidad de esta proteína, la cual es responsable de reprimir la expresión de E6 y E7. Durante el curso de la infección viral, E6 y E7 son las responsables de la multiplicación del genoma viral con ayuda de la maquinaria celular (Neveu *et al.*, 2012; White *et al.*, 2012). Por lo tanto, el desarrollo tumoral mediado por el VPH puede ser definido como un daño colateral de la infección viral. Las tres principales oncoproteínas virales (E5, E6, y E7) contribuyen a la iniciación y progresión del cáncer alterando la regulación del ciclo celular, el mantenimiento telomérico, induciendo daño al DNA e inestabilidad genómica, además de bloquear las vías de señalización supresoras de tumor y apoptosis (Brianti *et al.*, 2017).

Las oncoproteínas E6 y E7 son las proteínas virales transformantes primarias y juegan un papel importante en la evasión inmune modificando la expresión de citocinas para alterar la proliferación celular y la respuesta a interferón. La proteína E7 modula la transcripción a lo largo del genoma de la célula hospedera a través de sus interacciones con histonas

desacetilasas, las cuales activan la transcripción cuando se eliminan de los promotores (Figura 4). Es importante destacar que la expresión de las proteínas del VPH y la integración viral promueven anomalías cromosómicas y la inmortalización celular (Moody *et al.*, 2010; Pullos *et al.*, 2015).



**Figura 4. Oncoproteínas E6 y E7 del VPH de alto riesgo y su papel en la activación del ciclo celular y la pérdida del supresor tumoral p53.** La infección por VPH conduce a la desregulación del ciclo celular y la pérdida del supresor tumoral p53. La proteína E7 del VPH se une a pRb y promueve su degradación dando como resultado la liberación y activación del factor transcripcional E2F, lo que induce un aumento del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p16INK4A y la entrada a la fase S del ciclo celular. La proteína E6 del VPH previene la inducción de apoptosis en respuesta a la entrada no programada de la fase S a través de la ubiquitinación y degradación proteosómica de p53. En condiciones normales, p53 induce la expresión de p21 que inhibe el complejo ciclina-CDK y detiene el ciclo celular.

### 1.6.1 E6 y su participación en el mecanismo oncogénico

La proteína E6 está compuesta por 150-160 aminoácidos con un peso de 18 KDa, la cual posee dos dominios de unión al DNA con estructura de dedos de zinc formados por cuatro motivos Cys-X-X-Cys (Zanier *et al.*, 2012). Estos motivos son estrictamente conservados en todas las proteínas E6 y su integridad es esencial para la función normal de esta oncoproteína (Kanda, *et al.*, 1991 y Sherman, *et al.*, 1996). Su dominio carboxilo terminal contiene un motivo de unión a dominios PDZ (PBM, del inglés *PDZ Binding Motif*) responsable de la interacción y degradación de varias proteínas celulares implicadas en adhesión celular y control de la polaridad celular epitelial (Massimi *et al.*, 2004; figura 5).

La proteína E6 de los VPH-AR forma un complejo con la ubiquitin ligasa E6AP celular, que promueve la ubiquitinación y posterior degradación de p53 (Scheffner *et al.*, 1990, 1993). La degradación de p53 permite varios cambios celulares que facilitan la transformación de una célula normal en tumoral, uno de ellos es la inducción de proliferación celular descontrolada debido a la evasión de los puntos de regulación celular (Pal A. *et al.*, 2020). Así, la perturbación de p53 por E6 es significativa para asegurar una proliferación celular continua. E6 del VPH se puede unir a la secuencia consenso LxxLL en el dominio conservado de E6AP

para formar un complejo heterodimérico de E6/E6AP/p53, que en última instancia conduce a la degradación de p53. Esto lleva a las células a experimentar una división celular descontrolada, evadiendo los puntos de regulación preventivos. Además, E6 promueve la inmortalización celular al aumentar los niveles de actividad de la telomerasa (Klingelhutz *et al.*, 1996), perpetuando así la proliferación celular.

### ***1.6.2 E7 y su participación en el mecanismo oncogénico***

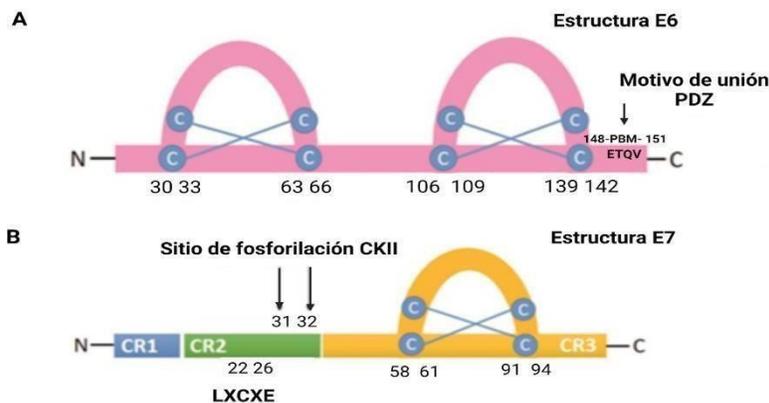
E7 fue el primer oncogén del VPH en ser descubierto. E7 es una fosfoproteína relativamente pequeña de 98 aminoácidos que tiene un dominio de unión a zinc en su porción C-terminal, cuya estructura e integridad es crítica para la actividad de E7 (McIntyre *et al.*, 1993 y Rawls *et al.*, 1990) (Patrick *et al.*, 1994; figura 5). El extremo carboxilo terminal, es conservado y contiene un dominio de dedo de zinc con dos motivos CXXC separados por 29 residuos de aminoácidos (Barbosa *et al.*, 1990; McIntyre *et al.*, 1993). Este dominio es el responsable de la dimerización dependiente de zinc y de mediar las interacciones entre E7 y proteínas celulares responsables de regular el ciclo celular y apoptosis como p21 y pRb (Ohlenschlager *et al.*, 2006).

La proteína E7 es regulada post-transcripcionalmente por el proteasoma y por fosforilación debido a su interacción con el complejo de ubiquitina ligasa de la caja Skp-Cullin-F (SCF), que conduce a una mayor ubiquitinación de la misma (Oh *et al.*, 2004). Adicionalmente, un sitio de fosforilación C-terminal parece ser fosforilado principalmente durante la fase S, pero la cinasa responsable no se ha determinado (Massimi *et al.*, 2000). La inhibición de la proteína del retinoblastoma (pRb) mediada por E7 es un paso crucial para lograr la proliferación celular sin restricciones. La interacción entre E2F y pRb es un punto de regulación obligatorio para que las células realicen la transición de la fase G1 a S. Cuando las células no se encuentran preparadas para entrar en la fase S del ciclo celular, la proteína pRb permanece unida a la familia de factores transcripcionales E2 para prevenir que se transcriban los genes necesarios en la fase S (McLaughlin-Drubin *et al.*, 2013).

En las células infectadas por el VPH, E7 marca a pRb para ubiquitinación, conduciendo a la liberación de los factores de transcripción E2F, que transcriben a ciclina E, ciclina A y p16INK4A inhibidor de CDK 4/6, forzando a las células a entrar prematuramente a la fase S (Boyer *et al.*, 1996). El inhibidor de CDK P16INK4A (proteína supresora de tumor) es un

blanco importante de la oncoproteína E7 del VPH para regular el ciclo celular (McLaughlin-Drubin *et al.*, 2013). La proteína p16 es codificada por el gen supresor tumoral CDKN2A, y actúa como inhibidor de las cinasas dependientes de ciclinas que desaceleran el ciclo celular actuando en el punto de control entre la fase G1-S mediante la inactivación de la proteína pRb (Torres Gómez *et al.*; 2011). Existe, por tanto, una relación recíproca entre pRb y p16. Esta inactivación se corresponde con una sobreexpresión de p16. E7 desencadena la expresión de p16INK4A no solo a través de la degradación de pRb sino también por la desrepresión epigenética a través de KDM6B, desmetilasa específica de H3K27 6B (McLaughlin-Drubin *et al.*, 2013).

Las células infectadas por el VPH muestran co-expresión de E6 y E7, las cuales establecen el ambiente perfecto para las señales proliferativas sostenidas (Asmita y Rita 2020). Los estímulos anómalos de crecimiento creados por la destrucción de pRb por acción de E7 podrían ser estabilizados por la ausencia de p53 promovida por E6, conduciendo a la evasión de todos los puntos reguladores anti-tumorigénicos que llevan a la célula a la división celular incontrolable.



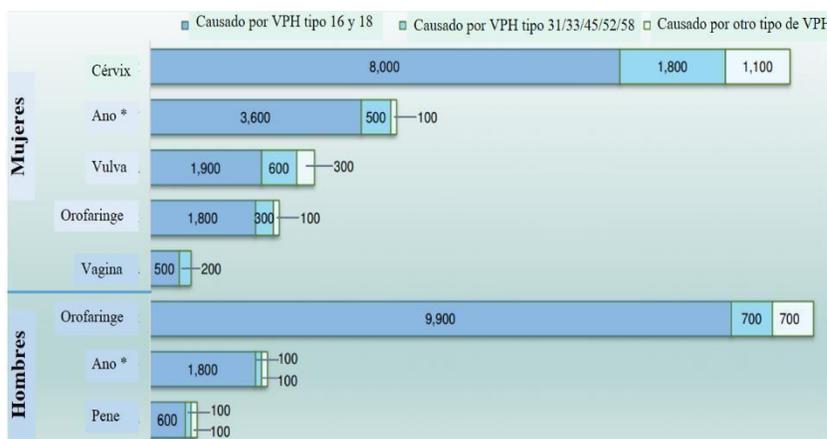
**Figura 5. Oncoproteínas E6 y E7 del VPH-AR.** A) Diagrama esquemático de la oncoproteína E6 donde se muestra los dos dedos de Zinc, junto con las regiones que participan en la interacción con algunas de sus proteínas diana (Se muestra el PBM C-terminal y motivo PDZ). B) Diagrama esquemático de E7 y los motivos de aminoácidos más importantes necesarios para la integridad y las funciones proteicas. Se muestran tres regiones de E7 que son homólogas a las regiones 1-3 conservadas de adenovirus E1A (CD1-3). También se muestra el dedo de zinc, junto con las regiones involucradas en la unión de pRb (LXCXE) y los dos residuos de serina (31 y 32) que son susceptibles a la fosforilación de caseína quinasa II (CKII).

Además de E6 y E7, la proteína E5 también juega un rol importante en el proceso oncogénico inducido por VPH. E5 es una proteína hidrofóbica asociada a membrana de 83 aminoácidos con residencia en el retículo endoplásmico. A través de los años se ha comprobado la actividad oncogénica de E5 del VPH16, la cual puede inducir transformación celular junto con E6. Se sabe que induce proliferación celular aberrante a través de la activación mediada por ligando

de EGFR, inhibiendo apoptosis a través de la degradación de los receptores Fas y previniendo la formación del dominio de muerte ayudando a las células carcinogénicas a evadir la respuesta inmune para progresar hacia la malignidad (Venuti *et al.*, 2011).

### 1.7 VPH en HNSCC

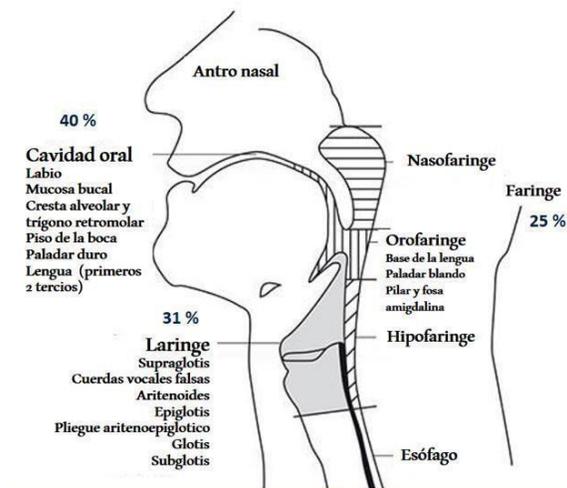
Se estima que el VPH es responsable del 7-8% de todas las neoplasias humanas (Cobos *et al.*, 2014) y de acuerdo con un estudio realizado por el Centro para el Control y Prevención de enfermedades (CDC, del inglés *Center for Disease Control and Prevention*) aproximadamente el 90 % del cáncer cervical y anal, 70% del cáncer orofaríngeo, vaginal y vulvar y el 60% del cáncer de pene son atribuibles a la presencia del VPH (CDC report, 2017; figura 6). A pesar de los métodos efectivos de detección y de la amplia aplicación de vacunas, las neoplasias producidas por el VPH continúan siendo un importante problema de salud pública debido a la alta prevalencia de neoplasias asociadas a este virus, donde se ha demostrado un alarmante incremento en los casos de cáncer de cabeza y cuello positivos a VPH (Reid *et al.*, 1982; GLOBOCAN, 2018; Chaturvedi *et al.*, 2011).



**Figura 6. Número de casos anuales estimados de cáncer atribuibles al VPH por sexo, tipo de cáncer y tipo de VPH.** Los casos de cáncer atribuibles al VPH fueron estimados multiplicando el número de cánceres asociados al VPH por el porcentaje de casos atribuibles al VPH (es un tipo específico de cáncer celular donde se encontró presente el VPH). \* Incluye carcinoma de células escamosas anal y rectal.

El cáncer de cabeza y cuello (HNC) representa el sexto cáncer más común en todo el mundo con aproximadamente 630,000 pacientes nuevos diagnosticados anualmente lo que resulta en 350,000 muertes cada año (Parking *et al.*, 2005). Más del 90% de los cánceres de cabeza y cuello son carcinomas de células escamosas (HNSCCs, del inglés *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*) que comprende un grupo heterogéneo de malignidades que inician en la mucosa del tracto aerodigestivo superior, incluyendo el cáncer de cavidad oral, laringe y

orofaringe (Pérez M. *et al.* 2019) (figura. 8). Se sabe que los cánceres de diferentes subsitios tienen una epidemiología, anatomía, comportamiento clínico y asociación únicos con la infección por el VPH (Dalla Torre *et al.*, 2018).

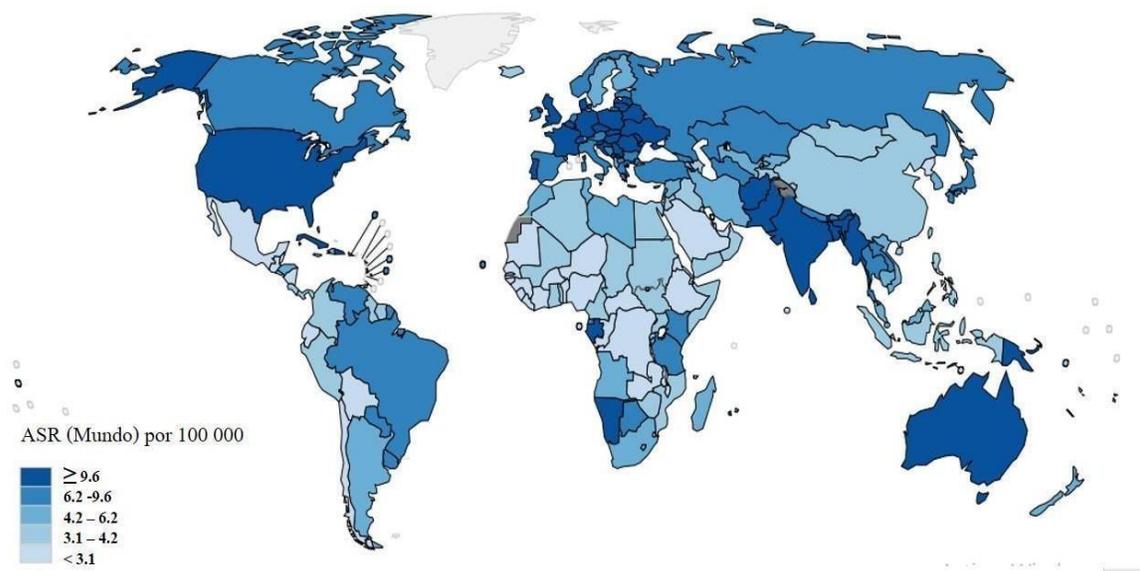


**Figura 7. Sitios y subsitios anatómicos afectados por el Cáncer de Cabeza y Cuello (HNC, por sus siglas en inglés).** La distribución aproximada de los HNC es del 40% en cavidad oral, 31% en laringe y 25% en faringe, orofaringe e hipofaringe.

El riesgo de desarrollar HNSCC se encuentra asociado a varios factores, incluyendo la dieta, antecedentes genéticos, consumo de alcohol y tabaco y el estilo de vida sexual. Entre todos los factores etiológicos, el consumo de cigarrillos y el consumo excesivo de alcohol representan los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de HNSCC, los cuales tienen un efecto sinérgico (Blot *et al.*, 1988). Sin embargo, en las últimas décadas se ha documentado que la infección por VPH-AR es un factor de riesgo al que se le puede atribuir muchos de los casos de HNSCC. Se sabe que al menos el 12% del cáncer de faringe, el 3% del cáncer oral y entre un 30-80% de los casos de carcinoma orofaríngeo son causados por el VPH (Parking *et al.*, 2006) (figura 7). Se cree que una alta frecuencia de sexo oral y un número elevado de parejas sexuales aumenta el riesgo de HNSCC relacionado al VPH (D'Souza *et al.*, 2009). Los tumores que se desarrollan en cada subsitio anatómico tienen una epidemiología, anatomía, comportamiento clínico y asociación única con la infección por VPH (Dalla Torre *et al.*, 2018).

Al igual que otros tipos de cáncer, el riesgo de desarrollar HNSCC también aumenta con la edad y la mayoría de los HNSCC ocurren en pacientes de 50 años o más. La edad promedio para el diagnóstico de HNSCC relacionado con el tabaquismo es de 60 años (mediana de edad: 63 años), mientras que la edad promedio para el HNSCC relacionado con el consumo de cigarrillo es de 78 años (Vigneswaran *et al.*, 1995). De manera interesante, el HNSCC

relacionado con el VPH generalmente se diagnostica a edades más tempranas que aquellos relacionados con el consumo de tabaco (CDC 2012). La mediana de edad en el momento del diagnóstico de HNSCC asociado con la presencia del VPH es de 58 años para los hombres y 61 años para las mujeres (CDC 2012, figura 8).



**Figura 8. Tasas estimadas de incidencia estandarizadas en 2018 para HNC (en el mundo).** Se muestra la tasa estimada de incidencia estandarizada por edad del HNC, que incluye cáncer de orofaringe, labio, cavidad oral, hipofaringe y laringe para ambos sexos y todas las edades (Globocan 2018).

### ***1.8 Carcinoma escamoso de la orofaringe (OPSCC)***

El cáncer que afecta el espacio orofaríngeo es una neoplasia maligna compleja y a menudo implacable, con alta propensión a la invasión local (Huber y Tantiwongkosi 2014). La mayoría de los cánceres orofaríngeos son carcinomas de células escamosas, representando un 89% de todos los casos. Los pacientes a menudo presentan un bulto indoloro en el cuello, acompañado de algunos otros síntomas (Mehanna *et al.*, 2016). Comúnmente los síntomas se encuentran ausentes en los estadios tempranos de la enfermedad, pero se vuelven evidentes cuando existe una invasión local avanzada, incluyendo dolor, cambios en la coloración (color rojo o rojo con matices blancos), disfagia, otitis, pérdida de peso, fijación de la mandíbula y trismus (Huber y Tantiwongkosi 2014).

La orofaringe se extiende desde la superficie superior del paladar blando hasta la vallecula, incluyendo la base de la lengua, paladar blando, úvula, pilares amigdalinos anteriores y posteriores, las amígdalas palatinas, surco glosa amigdalino y paredes faríngeas laterales y

posteriores (Amin *et al.*, 2017). La mucosa escamosa del anillo de Waldeyer (formado por las amígdalas, los adenoides y otros tejidos linfoides) es única en su estructura, con una mucosa estratificada escamosa íntimamente asociada con el tejido linfoide subyacente (Perry, M. 1994). La membrana basal interpuesta es porosa para permitir la transmigración de linfocitos bajo circunstancias normales como parte de los mecanismos de defensa del organismo. En consecuencia, los carcinomas que se desarrollan en este sitio pueden desarrollar metástasis sin una ruptura histológicamente detectable de la membrana basal. (Buckley *et al.*, 2018 y Howard *et al.*, 2012).

La preferencia del VPH por la orofaringe es inexplicable, pero puede estar relacionada con la presencia de mucosa de transición, predominantemente presente en el tejido de la amígdala y el cual muestra similitudes histológicas a la mucosa del cérvix (Sturgis *et al.*, 2011; Hammarstedt *et al.*, 2007). Otra posibilidad recae en las características propias del VPH16, el cual es el responsable del 90-95 % de todos los OPSCC, cuya supervivencia podría verse beneficiada en el epitelio de la cripta amigdalina (Klussman *et al.*, 2001 y Joseph *et al.*, 2012). También es posible que la invaginación de la superficie mucosa de la amígdala favorezca la captura y el mantenimiento del virus al promover su acceso a las células basales (las únicas células en división en el epitelio) (Chu *et al.*, 2013). Si esto es cierto, el tejido amigdalario podría ser un reservorio para VPH en el tracto aerodigestivo superior. Esta opinión está parcialmente respaldada por el hecho de que cuando las muestras orales se recogen mediante enjuague bucal, la tasa de detección del VPH es mucho mayor que con los hisopos (Syrjanen *et al.*, 2004).

### ***1.9 Epidemiología***

El carcinoma de células escamosas orofaríngeo (OPSCC) es uno de los tipos importantes de HNSCC, el cual se ha convertido en un problema creciente de salud pública ya que su incidencia ha aumentado dramáticamente en los últimos años. A fines del siglo XX y principios del siglo XXI, las campañas para reducir el tabaquismo disminuyeron las tasas de incidencia de cánceres relacionados con el tabaco, incluidos los cánceres de cavidad oral y larínge. Sin embargo, durante este mismo período, las tasas de incidencia de cáncer de orofaringe aumentaron (Sturgis *et al.*, 2007). De acuerdo con los datos del repositorio del programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER) de Estados Unidos, la

prevalencia de los cánceres negativos para VPH disminuyó en un 50% de 1988 a 2004, mientras que el carcinoma orofaríngeo positivo para VPH aumentó en un 225% (Pytynia *et al.*, 2014). La incidencia de los OPSCC positivos a VPH (VPH+) es de aproximadamente 38,000 casos diagnosticados cada año en todo el mundo (de Martel *et al.*, 2017)

Al menos en Estados Unidos, las estadísticas del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) del año 2012 revelaron que la incidencia de los OPSCC asociados al VPH excedía la de los cánceres del cuello uterino asociados al VPH, lo que hace que el OPSCC sea el cáncer causado por el VPH diagnosticado con mayor frecuencia (CDC 2018).

A diferencia de los cánceres de la cabeza y el cuello negativos a VPH (VPH-), los OPSCC VPH+ se presentan en pacientes más jóvenes con una exposición mínima o nula al tabaco (Pytynia *et al.*, 2014). Los OPSCC VPH+ tienen un predominio masculino debido a que los hombres sufren una incidencia de tres a cinco veces mayor que las mujeres en todo el mundo (Chaturvedi *et al.*, 2008 y Gillison *et al.*, 2015). Además, estudios epidemiológicos demuestran que los pacientes con OPSCC VPH+ tienen un estatus socioeconómico y educativo alto (Benard *et al.*, 2008).

Los tipos de VPH-AR que se encuentran en cáncer de cérvix también se encuentran presentes en OPSCC, siendo el VPH16 el más prevalente en ambos tumores (Castellsague *et al.*, 2016). Sin embargo, una gran proporción (alrededor del 90 al 95%) de los pacientes OPSCC son positivos al VPH16 comparado con los tumores de cáncer de cérvix, en los cuales aproximadamente el 60% son positivos a este tipo viral. Adicionalmente, la frecuencia del VPH18 es mucho menor en los OPSCC (menos del 2%) en comparación con los tumores de cérvix (10%), de hecho, el VPH33 es el segundo tipo viral de alto riesgo más prevalente en OPSCC (3.3 %).

### ***1.10 Pronóstico***

Los pacientes con OPSCC usualmente tienen un pobre pronóstico, el cual depende del estadio en el que se encuentre el tumor al momento del diagnóstico y a la edad del paciente. En general la supervivencia a 5 años se encuentra entre el 40 y 50 % (Simran K. *et al.* 2018). El estatus de infección con VPH ha sido reconocido como un factor pronóstico crítico en este tipo de cáncer, pues los pacientes positivos a VPH en cualquier estadio clínico, tienen un mejor pronóstico en comparación con los pacientes con tumores negativos al virus (Wu, W. *et al*

2019), los cuales tienen casi 3 veces más probabilidades de morir por cáncer (Syeling L. et al, 2016). Este pronóstico favorable está relacionado con una mejor respuesta a las terapias convencionales (predominantemente radioterapia) en comparación con los pacientes con tumores VPH- con un historial de consumo de alcohol y tabaco, los cuales muestran un 57% de supervivencia a 5 años en comparación al 82% de supervivencia de los pacientes con tumores VPH+ (Vigneswaran N, *et al.* 2014).

A pesar que muchos pacientes con OPSCC positivos a la presencia del VPH experimentan una favorable supervivencia libre de enfermedad con las terapias actuales, aproximadamente un 25% de estos terminan desarrollando recurrencia tumoral y mueren a causa de esta (Lay J. *et al.* 2014). Así mismo, una gran proporción de los pacientes con HNSCC son frecuentemente diagnosticados hasta que su enfermedad ya ha alcanzado un estadio clínico avanzado, requiriendo un tratamiento agresivo y costoso que podría no curarlos, con recurrencias en el 50% de los pacientes (Cadoni G. *et al.* 2017). Además, más del 50% de los pacientes con HNSCC cursan con dificultades para tragar como principal efecto colateral post tratamiento lo cual impacta en su calidad de vida (Clark J, *et al.* 2019) dejando de manifiesto la necesidad de identificar pacientes que podrían ser beneficiados con la terapia convencional ya que los pacientes con OPSCC VPH+ pueden ser candidatos para un tratamiento menos agresivo, por lo tanto, es fundamental el establecimiento de biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en OPSCC que permitan la correcta selección de pacientes y así evitar el sobre tratamiento.

### ***1.11 Diferencias entre los OPSCC VPH+ y VPH-***

De acuerdo con las pautas nacionales de la Red Integral de Cáncer (NCCN del inglés, *National Comprehensive Cancer Network*) se recomienda la "prueba de VPH para todos los tumores orofaríngeos"(NCCN 2008). Abundante evidencia sugiere que los casos VPH+ y los VPH- representan subgrupos diferentes de OPSCC, cada uno con perfiles epidemiológicos y biológicos únicos (Van Monsjou *et al.*, 2010 y Mignogna *et al.*, 2004). Los pacientes OPSCC VPH+ son usualmente diagnosticados en estadios avanzados, con un tamaño tumoral pequeño y una alta diseminación nodal (Huang *et al.*, 2012 y Goldenberg *et al.*, 2008). Desde la perspectiva histopatológica, son usualmente no queratinizados, indiferenciados o carcinomas de células escamosas basales (Gillison *et al.*, 2012 y Huang *et al.*, 2012). Además, muestran una menor proporción de segundas neoplasias primarias, probablemente debido a una menor

exposición a otros factores de riesgo como el consumo de tabaco o el consumo de alcohol (Peck *et al.*, 2013 y Martel *et al.*, 2017). Las principales diferencias entre los pacientes con OPSCC VPH+ y VPH- se resumen en la siguiente tabla.

**Tabla1. Diferencias principales entre los pacientes con HNSCC VPH (+) y VPH (-).**

	HNSCC VPH (-)	HNSCC VPH (+)
Factor de riesgo	Alcohol, Tabaco	Número de parejas sexuales
Edad	Mayores	Jóvenes
Tendencia de incidencia	Disminuyendo	Aumentando
Localización del tumor en cabeza y cuello	Cualquiera	Base de la lengua, amígdalas
Estadio	Cualquiera	Gran participación de N
Imagen radiológica	Cualquiera	Compromiso ganglionar quístico
Características histopatológicas	Queratinizado	Basaloide, no queratinizado
Diferenciación tumoral	Cualquiera	Indiferenciado
Alteraciones biológicas y genéticas:		
CDKN2A	Común	Raro
Sobreexpresión de p16 <sup>INK4a</sup>	Raro	Común
EGFR	Común (amplificación)	Raro
p53	Común	Raro (degradación de p53 por E6)
pRb	Raro	Raro (degradación de pRb por E7)
PIK3CA	Común	Común
TRAF3	Raro	Común
Resultados después de tratamiento	Peor SG y SLP	Mejor SG y SLP
Diseminación metastásica	Si	Raro
Comorbilidad	Si	No
Segundos tumores primarios	Si	No
Estrategias preventivas	Quitar el tabaco y alcohol	Vacunación

SG, sobrevida global.; SLP, supervivencia libre de progresión.  
Tomada y modificada de Taberna, et al., 2017.

### ***1.12 Respuesta a radioterapia***

La radioterapia es un componente crítico en el manejo locoregional del cáncer y se utiliza en alrededor del 50% de los pacientes que padecen esta enfermedad (Hoskin *et al.*, 2006). Se ha demostrado que los pacientes OPSCC relacionados a la presencia del VPH son más radiosensibles que los no relacionados (Lassen *et al.*, 2011 y Kimple *et al.*, 2013). La radiosensibilidad podría verse influenciada por varios factores asociados con las características moleculares de los tumores positivos a VPH. Por ejemplo, la señalización de apoptosis después de la radiación es mayor en el OPSCC VPH+, probablemente debido a la activación de una fracción basal de p53 de tipo nativa, que no está presente en los tumores negativos al VPH que muestran mutaciones somáticas de p53 (Kimple *et al.*, 2013). Como resultado de la activación alterada de los mecanismos de reparación de recombinación homóloga del DNA y no homóloga, las células positivas para el VPH no resuelven las rupturas de doble cadena inducidas por la radiación, aumentando su radiosensibilidad intrínseca (Rieckmann *et al.*, 2013 y Weaver *et al.*, 2015).

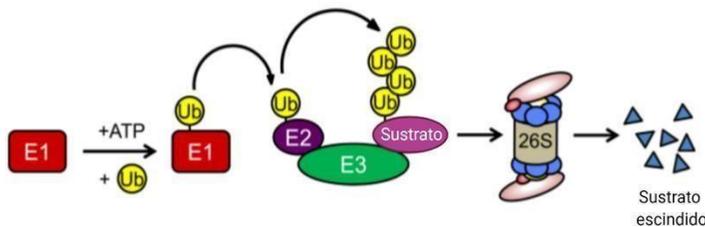
Las diferencias en el microambiente tumoral también pueden tener un impacto importante en la respuesta a la radiación. En este sentido, la señalización inducida por hipoxia, que confiere radorresistencia en el OPSCC no relacionado con el VPH, es menor en los casos positivos al VPH (Hanns *et al.*, 2015). Aunque la activación de E6 y E7 se encuentra asociada con la activación de mecanismos para evadir la respuesta del sistema inmune, la infiltración inmune es mayor en los tumores positivos al VPH que en los negativos al mismo y esto podría estar asociado con una mayor respuesta a la radioterapia (Saber *et al.*, 2016).

Las decisiones de tratamiento con RT se basan en factores clínicos, indicadores patológicos, extensión de la cirugía y/o elección médico-paciente, en lugar de perfiles moleculares tumorales predictivos de recurrencia y probable sensibilidad a la RT. Como resultado, algunos los pacientes son tratados con RT, aunque sus tumores son relativamente resistentes y es poco probable que estos pacientes obtengan beneficios terapéuticos. Esto representa un tratamiento excesivo en términos de recursos y contribuye a la morbilidad inducida por el tratamiento (Clarke *et al.*, 2005). La existencia de biomarcadores indicativos de la probable respuesta a RT permitiría asignar las terapias de una manera más eficaz. Dentro de los diferentes candidatos a biomarcadores estudiados, se encuentra el proteasoma 26S, el cual es un complejo macromolecular encargado de la degradación de la mayoría de las proteínas

celulares que ha sido asociado con la evolución de pacientes con cáncer después de recibir en dos estudios independientes, posicionándolo como un biomarcador predictivo de interés. Además, por sí mismo es un objetivo para la terapéutica del cáncer.

### 1.13 Sistema ubiquitina-proteasoma y cáncer

El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) es responsable de la degradación de alrededor del 80% de las proteínas en las células eucariotas (Craiu A. *et al.*, 1997), en donde el proteasoma 26S es el elemento central de la proteostasis, el cual es importante para la degradación de factores proteicos en múltiples vías celulares desempeñando un papel fundamental en la estabilidad celular (Bernat *et al.*, 2019). La degradación de una proteína por el UPS es típicamente mediada por la unión covalente dependiente de energía, de una cadena que consta de varias moléculas de ubiquitina (Ub) a una o más lisinas dentro de la estructura de la proteína blanco mediante la acción concertada de tres enzimas, E1, E2 y E3. Posteriormente, la proteína poliubiquitinada es reconocida por una proteasa multicatalítica denominada proteasoma 26S, quien la degrada.



**Figura 9. Sistema Ubiquitina Proteasoma.** A través de la acción secuencial de las enzimas E1, E2 y E3, una proteína a degradar se modifica con una cadena de poliubiquitina que sirve como señal de destrucción para el proteasoma 26S, el cual se encarga de degradar dicha proteína.

#### 1.13.1 Ubiquitina

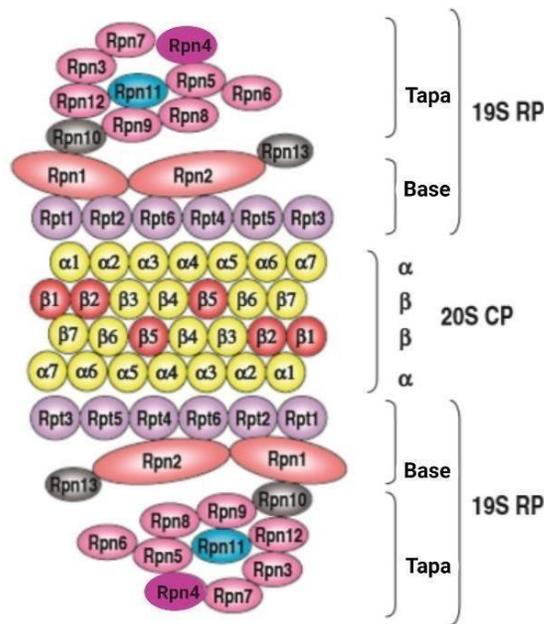
La Ub es una proteína pequeña de sólo 76 aminoácidos (8 kDa) la cual se encuentra presente y muy conservada en todos los eucariontes en los que hasta ahora se ha buscado (Goldstein *et al.*, 1975). Cada residuo de Ub tiene la capacidad de formar un enlace isopeptídico con otra Ub en el cual la glicina del extremo carboxilo se une covalentemente con una lisina de otra molécula de Ub. Como la molécula de Ub tiene 7 lisinas (posiciones 6, 11, 27, 29, 33 48 y 63), las cadenas de Ub pueden adoptar diferentes topologías dependiendo de la unión de la glicina a cualquiera de las 7 lisinas (Woelk *et al.*, 2007). La topología de la cadena de poliubiquitina determinará el destino de la proteína blanco. Por ejemplo, cadenas conectadas a través de lisina 48 marcan proteínas que serán degradadas en el proteasoma 26S y las marcadas en la lisina 63 son dirigidas a procesos de endocitosis (Mukhopadhyay *et al.*, 2007).

Para el caso de las proteínas que serán degradadas en el proteasoma, al menos 4 moléculas de Ub son necesarias para su reconocimiento por éste (Deveraux *et al.*, 1994). La Ub es unida al grupo  $-NH_2$  de una lisina interna de la proteína blanco en una cascada de conjugación que ocurre en tres pasos sucesivos (figura 9). La Ub es primero activada en una reacción dependiente de ATP por la enzima activadora de Ub o E1. Una cisteína catalítica en E1 es usada para formar un intermediado Ub-S-E1 con un enlace tioéster de alta energía entre la cisteína y el grupo carboxilo de la glicina del C-terminal de la Ub. Mediante una reacción de trans-esterificación el complejo Ub-S-E1 transfiere la Ub a la cisteína del sitio activo de la enzima conjugadora de Ub, también llamada E2, formando un complejo E2-S-Ub. Finalmente, E2-S-Ub transfiere la Ub a la proteína sustrato (S) en una reacción facilitada por la ligasa de Ub o E3 (Kornitzer *et al.*, 2005). Esta cascada de conjugación de Ub puede entonces repetirse múltiples veces hasta formar una cadena de poli-Ub para que la proteína blanco pueda ser reconocida por el proteasoma 26S.

### ***1.13.2 Proteasoma 26S***

El proteasoma 26S tiene una configuración estructural que confina los sitios activos proteolíticos en una ubicación inalcanzable para proteínas nativas y funcionales, evitando así la degradación inespecífica y descontrolada (Bernat *et al.*, 2019). Este complejo macromolecular de 2.6 MDa, consiste de una unidad catalítica central (CP o 20S) en forma de barril de 28 subunidades cuyos sitios activos proteolíticos se encuentran en el interior de esta partícula central y por 1 o 2 partículas regulatorias que comprende al menos 19 subunidades (RP o 19S) posicionándose en uno o ambos extremos de la CP (revisado por Tomko *et al.* 2013 y Finley *et al.*, 2016, figura 10). La partícula reguladora tiene el importante papel de recibir, eliminar la etiqueta poliUb, desdoblar y translocar los sustratos hacia la CP (Wehmer *et al.*, 2017).

Los proteasomas se distribuyen por toda la célula, se detectan en el citoplasma y en el núcleo, y muestran *hotspots* en distintas regiones intracelulares o sitios específicos con alto metabolismo proteico o con requisitos específicos de degradación de proteínas (Bernat *et al.*, 2019).



**Figura 10. Composición del proteasoma 26S.** El proteasoma está formado por dos partículas reguladoras colindantes con una partícula central de forma cilíndrica. La partícula central está formada por dos anillos  $\alpha$  y dos anillos  $\beta$ . La partícula reguladora consta de una base y una tapa. Rpn10 está en la interfaz entre estos complejos (se muestra en gris). La tapa (rosa) contiene las subunidades indicadas, de las cuales aún no se comprende bien su función, con la excepción de la subunidad Rpn11, que funciona como una enzima des-ubiquitinante. La base contiene un anillo formado por seis AAA-ATPasas, Rpt1–6 (anillo lila) y las subunidades Rpn1, Rpn2 y Rpn13. La partícula central contiene 2 estructuras de anillo heteroméricas, cada uno presente dos veces. El anillo  $\alpha$  y  $\beta$  están formados por siete subunidades. Las subunidades  $\beta$  en color rojo indican los sitios con actividad proteasa.

### 1.13.3 Partícula central

La CP es una estructura con forma de barril compuesta por cuatro anillos heptaméricos apilados que forman una cámara proteolítica. Los anillos externos están formados por las subunidades  $\alpha$  y los centrales por las subunidades  $\beta$  (Roos-Mattjus, P. *et al.*, 2004 y Kurepa, J. *et al.*, 2008). La unión de los cuatro anillos forma una cavidad central en la cual tres de las subunidades  $\beta$  presentan actividad proteolítica:  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$  (Kurepa, J. *et al.*, 2008). Las subunidades  $\alpha$  están encargadas de controlar la entrada de la proteína blanco en la cavidad proteolítica y de regular las interacciones entre la CP y la RP. Para la degradación de los sustratos ubiquitinados se necesita que la RP esté unida a la CP.

### 1.13.4 Partícula regulatoria

La RP a su vez, está formada por la base y la tapa. La base está conformada por 9 subunidades, 6 de ellas con actividad de ATPasa (Rpt1-Rpt6), con una función parecida a la de las chaperonas de desdoblamiento a las proteínas que serán degradadas y 3 sin actividad de ATPasa (Rpn1, Rpn2 y Rpn10). Las ATPasas forman un anillo hexagonal, común en este tipo de enzimas, que está en contacto con las subunidades  $\alpha$  de la partícula central.

Por su parte, la tapa está constituida por 12 subunidades sin actividad de ATPasa (Rpn3-9,11-12) con una forma parecida a un disco que puede separarse y unirse al resto de la partícula, que interaccionan con las subunidades  $\alpha$  de la CP y funcionan abriendo la cavidad central e introduciendo los sustratos en está (Roos-Mattjus, P. *et al.*, 2004 y Book, A.J. *et al.*, 2010). La RP realiza además las funciones de reconocer la cadena de poliubiquitina y unir selectivamente a las proteínas a degradar y de remover las cadenas de Ub con su actividad de desubiquitinasa (Roos-Mattjus, P. *et al.*, 2004).

### ***1.13.5 Proteólisis***

La proteína sustrato debe tener al menos cuatro ubiquitinas unidas para ser reconocida. La subunidad Rpn10 se asocia con la poliubiquitina mientras las subunidades Rpn1-Rpn2 de la RP se unen a la proteína. Enzimas desubiquitinizantes separan las ubiquitinas y las subunidades con actividad de ATPasa, utilizando la energía del ATP, produciendo el desplegamiento de la proteína mientras la hacen pasar hacia la cámara interior de la partícula central mediante cambios de conformación de las subunidades  $\alpha$  que obstruyen la entrada. A medida que la proteína va atravesando la cámara, se produce la hidrólisis de los enlaces peptídicos y los péptidos así formados son liberados a través de la RP. Los péptidos formados tienen una vida media muy corta, pues son atacados rápidamente por proteasas y aminopeptidasas. Cada proteasoma procesa solamente un sustrato a la vez (Hernandez R. *et al.*, 2013).

### ***1.14 Proteasoma 26S como biomarcador de respuesta a radioterapia***

Los trabajos en los que evalúan la respuesta a RT en cáncer, se han centrado en la expresión de la subunidad p32 de la partícula central 20S del proteasoma. Desafortunadamente, el gen que codifica esta subunidad y por lo tanto su función molecular exacta aun no es clara. Sin embargo, la evidencia indica que la baja expresión de p32 en tumores se asocia significativamente con un aumento en la recurrencia local en pacientes con cáncer de laringe que fueron tratados con RT con intención curativa (Smith L. *et al.*, 2009). De manera similar, la baja expresión de p32 se asoció significativamente con un aumento de las recurrencias locales en una pequeña cohorte de pacientes con cáncer de mama que fueron tratadas con RT adyuvante (Elfadl D. *et al.*, 2011). Por otra parte, el estudio realizado por Langlands en 2014

encontró que la baja expresión de PSMD9, una subunidad de la RP del proteasoma 26S, se asoció a baja recurrencia locoregional después de recibir RT en tumores mamarios (Langlands *et al.*, 2014).

#### ***1.14.1 Proteasoma 26S y VPH***

Se ha determinado que los tumores de orofaringe positivos al VPH poseen una mejor tasa de respuesta a tratamiento basado en radiación sin que a la fecha se conozcan los mecanismos implicados en la respuesta a tratamiento inducida por el VPH (Ang *et al.*, 2010).

Es bien sabido que la regulación de proteínas celulares por parte del VPH involucra una serie de interacciones mediadas por la presencia del motivo LXXLL y el dominio PDZ en proteínas celulares clave, impactando en procesos como proliferación, diferenciación, adhesión y motilidad celular (Manzo-Merino *et al.*, 2013). Por otra parte, las proteínas celulares que gobiernan funciones importantes, como la transducción de señales, el control del ciclo celular, la regulación transcripcional y la apoptosis, son sustratos del proteasoma 26S y gracias a que se ha demostrado su valor predictivo en respuesta a RT en diferentes tipos de cáncer, resulta de gran importancia evaluar su valor predictivo en CaOF y su posible modulación por parte de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH. Para dicho propósito nos enfocamos en la subunidad PSMD9, la cual forma parte de la RP del proteasoma 26S.

#### ***1.14.2 PSMD9***

PSMD9 (subunidad reguladora 9 del proteasoma 26S no ATPasa; también conocida como bridge-1, SEM1, p27 o Rpn4) es una proteína de 25 KDa codificada por el gen PSMD9 en el cromosoma 12q24.31-q24.32. PSMD9, se expresa de forma ubicua en todos los tipos de células en mamíferos y parece estar en niveles particularmente altos en los tejidos de la epidermis linfática, endocrina, renal y cutánea (Uhlen M. *et al.*, 2010).

PSMD9 se caracterizó por primera vez a través de su interacción con las chaperonas proteasómicas PSMC6 y PSMC3, con las que forma un complejo que modula el ensamblaje del proteasoma 26S a partir de las subunidades 20S y 19S. Además de este papel en el proteasoma, también se sabe que PSMD9 tiene un papel independiente como corregulador transcripcional. PSMD9 regula la expresión génica de genes diana específicos mediante la

unión de su dominio PDZ a los factores de transcripción PDX-1, E12 y E47 (Stanojevic V. *et al.*, 2005 y Thomas MK. *et al.*, 1999).

A la fecha, aún no se ha obtenido la estructura tridimensional completa de PSMD9, pero los análisis de su estructura secundaria han revelado la presencia de un dominio PDZ único, un dominio asociado con interacciones proteína-proteína específicas, y se asume que este dominio sustenta ambos roles funcionales. El impacto regulador de PSMD9 tanto en la actividad proteasomal como en la transcripción sigue sin estar claro.

Por otra parte, PSMD9 pertenece a un conjunto de proteínas que han mostrado ser blancos de interacción de la oncoproteína E6 del VPH (Tomaić 2013), además de que la presencia de un dominio PDZ en su estructura la hace susceptible a ser regulada por la oncoproteína E6 del VPH. Por lo que resulta importante conocer el efecto que las oncoproteínas del VPH podrían ejercer sobre PSMD9, así como la relación entre la presencia del VPH en los niveles de PSMD9 con el desenlace clínico de los pacientes con CaOF que recibieron radioterapia con el fin de proponer biomarcadores específicos y confiables que ayuden a pronosticar el desenlace de la enfermedad.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La prevalencia de la infección por VPH continúa siendo un problema de salud pública en nuestro país. Así mismo, la prevalencia e incidencia del CaOF se ha incrementado en los últimos años alrededor del mundo, principalmente en individuos del sexo masculino. Este tipo de cáncer presenta un pobre pronóstico, con una tasa de supervivencia a 5 años menor al 50% sin que existan factores pronósticos claros que definan el tiempo de sobrevida en esta neoplasia.

Diversos estudios señalan una mejor respuesta a tratamiento en los casos positivos al VPH sin que al momento se conozca el mecanismo que confiere esta sensibilidad. Sin embargo, la mera presencia del VPH no es un biomarcador informativo para la predicción de la respuesta a tratamiento por lo que es necesario investigar proteínas celulares que puedan explicar el desenlace clínico en pacientes con CaOF positivos a VPH.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Existe una ferviente necesidad de identificar los mecanismos implicados en la respuesta a tratamiento mediada por el VPH en CaOF. La presente investigación proveerá información acerca del efecto que las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH16 ejercen sobre la sub-unidad 26S del proteasoma, así como determinar su potencial uso como biomarcador en este tipo de cáncer ayudando a entender la participación de esta sub-unidad en la sensibilidad a radioterapia.

### **4. HIPÓTESIS**

Las oncoproteínas E6 y E7 del VPH disminuyen los niveles de PSMD9 y esta disminución está asociada a una mayor sensibilidad al tratamiento basado en radio terapia en pacientes con cáncer de orofaringe.

### **5. OBJETIVOS**

#### *5.1 Objetivo general*

Determinar el efecto de las oncoproteínas del VPH sobre los niveles de PSMD9 y su asociación con la respuesta a radio-terapia en pacientes con cáncer de orofaringe.

#### *5.2 Objetivos específicos*

En una línea celular inmortalizada:

1. Determinar el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 sobre los niveles de PSMD9.

Empleando los archivos clínicos del servicio de patología del Instituto Nacional de Cancerología:

2. Generar una base con los datos demográficos, clínicos y patológicos de pacientes con OPSCC.
3. Determinar la prevalencia y tipo de VPH mediante PCR.
4. Determinar el grado de expresión de PSMD9 mediante inmunohistoquímica.
5. Determinar la asociación de la presencia de VPH y el estatus de expresión de PSMD9 con el desenlace clínico de los pacientes mediante análisis estadístico.

## 7. METODOLOGÍA

### *7.1 Diseño de la investigación*

*Tipo de estudio:* El proyecto consta de dos fases: retrolectivo/descriptivo e *In vitro*

*Universo del estudio:* Pacientes con diagnóstico histológico de cáncer de orofaringe que acudieron al INCAN entre los años 2000 a 2015.

*Sede y lugar del estudio:* Laboratorio de Agentes Biológicos Infecciosos y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología.

*Criterios de inclusión:*

- Expediente pertenezca a un paciente con diagnóstico histopatológico de Cáncer de Orofaringe
- Vírgenes al tratamiento
- Pacientes que completen el tratamiento primario
- Se haya evaluado respuesta a tratamiento
- Tratamiento administrado con fines curativos
- Historia clínica completa

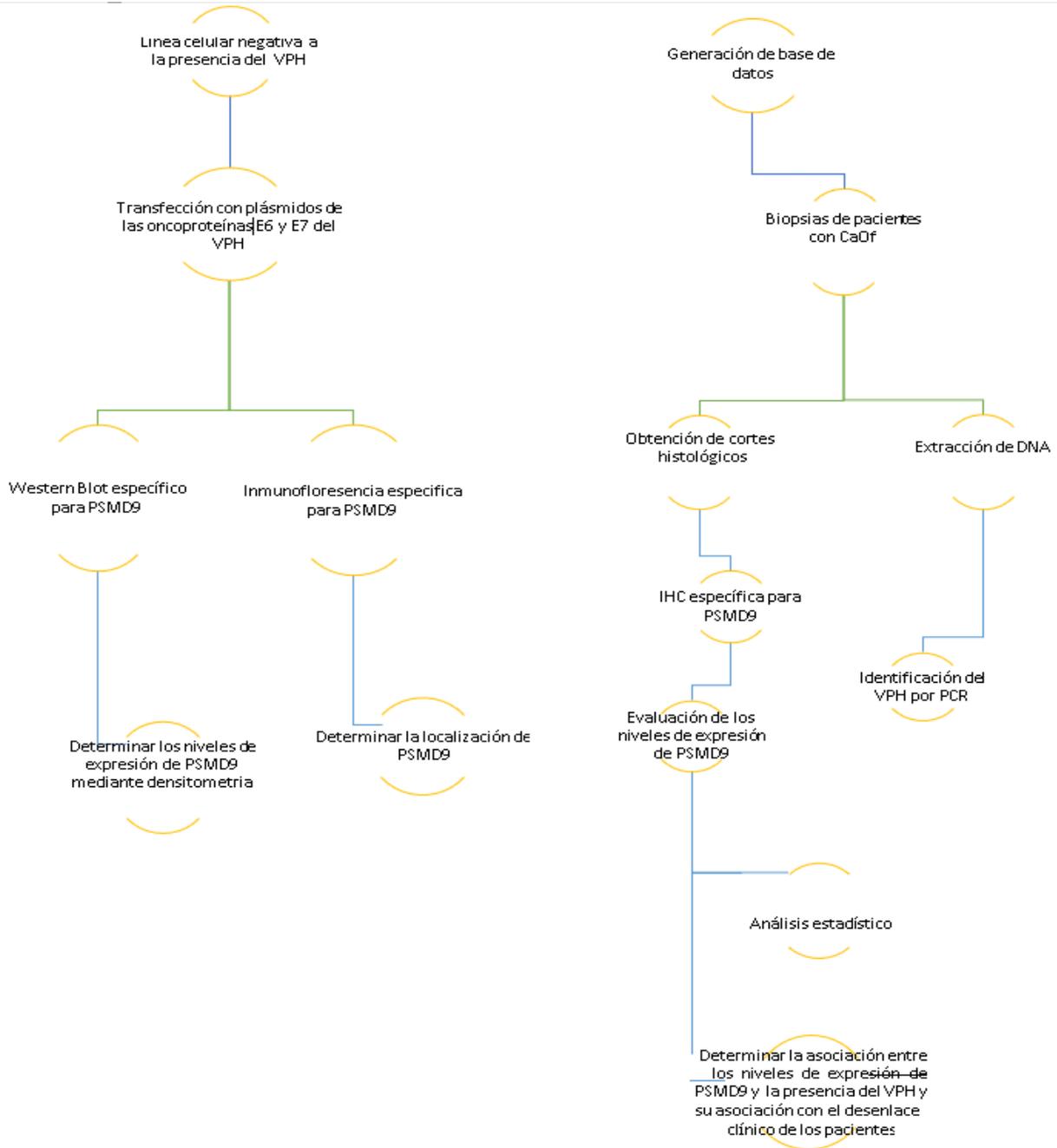
*Criterios de exclusión:*

- Datos incompletos
- Sin existencia de bloque de parafina
- Pacientes que no completaron el tratamiento primario
- Pacientes metastásicos

*Criterios de eliminación:* Muestra con material y calidad insuficiente (DNA sin integridad).

*Recursos financieros:* los insumos necesarios para este estudio fueron provistos por el Instituto Nacional de Cancerología y el CONACyT a través del PRONAI-7-virus y cáncer, número de referencia: 303044.

## 7.2 Diagrama de trabajo



## 7.3 Metodología

### 7.3.1 Modelos celulares

Se emplearon 2 modelos celulares en este trabajo, en primer lugar, la línea celular inmortalizada HaCaT (Human Keratinocytes Cells). Las células HaCaT fueron mantenidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% (DMEM +/-) e incubadas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>. Por otro lado, también se utilizó la línea celular C33A con expresión estable de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH y del vector vacío p3X. Esta línea celular fue proporcionada por el laboratorio de la Dra. Marcela Lizano Soberón del Instituto Nacional de Cancerología, la cual fue mantenida en medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) suplementado con SFB al 10% y al 2% de geneticina (EMEM +/+) incubadas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>.

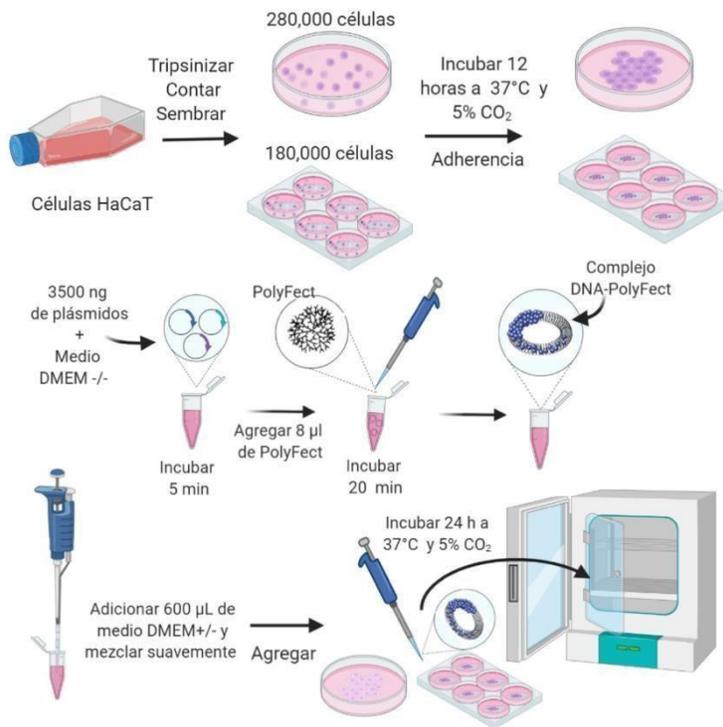
### 7.3.2 Transfección

Para determinar el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 sobre los niveles de PSMD9, se realizó la transfección transitoria (el DNA introducido no se integra al genoma de la célula) en células HaCaT con plásmidos que contienen los genes que codifican para dichas oncoproteínas. Para ello, una vez que se obtuvo la cantidad necesaria de células, estas se tripsinizaron, contaron y sembraron 280,000 por cada placa p60 en un volumen final de 2 mL de medio DMEM +/- para los ensayos de Western Blot (WB). Para los ensayos de Inmunofluorescencia (IF) se sembraron 180,000 células en placas de 6 pozos con un cubreobjetos en el fondo de cada pozo en un volumen final de 2 mL de medio DMEM +/-, tanto las placas p60 como las placas de 6 pozos se dejaron adherir por 12 horas antes de iniciar la transfección (figura 11).

Después de la adherencia de las células, se colocaron 100 µL de medio DMEM -/- (sin suplementar con SFB) en tubos *ependorf* de 1.5 mL, a cada tubo se le agregaron 3500 ng de los plásmidos correspondientes (pCA, pcDNA16E6HA y pcDNA16E7HA), los cuales contienen los genes que codifican para las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 unidos a la etiqueta hemaglutinina (HA). El vector vacío, sin los *ORFs* correspondientes fue empleado como control de la técnica. Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación a cada tubo se le agregaron 8 µL de PolyFect (QIAGEN) y se dejó incubar por 20 minutos. Durante el tiempo de incubación se cambió el medio a las

células sembradas en las placas p60 y placas de 6 pozos agregando 1.5 mL de medio DMEM +/-.

Pasados los 20 minutos de incubación, se agregaron 600 µL de medio DMEM +/- a los tubos *ependorf* que contenían los plásmidos y la PolyFect mezclando suavemente. Esta mezcla se agregó a la caja p60 o pozo correspondiente cuidando no tocar el fondo. Por último, las cajas p60 y placas de 6 pozos se dejaron incubar por 24 horas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub> (figura 11). Transcurridas las 24 horas de la transfección, las células se lisaron para obtener las proteínas totales y así ser evaluadas mediante la técnica de WB. Para los ensayos de IF, transcurridas las 24 horas las células contenidas en las placas de 6 pozos se fijaron, realizando el protocolo que se describe en el apartado de IF (figura 12b).

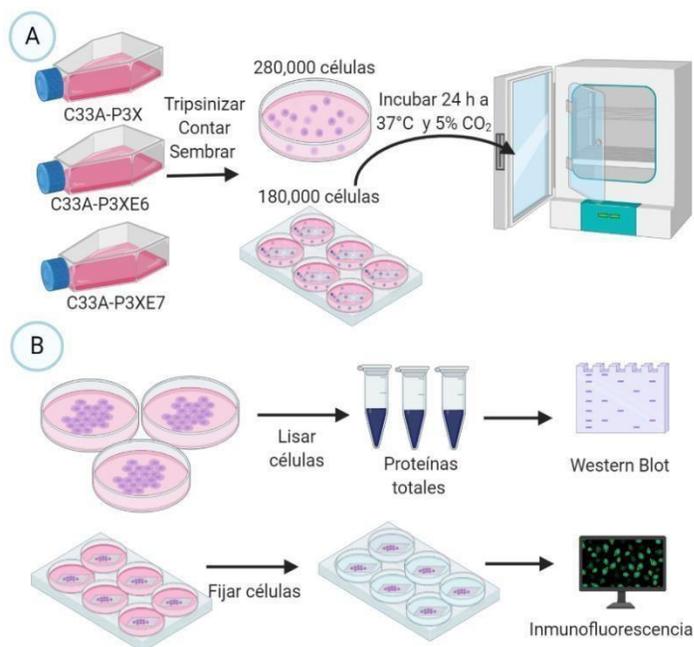


**Figura 11. Esquema de la transfección transitoria de la línea celular HaCaT.**

La transfección es un proceso mediante el cual material genético exógeno es introducido a una célula eucariota. La polyfect es un reactivo que consiste en moléculas de dendrímeros activados de arquitectura esférica definida, con ramas que irradian desde un núcleo central. Las ramas terminan en grupos amino cargados, que pueden interactuar con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos. La polyfect ensambla el DNA en estructuras compactas, que se unen a la superficie celular y se introduce en la célula mediante endocitosis inespecífica. La polyfect se agrega a la solución de DNA y se incuba por 20 min, se agrega medio de cultivo y por último se adiciona a las células.

Las células C33A, con expresión estable del vector vacío p3X y de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16, se sembraron en placas p60 a una densidad de 280,000 células en un volumen final de 2 mL de medio EMEM ++ para los ensayos de WB. Para los ensayos de IF se sembraron 180,000 células en placas de 6 pozos con un cubreobjetos en el fondo de cada pozo en un volumen final de 2 mL de medio EMEM ++, tanto las placas p60 como las placas de 6 pozos se incubaron durante 24 horas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurridas las 24 horas de incubación las células se lisaron para obtener las proteínas totales y así ser evaluadas mediante la técnica de WB. Para los ensayos de IF, transcurridas las 24 horas las células contenidas en las placas de 6 pozos se fijaron, realizando el protocolo descrito en la sección de IF.



**Figura 12. Representación esquemática del manejo de la línea celular C33A con expresión estable del vector p3X y las oncoproteínas E6 y E7 del VPH.** Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 80%, las células se tripsinizaron, contaron y sembraron para los diferentes ensayos. En placas p60 se sembraron 280,000 células y en las placas de 6 pozos se sembraron 180,000 células. Posteriormente, las placas respectivas fueron incubadas durante 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, las células de las placas p60 se lisaron para obtener las proteínas totales, para posterior análisis mediante WB. Las células en las placas de 6 pozos se fijaron para su posterior análisis mediante inmunofluorescencia.

### 7.3.3 Western blot

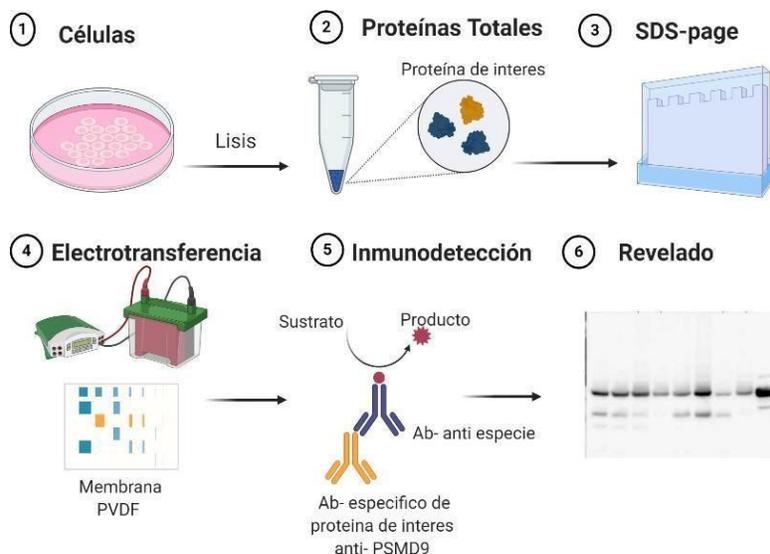
Las proteínas totales contenidas en los lisados celulares fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE). Posteriormente, fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro 0.20  $\mu$ m, utilizando una solución 25 mM Tris, 190 mM glicina y 20% de metanol aplicando un voltaje constante de 25 mV por 1:30 horas. Luego del tiempo necesario de electrotransferencia, la membrana se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de TBS-T (Tris Buffer Saline with Tween<sup>®</sup>: Tris 20mM, NaCl 137 mM, 0,1 % Tween-20, pH 7,6)/7% de BSA (Bovine serum albumin). Posteriormente la membrana se incubó con el correspondiente anticuerpo primario en la dilución determinada en TBS-T (Tabla 2) durante toda la noche a 4°C o durante 2 h a temperatura ambiente. Para identificar a la proteína de interés se utilizó el anticuerpo anti-PSMD9, como control de carga se utilizó el

anticuerpo dirigido a  $\alpha$ -tubulina y para verificar la correcta transfección de las líneas celulares se utilizó el anticuerpo anti-HA.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en los ensayos de Wester Blot.

Anticuerpo	Especie	Dilución
Anti- PSMD9 (Sigma-Aldrich HPA-40512)	Conejo	1:500
HA (Santa Cruz sc-805)	Ratón	1:1000
$\alpha$ - tubulina (Abcam ab7291)	Ratón	1:15000

Luego de la incubación, la membrana se lavó sucesivamente con TBS-T (3 lavados de 10 minutos), para luego incubarla con el anticuerpo secundario conjugado a la enzima HRP (peroxidasa de rábano) contra IgG de la especie del anticuerpo primario. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces durante 10 min con TBS-T. Para finalmente proceder al revelado. La proteína de interés se identificó mediante la reacción de quimioluminiscencia empleando los reactivos de Immobilon Western (Chemiluminiscent HRP Substrate Millipore). En cuarto oscuro, la membrana fue entonces expuesta a una placa fotográfica durante tiempos variables y los resultados se obtuvieron al revelarlas. Para el análisis de datos, las bandas obtenidas se cuantificaron mediante el programa “ImageJ” (Figura 13).

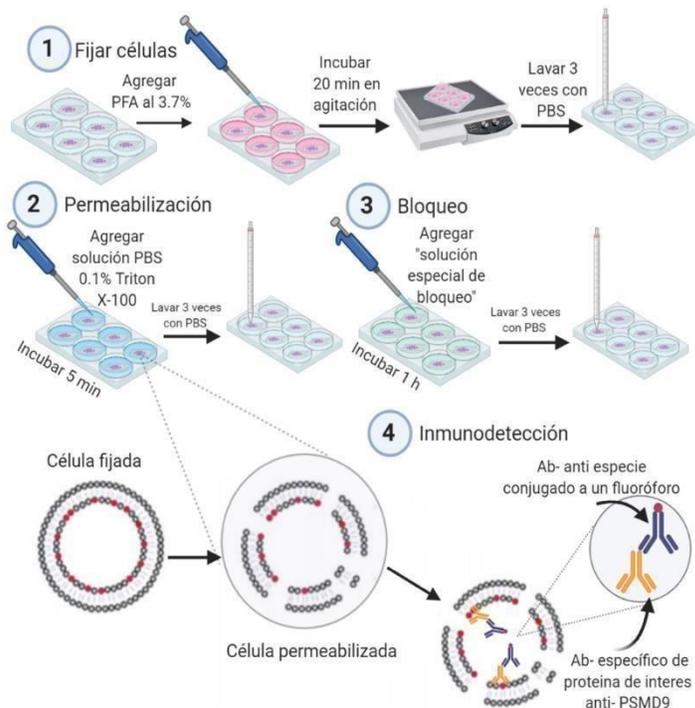


**Figura 13. Representación esquemática de la técnica de WB.** En primer lugar, las células a analizar se lisan para obtener las proteínas totales y posteriormente estas se separan mediante electroforesis por peso molecular en un gel de poliacrilamida. Las proteínas separadas se transfieren del gel a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incuba con un anticuerpo específico a la proteína de estudio. Por último, la unión del anticuerpo se detecta a través de una reacción de quimioluminiscencia.

#### **7.3.4 Inmunofluorescencia**

La inmunofluorescencia es una técnica que permite detectar y localizar antígenos específicos en células o tejidos mediante anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente. Una variante de esta es la inmunofluorescencia indirecta (IFI), en ella solo los anticuerpos secundarios se encuentran conjugados al compuesto fluorescente y al ser expuestos a energía luminosa en una longitud de onda adecuada emiten fluorescencia dando paso a su detección y su posterior cuantificación (Im et al., 2019). Una vez que se cumplieron los tiempos de incubación, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) en PBS al 3.7%. y lavadas tres veces con PBS Posteriormente, las células fueron permeabilizadas utilizando una solución de PBS al 0.1% de Tritón X-100 para cubrir los cubreobjetos y se incubo por 5 minutos. Después las células se lavaron 3 veces con PBS. Luego, los cubreobjetos se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con una solución de PBS/Tween 0.1%/1% BSA para saturar lugares inespecíficos de unión. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron con PBS 3 veces.

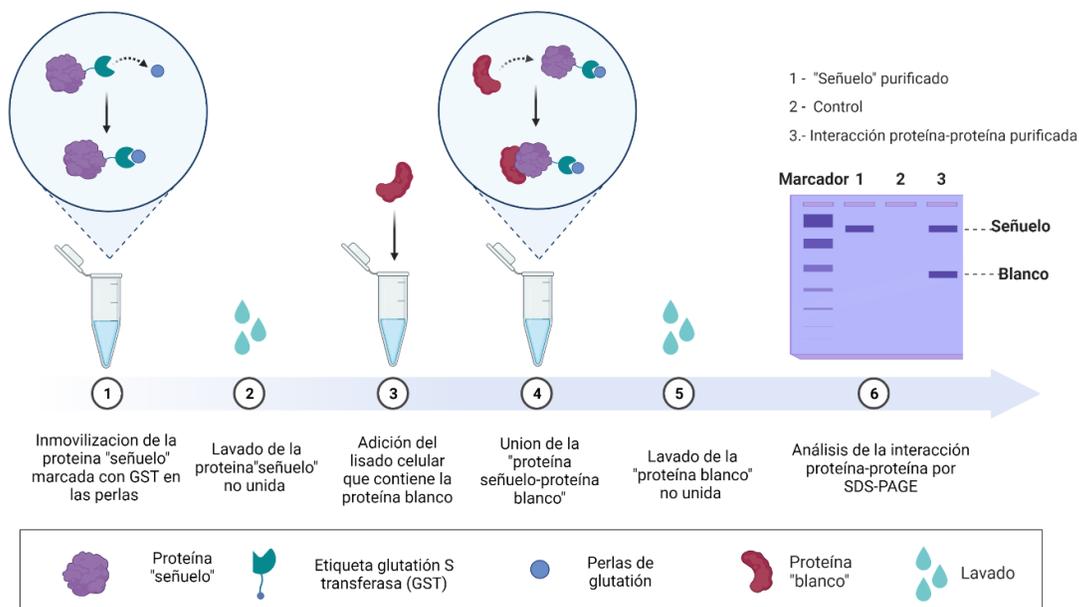
Finalmente, los cubreobjetos se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios anti-PSMD9 (ThermoFisher, cat: PA5-60652) y HA (ROCHE) para verificar la correcta expresión de E6 y E7, en una dilución 1:50 durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. (Roche). Al día siguiente, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS, para retirar el anticuerpo excedente. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario unido al fluoróforo Alexa 488 o Alexa 555. Se incubó a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 2 horas. Después los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS y 3 veces con agua destilada. Por último, se realizó el montaje de las laminillas con medio Vectashield (Cat. H-1200 Vector Laboratories®) que contiene 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), compuesto con alta afinidad por el DNA de modo que se intercala y facilita la localización de los núcleos celulares (Figura 14).



**Figura 14. Representación esquemática de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta.** El protocolo inicia fijando las células con PFA al 3.7% e incubándolas durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente las células se permeabilizan con tritón al 0.1% para permitir el ingreso de los anticuerpos al interior de la célula. Paso seguido, las células se incuban con una solución concentrada de proteínas para evitar las interacciones inespecíficas. Por último, las células se incuban primero con el anticuerpo primario y después con el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo.

### 7.3.5 Pull Down

El ensayo *pull down* es un método *in vitro* que se utiliza para determinar si existe interacción física entre dos o más proteínas. Los ensayos pull-down son una forma de purificación por afinidad y son similares a la inmunoprecipitación, excepto que se usa una proteína "señuelo" en lugar de un anticuerpo. Se emplearon plásmidos que expresan las proteínas E6 del VPH16 fusionada a GST. El plásmido se transformó en bacterias *E.coli* DH5alpha y se procedió a su expresión utilizando isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) mediante sonicación y centrifugación. Una vez obtenido el sobrenadante, este se incubó con perlas de sefaroza cubiertas con glutatión, se lavaron y se comprobó la presencia y pureza de las proteínas de fusión GST mediante SDS-PAGE y tinción con azul Coomassie. Posteriormente, se obtuvo un lisado de proteínas solubles de la línea celular HaCaT que contiene a las proteínas "blanco" putativas, con cantidades iguales de proteínas GST purificadas. Por último, para determinar la interacción entre proteínas se realizó un WB (figura15).

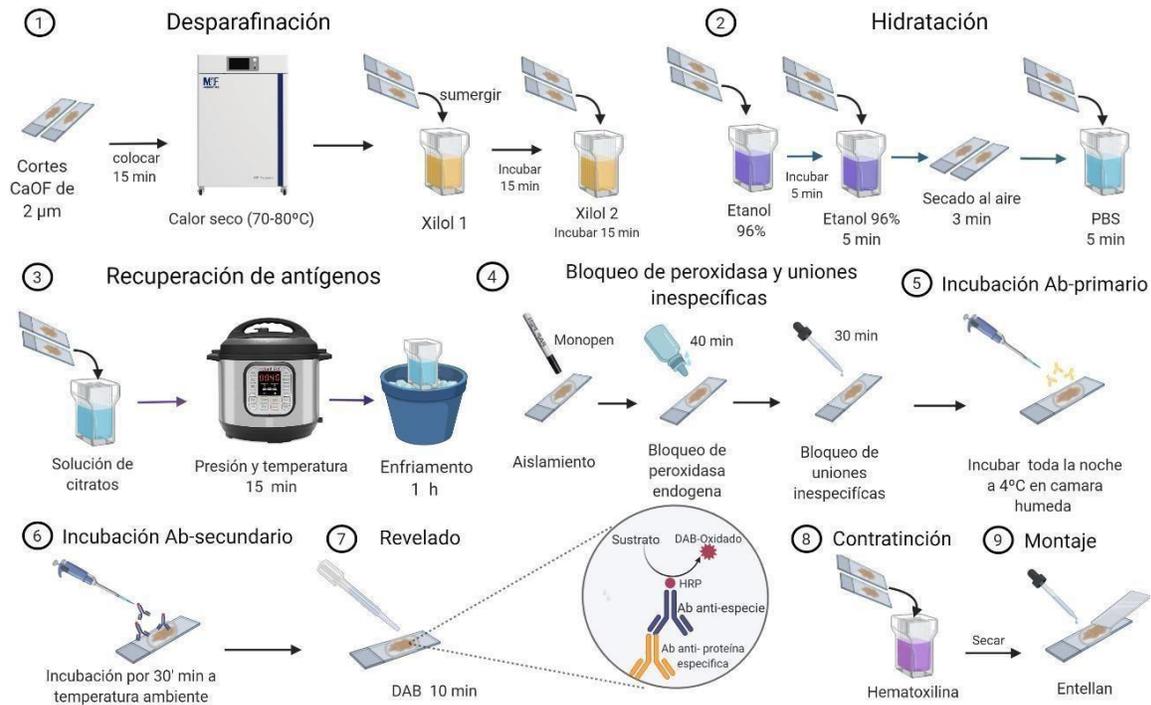


**Figura 15. Representación esquemática de la técnica de pull-down.** En primer lugar, se inmovilizó la proteína de fusión E6VPH16-GST en las perlas de Safarosa-Glutatión, posteriormente se realizó un lavado para eliminar toda la proteína señuelo no unida a las perlas de Safarosa-Glutatión. Después se adicionó extracto celular de células HaCaT que contiene PSMD9 y se dejó interactuar, paso seguido se realizó un lavado para eliminar toda la proteína de PSMD9 que no interactuó con la proteína de fusión 16E6-GST. Por último, se realizó un análisis de la interacción proteína-proteína por SDS-PAGE e inmunoblot.

### 7.3.6 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ) consiste en la identificación *in situ* de antígenos celulares o tisulares mediante anticuerpos marcados que permite visualizar la distribución y localización de proteínas específicas. Para evaluar la expresión de PSMD9 se utilizó la técnica de IHQ indirecta enzimática, en la cual se emplea en un primer paso un anticuerpo específico no marcado dirigido a la proteína de interés (anticuerpo primario) y en una segunda fase un anticuerpo acoplado a la enzima HRP (del inglés, horse radish peroxidase) (anticuerpo secundario), que reacciona de forma específica con el anticuerpo primario. Seguido del revelado mediante una reacción enzimática que produce un precipitado de color el cual permite visualizar y localizar el complejo antígeno-anticuerpo. Para este trabajo se utilizó el anticuerpo primario policlonal anti-PSMD9 (Sigma-Aldrich HPA-40512), un anticuerpo secundario anti-rabbit (BioSB) y un sistema de detección comercial "mouse/rabbit PolyDetector DAB HRP Brown" (BioSB # BSB0205), el cual consiste en una solución bloqueadora de peroxidasa, inmunoglobulina anti-mouse/rabbit conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP), solución buffer para DAB y una solución

cromógena DAB. A partir de biopsias de CaOF embebidas en parafina, se obtuvieron cortes histológicos de 2µm de grosor, los cuales se colocaron en calor seco a 80°C durante 15 min para eliminar los restos de parafina se sumergieron en xilol. Posteriormente el tejido se hidrató con 2 lavados consecutivos de etanol al 96%. Después, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena y se bloquearon los potenciales sitios inespecíficos con una solución concentrada de proteínas. Para la inmunodetección, las laminillas se incubaron con el anticuerpo primario y después con el anticuerpo secundario. Paso seguido, se reveló la interacción antígeno-anticuerpo mediante una reacción inmunoenzimática, en la cual se incubó 10 min con DAB. Por último, se realizó la contratinción con hematoxilina y el montaje de las laminillas con entellan. Los pasos generales se esquematizan en la figura 16.



**Figura 16. Protocolo de Inmunohistoquímica.** A partir de biopsias de CaOF embebidas en parafina, se obtuvieron cortes histológicos de 2µm de grosor, los cuales se colocaron en calor seco a 80°C durante 15 min, para eliminar los restos de parafina se sumergieron en xilol. Posteriormente el tejido se hidrató con 2 lavados consecutivos de etanol al 96%. Después, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena y se bloquearon los potenciales sitios inespecíficos con una solución concentrada de proteínas. Para la inmunodetección, las laminillas se incubaron con el anticuerpo primario y después con el anticuerpo secundario. Paso seguido, se reveló la interacción antígeno-anticuerpo mediante una reacción inmunoenzimática, en la cual se incubó 10 min con DAB. Por último, se realizó la contratinción con hematoxilina y el montaje de las laminillas con entellan.

### ***7.3.7 Evaluación de los niveles de expresión de PSMD9 en biopsias de CaOF***

La evaluación de los niveles de expresión de PSMD9 se realizó gracias a la colaboración de uno de los patólogos expertos del departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología. Las laminillas fueron evaluadas por el Dr. Saúl Lino Silva. La expresión de PSMD9 se graduó de 0 a 3 cruces siendo tres cruces una expresión alta, 2 cruces una expresión intermedia, 1 cruz una expresión baja y 0 cruces como negativo.

### ***7.3.8 Generación de base de datos***

Se revisaron los expedientes electrónicos de los pacientes que acudieron al servicio de cabeza y cuello del Instituto Nacional de Cancerología entre el año 2000 al 2015, para generar una base de datos de pacientes con cáncer de orofaringe (origen de tumor: amígdalas, base de lengua). Los datos recolectados fueron: datos demográficos (edad, sexo y escolaridad), antecedentes a factores de riesgo (consumo de alcohol y tabaco), tipo de tratamiento recibido, tipo de respuesta y desarrollo de recurrencia, así como las respectivas fechas de cada evento. Solo los expedientes que contenían datos completos y con un diagnóstico histopatológico confirmado de CaOF fueron incluidos. Una vez terminada la base de datos, se solicitaron los bloques de parafina correspondientes a las biopsias de los pacientes que cumplieron con todos los criterios de inclusión previamente descritos al servicio de patología del Instituto Nacional de Cancerología. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de 2  $\mu\text{m}$  de grosor a partir de los bloques de parafina, para realizar la técnica de inmunohistoquímica (IHC) y evaluar el nivel de expresión de PSMD9. Adicionalmente se obtuvo una fracción del bloque de parafina para realizar la extracción del DNA y posterior identificación de la presencia del VPH.

### ***7.3.9 Extracción de DNA***

#### ***Tratamiento previo para tejido embebido en parafina***

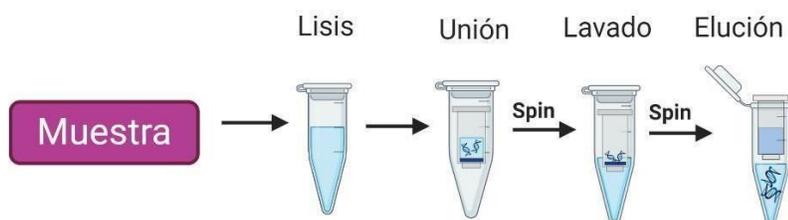
Las muestras que se utilizaron en este proyecto son biopsias de tumores de orofaringe embebidos en parafina, por lo cual antes de iniciar el proceso de extracción de DNA fue necesaria la eliminación de la parafina por extracción con xileno. Para ello se colocó una sección pequeña del tejido incluido en parafina en un microtubo y se adicionaron 1200  $\mu\text{L}$  de xilol. Después, los tubos se colocaron en un baño seco (heating block) a 65 °C y se agitaron vigorosamente durante 15 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a velocidad máxima

por 5 min y se removió el sobrenadante por pipeteo teniendo cuidado de no tocar el botón. Para remover el xilol residual, se realizó un lavado con 1200 µL de etanol (96–100%) y se mezcló suavemente. Después, los tubos se centrifugaron a velocidad máxima por 5 min y se removió el sobrenadante por pipeteo teniendo cuidado de no tocar el botón, este último paso se repitió una vez más. Por último, el microtubo se incubó con la tapa abierta a 37°C por 15 min hasta que el etanol se evaporó por completo.

### *Purificación de DNA*

La extracción de DNA de las muestras se realizó utilizando el kit comercial “DNeasy Blood & Tissue Kit” (QIAGEN cat. No. 69506) siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Figura 17). El fundamento de este kit comercial se basa en la membrana “DNeasy” la cual está hecha a base de sílices permitiendo que el DNA se adsorba en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas, que eliminan el agua de las moléculas hidratadas en solución para permitir una eliminación óptima de contaminantes e inhibidores de enzimas.

El DNA extraído de cada muestra se cuantificó para determinar el grado de pureza empleando el Espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®).



**Figura 17. Representación esquemática de la técnica de extracción de DNA.** En primer lugar, las muestras se lisan usando proteinasa K. El lisado del tejido se carga en la columna giratoria DNeasy Mini. Durante la centrifugación, el DNA se une selectivamente a la membrana DNeasy mientras que los contaminantes se van con el flujo. Los contaminantes restantes y los inhibidores de enzimas se eliminan en dos pasos de lavado eficientes. Por último, el ADN se eluye en agua o buffer AE, listo para su uso.

### **7.3.10 Detección de VPH**

Debido a la naturaleza del DNA extraído (proveniente de tejidos embebidos en parafina) la integridad de este ácido nucleico no es la óptima para realizar la identificación del VPH mediante la técnica de PCR tradicional por lo que se decidió utilizar el kit de detección para VPH: INNO-LiPA HPV Genotyping EXTRA (FUJIREBIO). El tamaño de fragmento que se

amplifica para la detección del VPH con INNO-Lipa es considerablemente más pequeño comparado con el que se amplifica con la técnica de PCR por lo que, aunque el material genético que se utiliza en la reacción no tenga la integridad óptima te permite realizar una detección confiable.

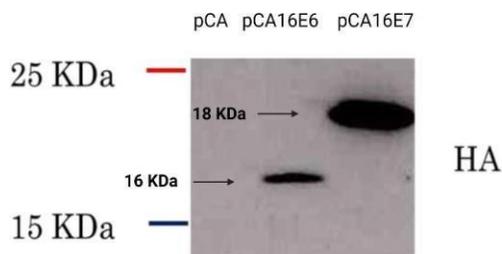
### 7.3.11 Análisis estadístico

La base de datos conformada en el paquete estadístico SPSS® Versión 21.0. (IBM Corp., Armonk, NY) permitió su respectivo análisis. Los análisis bivariados fueron aplicados a variables cuantitativas paramétricas haciendo uso de las pruebas de Chi-cuadrada. Para los análisis de supervivencia, se realizaron mediante el modelo no paramétrico Kaplan-Meyer y sus funciones se compararon para la expresión de la proteína mediante la prueba de Log Rank. Se estimaron los Hazard Ratio mediante el modelo de riesgos proporcionales o Regresión de Cox, al encontrarse diferencias estadísticamente significativas en la expresión de las proteínas. En todos los análisis estadísticos que se llevaron a cabo se consideró una significancia estadística con el valor de  $p < 0.05$  y sus respectivos intervalos de confianza se construyeron con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$  (Nivel de confianza de 95%).

## 8 RESULTADOS

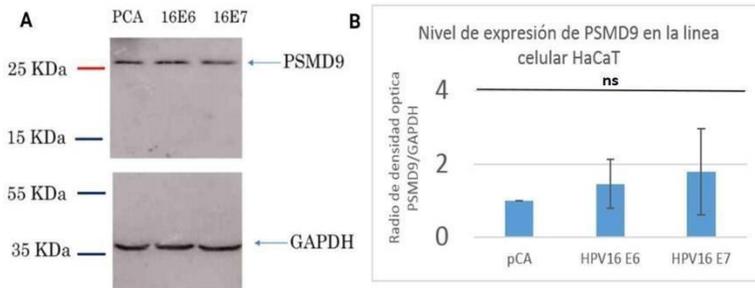
### 8.1 La presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 no modifica los niveles de expresión de PSMD9

Con el fin de evaluar el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH sobre los niveles de PSMD9, se realizó la transfección transitoria de dichas oncoproteínas en la línea celular HaCaT, transcurridas 24 horas después de la transfección se obtuvieron las proteínas totales y se verificó la expresión de E6 y E7 mediante WB. Los plásmidos que expresan a E6 y E7 contienen el tag HA en su estructura, por lo cual para su detección mediante WB se utilizó el anticuerpo anti-HA (figura 18).



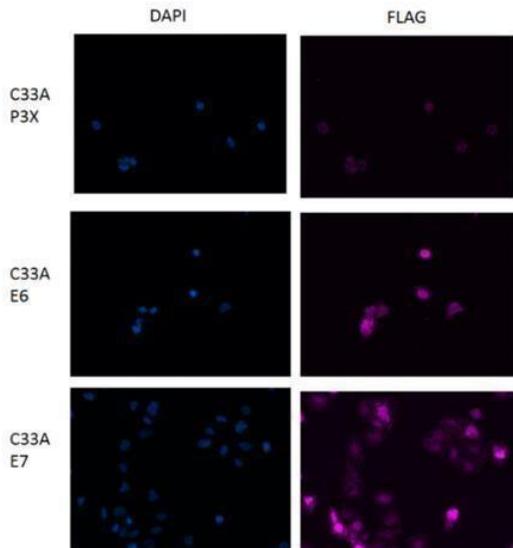
**Figura 18: Confirmación de la correcta transfección de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH en la línea celular HaCaT.** Western Blot utilizando anti-HA dilución 1:1000 en extracto de células transfectadas HaCaT PCA vector vacío.

Una vez confirmada la correcta expresión de las oncoproteínas, se procedió a evaluar los niveles de expresión de PSMD9 en la línea celular HaCaT, en donde no se encontraron cambios significativos en la expresión de PSMD9 en presencia de E6 y E7 (figura 19).



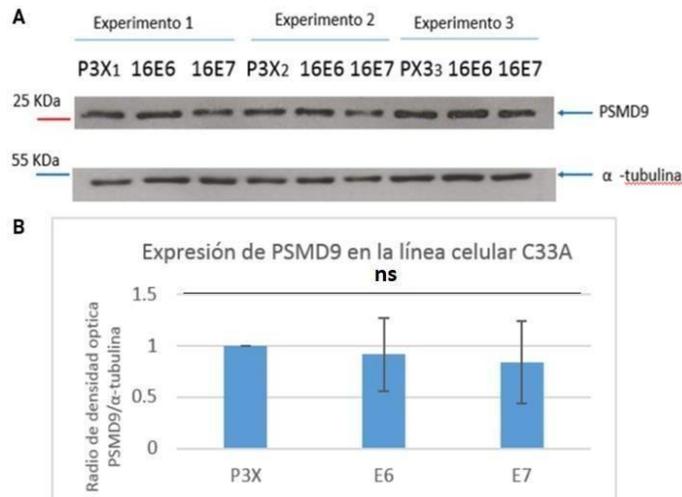
**Figura 19: Los niveles de expresión PSMD9 no se modifican en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH en la línea celular HaCaT.** A) Western Blot utilizando anti- PSMD9 (HPA-40512 Sigma-Aldrich) dilución 1:500 en extracto de células transfectadas HaCaT. Como control de carga se utilizó el anticuerpo anti-GAPDH (Santa Cruz). B) Representación gráfica del triplicado del radio de densidad óptica de PSMD9/GAPDH. pCA vs HPV16E6 o HPV16E7. n=3. ns: no significativo

También se evaluaron los niveles de expresión de PSMD9 en la línea celular C33A con expresión estable de E6 y E7. Dentro de la estructura de los plásmidos de E6 y E7 se encuentran 2 tags (HA y Flag) por lo que se pudo confirmar la expresión de estas oncoproteínas mediante IF utilizando un anticuerpo dirigido al tag Flag (figura 20).



**Figura 20: Confirmación de la expresión de E6 y E7 del VPH en la línea celular C33A.** IF anti-Flag dilución 1:1000 realizada en células C33A.

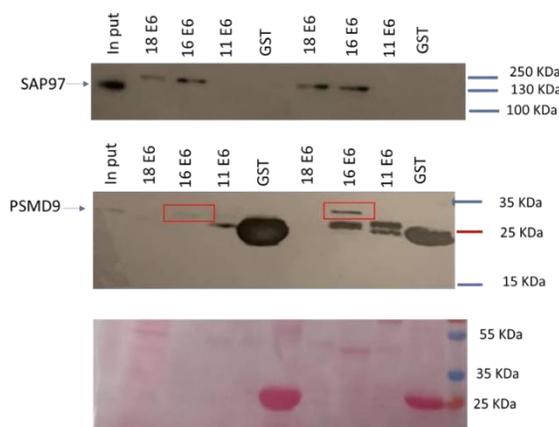
Una vez que nos aseguramos de la expresión de E6 y E7 en la línea celular C33A, se evaluaron los niveles de expresión de PSMD9 utilizando la técnica de WB. Se encontró que los niveles de PSMD9 en presencia de E6 y E7 no cambian significativamente con respecto al control (figura 21).



**Figura 21: Los niveles de expresión de PSMD9 no se modifican en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH en la línea celular C33A.** Western Blot utilizando anti- PSMD9 (HPA-40512 Sigma-Aldrich) dilución 1:500 en extracto de células C33A. Como control de carga se utilizó el anticuerpo  $\alpha$ -tubulina (Abcam ab7291). B) Representación gráfica del triplicado del radio de densidad óptica de PSMD9/ $\alpha$ -tubulina. p3X vs E6 o E7. n=5. Ns: no significativo.

### 8.2 E6 del VPH16 interactúa con PSMD9

Para evaluar si existe interacción entre PSMD9 y E6 del VPH se realizó un ensayo de interacción (*Pull Down*), en el que se utilizó como control del experimento a Dlg ya que se encuentra bien caracterizado como una proteína que interactúa con E6 del VPH16 a través del dominio PDZ que se encuentra en su estructura, justo como se puede observar en la imagen (figura 22). También se puede observar que PSMD9 interactúa específicamente con E616 del VPH y no con E6 del VPH11 (figura 22).

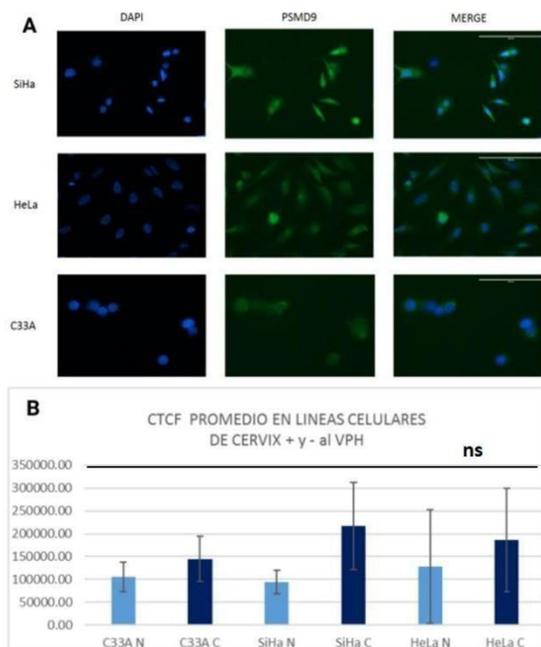


**Figura 22: PSMD9 interactúa con E6 del VPH16.** Western Blot utilizando anti- PSMD9 (HPA-40512 Sigma-Aldrich) dilución 1:500 en extracto de células HaCaT. Como control se utilizó a la proteína Dlg. Se aprecia la interacción de E6 con las proteínas Dlg y PSMD9.

Debido a que no se encontraron cambios en los niveles de expresión de PSMD9 en presencia de E6 del VPH16 en ninguno de los dos modelos que se evaluaron (células HaCaT con transfección transitoria de E6 y E7 y las células C33A con expresión estable de E6 y E7) pero si se observó interacción entre PSMD9 y E6 en el ensayo *pull down*, se decidió realizar ensayos de IF para determinar si a localización de PSMD9 se ve alterada en presencia de E6 o E7 del VPH16.

### 8.3 Los niveles de PSMD9 se modifican en cáncer positivo a VPH

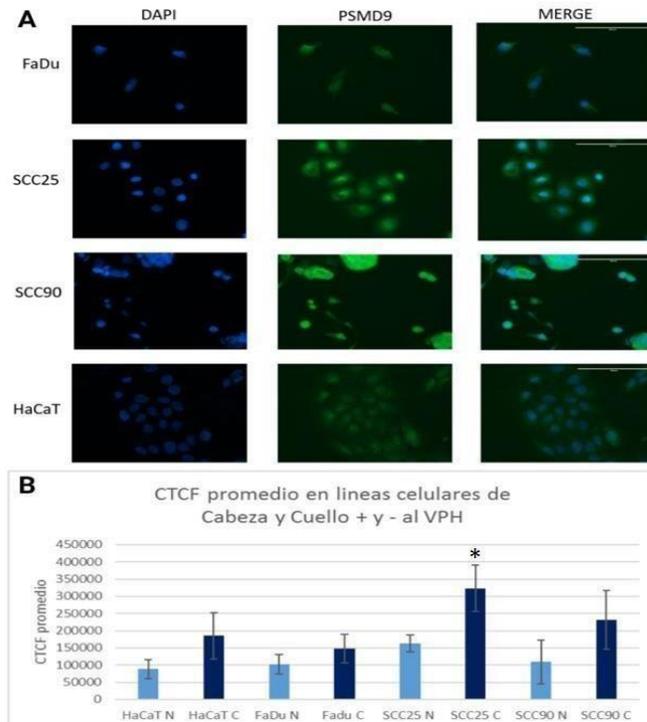
En primer lugar, se realizó una IF para determinar los niveles y localización de PSMD9 en líneas celulares de cérvix positivas y negativas al VPH. Se encontró que en las líneas positivas al VPH (HeLa y SiHa) la expresión de PSMD9 es mayor con respecto a la línea celular negativa al virus (C33A). Por otra parte, se cuantificaron los niveles de PSMD9 tanto en el núcleo como en el citoplasma encontrando que PSMD9 parece acumularse en el núcleo de las células positivas al VPH, aunque esto no resultó estadísticamente significativo (figura 23).



**Figura 23: Los niveles de expresión PSMD9 son mayores en las líneas celulares de cáncer de cérvix positivas al VPH. A)** Prueba de IF en líneas celulares positivas (+) y negativas (-) al VPH contra PSMD9, en donde se puede observar que en las líneas positivas al VPH los niveles de PSMD9 son mayores. **B)** Representación gráfica de los CTCF promedio. C33A vs HeLa o SiHa. n=4. ns: no significativo.

También se evaluaron los niveles de expresión y localización de PSMD9 en líneas celulares de cabeza y cuello positivas y negativas al VPH. Como se puede observar en la imagen y en

la gráfica de CTCF promedio la expresión de PSMD9, esta es mayor en las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello (SCC-90, SCC-25 y FaDu) en comparación con la línea celular HaCaT (figura 24). También se puede observar que el incremento de PSMD9 es más evidente en el núcleo de las líneas celulares de cáncer negativas al VPH en especial en las células SCC25.



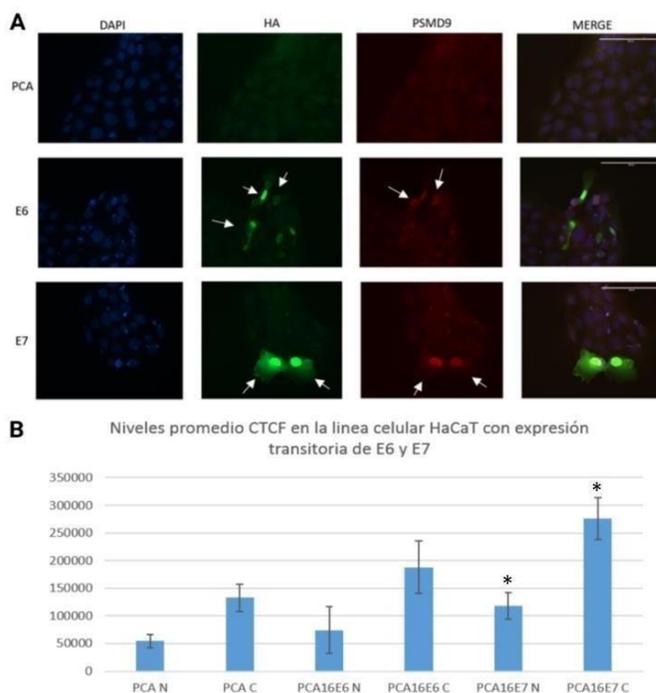
**Figura 24: Los niveles de expresión de PSMD9 son mayores en las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello comparadas con la línea celular HaCaT. A)** Ensayo de IF de líneas celulares de cabeza y cuello + y - al VPH, en donde se observa un claro incremento de PSMD9 en la línea celular SCC-25. **B)** Representación gráfica de los CTCF promedio. \* $p < 0.05$  vs HaCaT. n=4.

Una vez que se determinó mediante los ensayos de IF que los niveles de expresión de PSMD9 aumentan tanto en las líneas celulares de cáncer de cérvix como en las líneas celulares de cabeza y cuello, nos propusimos a determinar los niveles de expresión y localización de PSMD9 en la línea celular HaCaT con expresión de las oncoproteínas E6 y E7 y las células C33A con expresión estable de E6 y E7 del VPH16.

#### **8.4 Los niveles de expresión y localización de PSMD9 se modifican en la línea celular HaCaT y C33A con expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH**

En la línea celular HaCaT, transfectadas con los plásmidos pCA-16E6-HA y pCA-16E7-HA, se realizó la técnica de IF para detectar la presencia de HA y PSMD9. Se realizó la detección de HA para verificar la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16, puesto que el

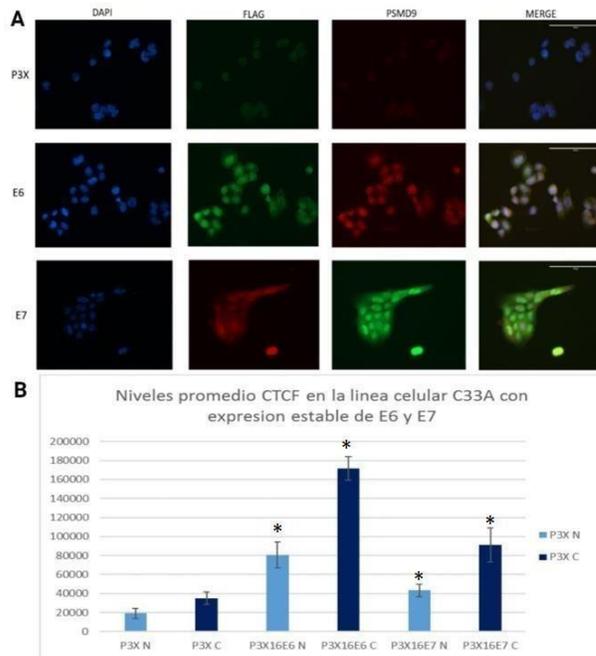
plásmido vacío (PCA) no contiene el tag HA y por lo tanto no se expresa en las células HaCaT (fluorescencia muy tenue) como se puede ver en la figura 25. Por otro lado, las células HaCaT transfectadas con el plásmido que contiene a E6 y E7 y por lo tanto el tag HA si se expresa en estas células, las células que expresan a HA son señaladas en la imagen en el canal verde. También se puede observar cómo solo en las células que expresan el tag HA, es decir las células que expresan a E6 y E7 del VPH, son las células que expresan en mayor cantidad (la fluorescencia es mayor) de PSMD9, las células se señalan en la imagen en el canal rojo. Adicionalmente las gráficas de los CTCF promedios también confirman que la expresión de PSMD9 es mayor en las células HaCaT con expresión de E6 y E7 del VPH16.



**Figura 25: Los niveles de expresión de PSMD9 aumentan en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH en el modelo celular HaCaT. A)** Ensayo de IF en la línea celular HaCaT transfectadas con las oncoproteínas E6 y E7 del VPH, en donde se observa un claro incremento de PSMD9 de las células transfectadas en comparación con los controles. **B)** Representación gráfica de los CTCF promedio. \* $p < 0.05$  vs pCA. n=4.

Por su parte, también se realizó la técnica de IF para detectar la presencia de Flag y PSMD9 en la línea celular C33A que expresan a E6 o E7 del VPH16 de manera estable. Se realizó la detección de Flag para verificar la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16, puesto que el plásmido vacío (p3X) no contiene el tag Flag, este no se expresa en las células C33A (fluorescencia muy tenue) como se puede observar en la figura 26. Por otra parte, existe una mayor fluorescencia del tag Flag en las células C33A con transfección estable de E6 y E7. Se puede observar cómo solo las células que expresan a E6 o E7 del VPH16, son las células que

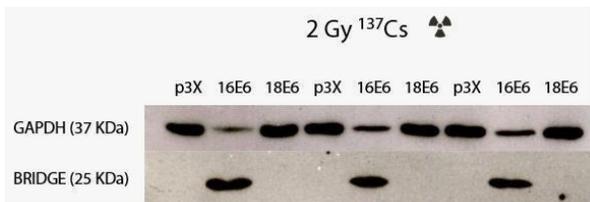
expresan en mayor cantidad (la fluorescencia es mayor) de PSMD9, adicionalmente se puede observar que las células que expresan a E6, expresan en mayor proporción a PSMD9 en núcleo que en citoplasma, dicho comportamiento también se puede confirmar en las gráficas que muestran el CTCF promedio (figura 26 b).



**Figura 26:** Los niveles de expresión de PSMD9 aumentan en la línea celular C33A con expresión estable de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH. Ensayo de IF en la línea celular C33A trasfectadas con las oncoproteínas E6 y E7 del VPH, en donde se observa un claro incremento de PSMD9 de las células transfectadas en comparación con los controles. **B)** Representación gráfica de los CTCF promedio. \* $p < 0.05$  vs p3X. n=4.

### 8.5 Los niveles de PSMD9 aumentan después del tratamiento con radiación en presencia de VPH16

Se ha observado que los niveles de expresión de PSMD9 están asociados a radioresistencia en cáncer de mama, para determinar el comportamiento de PSMD9 en presencia de las oncoproteínas del VPH expuestas a radiación, se utilizó a la línea celular C33A que expresan a E6. Las células C33A con expresión de los oncogenes E6 de VPH16 y VPH18 se trataron con 2 Gy de radiación ionizante ( $^{137}\text{Cs}$ ). A continuación, se determinaron los niveles de proteína de PSMD9 mediante ensayos de Western Blot, y se encontró que los niveles de PSMD9 aumentan en presencia de la oncoproteína E6 después del tratamiento con radiación (figura 27).



**Figura 27: Los niveles de expresión PSMD9 aumentan en presencia de las oncoproteína E6 del VPH después del tratamiento de radiación en el modelo celular C33A.** Se puede observar el aumento de la expresión de PSMD9 en tres diferentes ensayos en un modelo de células C33A transfectadas con las oncoproteínas E6 del VPH tipo 16 y 18 después del tratamiento con radiación.

## ***8.6 Evaluación del potencial de PSMD9 como biomarcador de respuesta a radioterapia***

### ***8.6.1 Generación de base de datos***

La información para generar la base de datos se obtuvo de los expedientes médicos disponibles en la plataforma electrónica INCAnet®, así como de los expedientes médicos impresos, resguardados por el departamento de archivo del INCan.

Se revisaron 204 expedientes de pacientes que asistieron al servicio de cabeza y cuello del INCan durante los años 2000 al 2015. De estos expedientes clínicos, se pudo obtener el bloque de parafina de 102 pacientes, los cuales cumplieron con el criterio de diagnóstico histopatológico de CaOF, dichas muestras fueron procesadas para obtener la prevalencia del VPH en estos tumores.

En cumplimiento de los criterios establecidos para este proyecto, fueron excluidos los pacientes que no concluyeron el esquema de tratamiento de primera línea, si el tratamiento que recibieron fue paliativo, si no se evaluó respuesta al tratamiento primario, si los datos del expediente no se encontraban completos o si la muestra no presentó tejido suficiente para su procesamiento. Finalmente se incluyeron 44 casos de CaOF, a los que además de la presencia del VPH se les determinó la expresión de PSMD9 mediante IHQ. Los datos demográficos y factores de riesgo de esta población fueron: mediana de edad para el género masculino fue de 56 años mientras que para el género femenino fue de 64 años (tabla 3). El nivel escolar predominante en la población fue el nivel primario con el 38.63% (tabla 3). En cuanto a la prevalencia de los factores de riesgo asociados al desarrollo de CaOF, tanto el consumo de alcohol como el consumo de tabaco fue alto con un 68.18 % y 70.45% respectivamente (tabla 3). El estadio clínico al diagnóstico más frecuente de la población fue el estadio IVa con un 29.54 y por otro lado el 61.36% recibió como tratamiento primario quimioterapia más radioterapia concomitante (tabla 3).

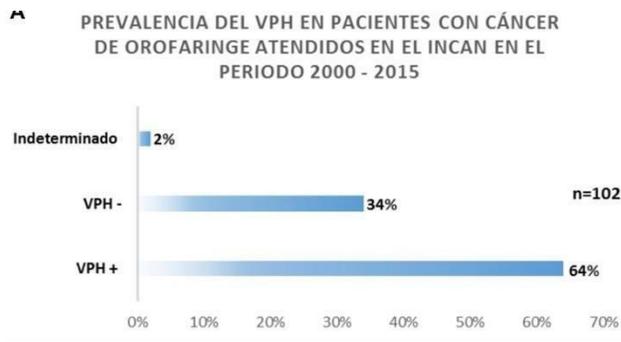
**Tabla 3. Datos demográficos y factores de riesgo de la población**

Características Demográficas		n=44	% o mediana
Edad	Hombres	36	56
	Mujeres	8	64
Sexo	Masculino	36	<b>81.81</b>
	Femenino	8	18.18
Escolaridad	Analfabeta	14	31.81
	Primaria	17	<b>38.63</b>
	Preparatoria	7	15.90
	Licenciatura	4	9.09
	Sin dato	2	4.54
<b>Factores de Riesgo</b>		<b>n=44</b>	<b>%</b>
Consumo de alcohol	Si	30	<b>68.18</b>
	No	13	29.54
	Sin dato	1	2.27
Consumo de tabaco	Si	31	<b>70.45</b>
	No	12	27.27
	Sin dato	1	2.27
<b>Características Demográficas</b>		<b>n=44</b>	<b>%</b>
Estadio Clínico	I	0	0
	II	2	4.54
	III	6	13.63
	IVa	13	<b>29.54</b>
	IVb	7	15.90
	IVc	0	0
	Sin dato	16	36.36
Tratamiento	Cirugía	5	11.36
	Cirugía + radioterapia	1	2.27
	Quimioterapia + Radioterapia concomitante	27	<b>61.36</b>
	Radioterapia	4	9.09
	Quimioterapia	2	4.54

### 8.6.2 Determinación de la prevalencia y tipo de VPH en OPSCC

Las biopsias de los 102 pacientes con diagnóstico histopatológico de cáncer de orofaringe se utilizaron para determinar la prevalencia del VPH mediante la metodología de INNO-LiPA encontrándose que el 64% de la población analizada es positiva a la presencia del VPH mientras que el 34% fue negativa a la presencia del VPH. No se pudo determinar el estatus del VPH en el 2% de las muestras debido a la mala calidad del material genético extraído.

Por otro lado, también se determinó la prevalencia del VPH de los 44 pacientes que cumplieron con todos los criterios de inclusión con el objetivo de generar una curva (figura 28) de supervivencia global. Encontrándose para esta población que el 54.54% fue positiva a la presencia del VPH, el 40.90% negativa a la presencia del VPH y en un 4.54 % no se pudo determinar el estatus de VPH.

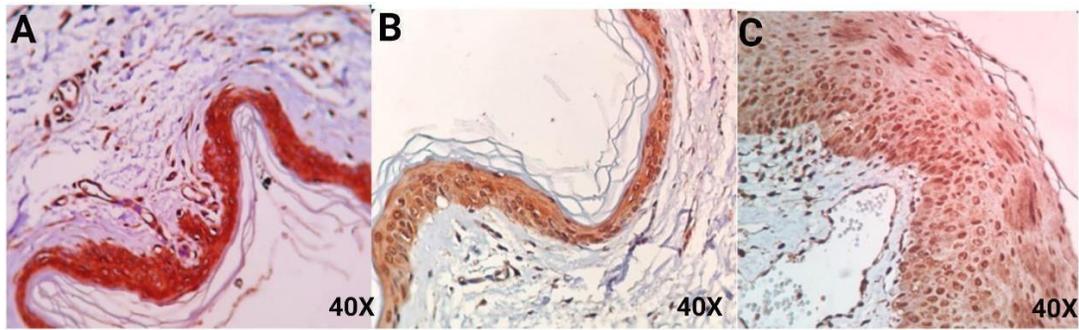


**Figura 28: Prevalencia de VPH en casos de CaOF atendidos en INCAN en el periodo 2000–2015.** Representación gráfica de la prevalencia del VPH en pacientes con CaOF que asistieron al INCAN en el periodo 2000-2015.

### **8.6.3 Estandarización de condiciones de IHQ para la detección de PSMD9**

Para determinar los niveles de expresión de la proteína PSMD9 en las biopsias de los pacientes con diagnóstico histopatológico de OPSCC, se empleó la técnica de IHQ. En primer lugar, fue necesario validar y estandarizar la dilución de trabajo del anticuerpo anti-PSMD9 Sigma-Aldrich (HPA-40512). La estandarización de este anticuerpo se realizó en cortes histológicos de colon y piel ya que ambos tejidos exhiben alta expresión de PSMD9.

La primera dilución que se probó para estandarizar la técnica de IHQ fue una dilución 1:500 utilizando el protocolo previamente descrito en la sección de metodología, las laminillas tratadas con esta dilución se llevaron a evaluar por los patólogos expertos, los cuales determinaron mediante análisis visual que se produjo una tinción demasiado intensa que no permite evaluar correctamente la expresión de PSMD9 (figura 29a), por lo que se recomendó probar el anticuerpo más diluido. Subsecuentemente se probaron las diluciones 1:750 y 1:1000 en los mismos tejidos. La dilución 1:1000 fue aprobada por los patólogos para procesar el resto de las muestras (figura 29b). La localización subcelular de PSMD9 en ambos tejidos es citoplásmica y nuclear, como se puede observar en la figura 29c, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura. Una vez aprobada la dilución de trabajo se procesaron la totalidad de las laminillas, utilizando como control positivo de la técnica un corte histológico de piel por corrida al cual se le colocó anticuerpo y como control negativo de la técnica se utilizó un corte histológico de piel al cual no se le adicionó el anticuerpo.



**Figura 29: Expresión de PSMD9 mediante IHQ en cortes histológicos de piel. A)** Tinción de PSMD9 con una dilución 1:500 mediante la técnica de IHQ. **B)** Tinción de PSMD9 con una dilución de 1:1000 mediante la técnica de IHQ. **C)** Se puede observar la expresión de PSMD9 en núcleo y citoplasma.

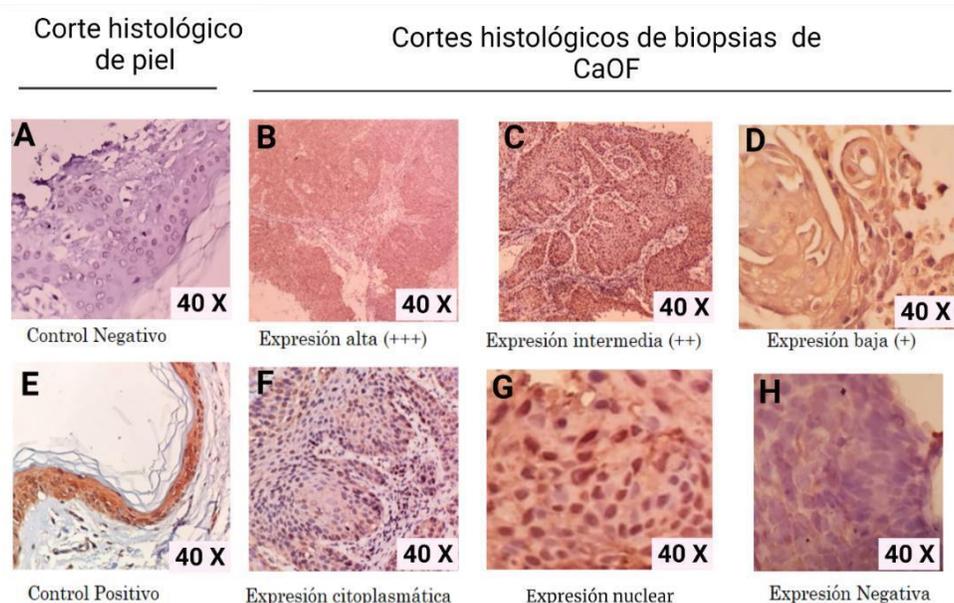
Luego de la evaluación de los casos por ambos patólogos se compilaron los resultados. A continuación, se describen los resultados obtenidos (tabla 4) y se muestra una imagen representativa de las tinciones (figura 30).

**Tabla 4. Localización celular e intensidad de expresión de la proteína PSMD9 en biopsias de pacientes con CaOF tratados en el INCAN de 2000-2015.**

Expresión y localización de PSMD9 en biopsias de CaOF

<b>Intensidad</b>	<b>n=44</b>	<b>%</b>
Negativa	1	2.27
Débil (+)	7	15.90
Moderada (++)	18	40.90
Intensa (+++)	18	40.90
<b>Localización</b>		
Negativa	1	2.27
Núcleo/Citoplasma	40	90.90
Núcleo	1	2.27
Citoplasma	2	4.54

*CaOF: Cáncer de orofaringe*



**Figura 30: Los niveles de expresión PSMD9 son mayores en las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello.**  
 8.6.1.1 Control negativo de la tinción de PSMD9 mediante IHC en un corte histológico de piel. **B)** Imagen representativa de la tinción de PSMD9 mediante IHC en una biopsia de CaOF donde se muestra expresión alta de PSMD9. **C)** Imagen representativa de la tinción de PSMD9 mediante IHC en una biopsia de CaOF donde se muestra expresión intermedia de PSMD9. **D)** Imagen representativa de la tinción de PSMD9 mediante IHC en una biopsia de CaOF donde se muestra expresión baja de PSMD9. **E)** Control positivo de la tinción de PSMD9 mediante IHC en un corte histológico de piel. **F)** Imagen representativa de la tinción de PSMD9 mediante IHC en donde se puede observar que PSMD9 solo se expresa en citoplasma. **G)** Imagen representativa de la tinción de PSMD9 mediante IHC en donde se puede observar que PSMD9 solo se expresa en núcleo. **H)** Imagen representativa de la tinción de PSMD9 mediante IHC en donde no se observa la expresión de PSMD9.

#### 8.6.4 No se encontró asociación entre PSMD9 y la respuesta a tratamiento de los pacientes con CaOF

Una vez obtenidos los resultados se procedió a determinar la asociación entre los niveles de PSMD9 y las diferentes variables analizadas mediante chi-cuadrada. La prueba estadística chi-cuadrada de asociación e independencia, sirve para determinar si una variable está asociada a otra variable. En este proyecto quisimos saber si la expresión de PSMD9 se encontraba asociada con la respuesta a tratamiento de los pacientes, por lo cual se aplicó la prueba estadística antes mencionada (tabla 5).

No se encontró asociación estadística entre la expresión de PSMD9 y la respuesta al tratamiento de los pacientes. Por otra parte, también se evaluó si existía alguna asociación entre los niveles de PSMD9 y la presencia del VPH y los niveles de PSMD9 y los pacientes presentan o no recurrencia, en ambas determinaciones no se encontró significancia estadística.

También se evaluó la asociación entre la respuesta a tratamiento y la presencia del VPH mediante la técnica de Inno-lipa y la expresión de p16, encontrándose asociación estadística entre estas.

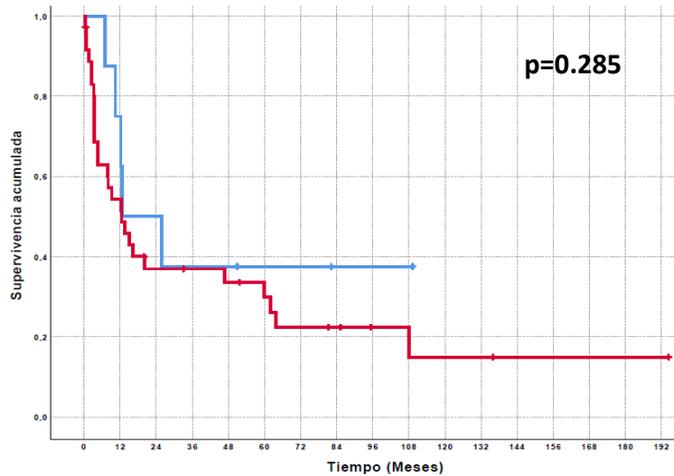
**Tabla 5. Tabla de asociación entre la presencia de VPH y PSMD9 con la respuesta a tratamiento.**

Variable			VPH + n	VPH - n	Valor de p
<b>Respuesta a tratamiento</b>	Si	p16	15	9	<b>0.0013</b>
	No		0	9	
<b>Respuesta a tratamiento</b>	Si	Inno- lipa	16	7	<b>0.1521</b>
	No		2	7	
<b>Niveles de expresión de PSMD9</b>	Alta	p16	10	8	<b>0.1498</b>
	Baja		8	16	
<b>Niveles de expresión de PSMD9</b>	Alta	Inno- lipa	12	6	<b>0.2276</b>
	Baja		11	12	
			<b>PSMD9 +</b> n	<b>PSMD9 -</b> n	<b>Valor de p</b>
<b>Respuesta a tratamiento</b>	Si		19	6	<b>0.4455</b>
	No		7	2	
			<b>PSMD9 +</b> n	<b>PSMD9 -</b> n	<b>Valor de p</b>
<b>Recurrencia</b>	Si		3	9	<b>0.1469</b>
	No		6	5	

#### **8.6.5 Los niveles de PSMD9 no se asocian con la SG en CaOF**

La expresión de PSMD9 fue dicotomizada con el objetivo de realizar un análisis Kaplan-Meier de la influencia de PSMD9 en la supervivencia global y la respuesta a tratamiento de los pacientes. Se definieron a los tumores con expresión negativa o débil de PSMD9 como negativos y los tumores con expresión moderada y alta de PSMD9 como positivos.

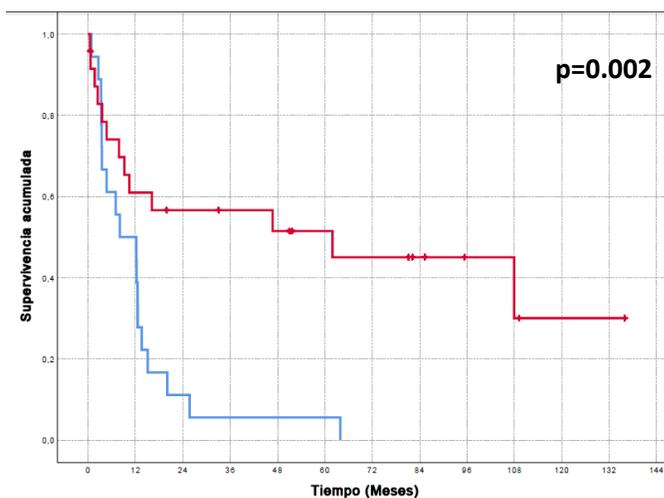
A continuación, se muestra la curva de supervivencia global, en donde los pacientes con tumores con expresión negativa de PSMD9 se representa en color azul mientras que los tumores con expresión positiva de PSMD9 se representa en color rojo. En esta corte no se encontró asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PSMD9 y la supervivencia global de los pacientes (figura 31).



<i>n=44</i>		IC:95%	
Expresión PSMD9	Mediana (meses)	Límite inferior	Límite superior
<b>NEGATIVO</b> 8	49.44	17.17	81.71
<b>POSITIVO</b> 36	49.89	25.37	74.41

Figura 31: Curva de Sobrevida Global en relación con la expresión de PSMD9.

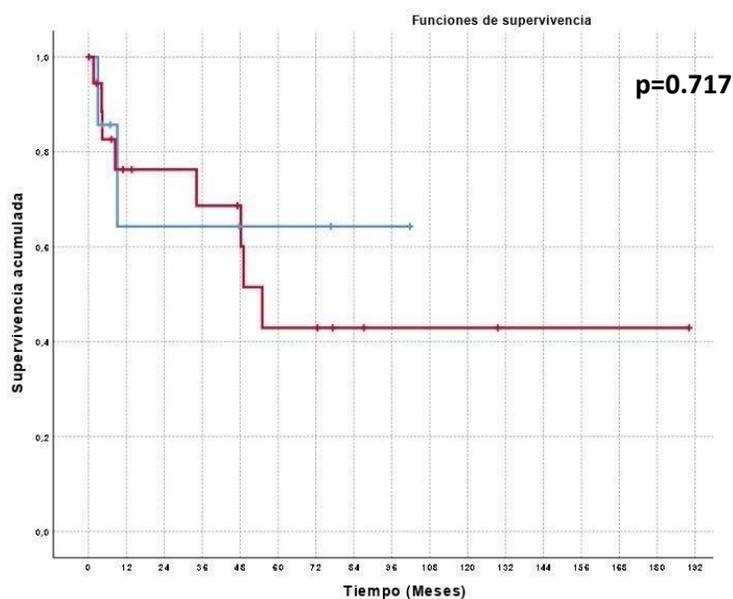
Se sabe que los pacientes con tumores VPH+ tienen mejor respuesta a tratamiento en comparación con los pacientes con tumores VPH-, la presencia del VPH se determinó mediante inno- Lipa, para ver la influencia de la presencia del VPH en la SG en esta corte se realizó el análisis Kaplan-Meier correspondiente. Se puede observar que la presencia del VPH es un factor de buen pronóstico para los pacientes (figura 32).



<i>n=42</i>		IC:95%	
INNo-Lipa	Mediana (meses)	Límite inferior	Límite superior
<b>NEGATIVO</b> 18	12.46	5.77	19.15
<b>POSITIVO</b> 24	65.9	41.08	90.72

Figura 32: Curva de Sobrevida Global en relación con la presencia del VPH determinada mediante INNo-Lipa.

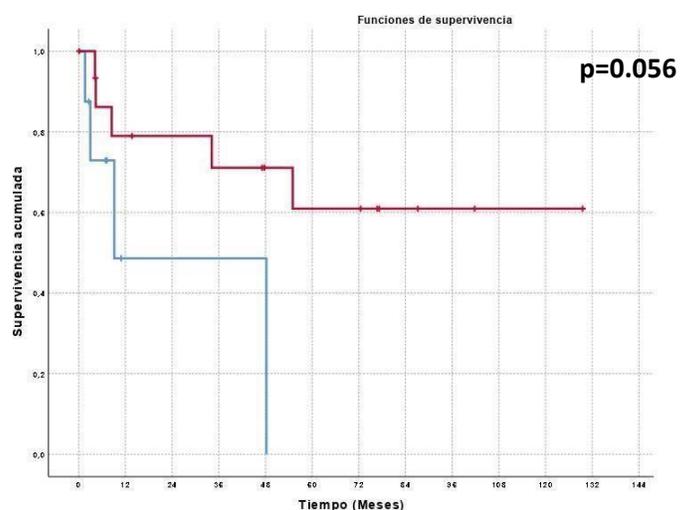
Además, se realizó un análisis Kaplan-Meyer de la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con CaOF con respecto a la expresión de PSMD9. En este análisis tampoco se encontró significancia estadística entre PSMD9 y la SLE (Figura 33).



Expresión PSMD9	IC:95%		
	Mediana (meses)	Límite inferior	Límite superior
<b>NEGATIVO</b> 7	67.79	28.82	106.76
<b>POSITIVO</b> 19	98.36	55.10	141.62

Figura 33: Curva de Supervivencia libre de enfermedad en relación con la expresión de PSMD9.

Por último, se realizó un análisis Kaplan-Meyer de la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con CaOF con respecto a la presencia del VPH determinado mediante la técnica de inno-lipa, no se encontró significancia estadística en esta determinación (Figura 34).



INNo-Lipa	IC:95%		
	Mediana (meses)	Límite inferior	Límite superior
<b>NEGATIVO</b> 8	26.3	4.89	47.71
<b>POSITIVO</b> 16	88.4	59.49	117.3

Figura 34: Curva de Supervivencia libre de enfermedad en relación con la presencia del VPH determinada mediante inno-lipa

## 9 DISCUSIÓN

La alta prevalencia de la infección por el Virus del Papiloma Humano hace de esta enfermedad un problema de salud pública a nivel global. En particular es alarmante el incremento de casos de cáncer de orofaringe asociados a la infección por el VPH. Así mismo, el estatus de infección con VPH ha sido reconocido como un factor pronóstico crítico en este tipo de cáncer, pues los pacientes positivos a VPH en cualquier estadio clínico, tienen un mejor pronóstico en comparación con los pacientes con tumores negativos al virus (Wu, W. *et al* 2019). Este pronóstico favorable está relacionado con una mejor respuesta a las terapias convencionales (predominantemente radioterapia) en comparación con los pacientes con tumores VPH negativos. Sin embargo, hasta el momento no se conocen con exactitud los mecanismos mediante los cuales estos pacientes responden mejor, por lo que resulta necesario investigar proteínas celulares que puedan explicar el desenlace clínico en pacientes con CaOF positivos a VPH. Un potencial biomarcador predictivo de interés es el proteasoma 26S, el cual ha sido asociado con el desenlace clínico de pacientes que recibieron radioterapia en dos estudios independientes en dos tipos diferentes de cáncer, además que por sí mismo es un blanco en la terapéutica contra el cáncer.

PSMD9 es una subunidad del proteasoma 26S cuya expresión predice la respuesta a radioterapia en cáncer de mama, además de que en su estructura PSMD9 contiene un dominio PDZ que postulamos como un posible blanco de interacción para la oncoproteína E6 del VPH. Debido a lo anterior se propuso determinar si los niveles de PSMD9 se ven afectados por la presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16, para dicho objetivo se realizaron ensayos de WB para medir la expresión de PSMD9 en dos modelos celulares (células HaCaT y células C33A con expresión estable de E6 y E7 del VPH16). Mediante esta metodología no se encontraron diferencias en la expresión de PSMD9, por lo que se decidió realizar ensayos para determinar interacción entre estas proteínas mediante *pull down*, en donde fue posible observar que PSMD9 interactúa con la oncoproteína E6 del VPH por lo que se decidió realizar ensayos de IF para evaluar si existía un cambio en la localización. En primer lugar, se analizó la expresión de PSMD9 en un panel de líneas celulares de cáncer de cérvix, positivas y negativas al VPH, obteniéndose como resultado que en las líneas celulares de cáncer positivas al VPH la expresión de PSMD9 y por otra parte se realizó el mismo análisis en un panel de

líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello positivas y negativas al VPH obteniéndose como resultado que las líneas celulares cancerígenas expresan en mayor cantidad a PSMD9, ambos resultados son de importancia significativa ya que, por una parte indican que la presencia de las oncoproteínas E6 y E7 podrían estar afectando la expresión de esta proteína para utilizarla como algún mecanismo de resistencia ya sea por parte del virus o de la célula, y por otra parte al verse modificados los niveles de esta proteína solo en las líneas celulares cancerígenas también indica que esta proteína juega un rol importante en la homeostasis celular. Sin embargo, se necesitan más estudios para poder dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en estos 2 hallazgos. Debido a que se observaron estos cambios en ambos paneles de líneas celulares, procedimos a determinar la expresión de PSMD9 en los modelos antes mencionados y descritos en la parte de metodología, las células HaCaT y células C33A con expresión transitoria y estable de las oncoproteínas E6 y E7 correspondientemente. En ambos modelos se observó un aumento de expresión de la proteína PSMD9 en toda la célula (núcleo y citoplasma) pero particularmente se puede observar un aumento significativo en el núcleo. Hecho que sugiere una potencial acción de PSMD9 a nivel transcripcional.

PSMD9 fue identificado independientemente bajo el nombre “bridge 1” como co-activador transcripcional que modula la función de los factores transcripcionales PDX-1, E12 y E47 y además interactúa con el co-activador histona acetiltransferasa p300 (Hooper J, *et al* 2015). PDX-1 contribuye a la regulación de procesos como morfogénesis y neogénesis en etapa embrionaria (Lazo *et al.*, 2009) mientras que E12/E47 juega un papel en el crecimiento celular, el compromiso celular y la diferenciación. Las proteínas E2A están reguladas negativamente por la vía de la ubiquitina y es esencial para la hematopoyesis normal de células B. (revisión en Slattery *et al.*, 2008). La acumulación de PSMD9 en núcleo podría estar relacionada con la función de co-activador transcripcional que desempeña, lo cual podría ser aprovechado por el VPH para activar mecanismos que ayuden a la supervivencia de la célula y así permitir la replicación del virus.

Por otra parte, células C33A transfectadas establemente con las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 que fueron tratadas con 2 Gy de energía ionizante ( $^{137}\text{Cs}$ ), mostraron un aumento significativo de los niveles de PSMD9 en presencia de E6 después de recibir el tratamiento de radiación. El VPH podría estar incrementando los niveles de PSMD9 como un mecanismo de supervivencia aprovechando las funciones de PSMD9 como co-activador transcripcional al

estimular probablemente a los factores transcripcionales PDX-1 Y E12/47 involucrados en la regulación de mecanismos que intervienen con la proliferación celular.

Como segundo objetivo de este proyecto fue determinar si PSMD9 puede funcionar como biomarcador de respuesta a tratamiento en pacientes con CaOF, con tal fin se determinó la prevalencia del VPH en la población de estudio para así poder dividirlos entre pacientes positivos y negativos al VPH. Por otro lado, se realizó la tinción de PSMD9 mediante IHQ para evaluar la expresión de PSMD9 para dicotomizar a la población en expresión de PSMD9 positiva y negativa, una vez que se obtuvieron estos resultados se realizó el análisis Kaplan Meier correspondiente.

Se obtuvieron varios resultados interesantes de esta parte del proyecto, primeramente, se puede observar que el género masculino se ve mayormente afectado por el CaOF en comparación con las mujeres con un 81.81% y 18.18%, respectivamente. Los reportes internacionales indican que el género masculino se ve mayormente afectado por esta neoplasia exhibiendo una incidencia de 4:1 respecto al género femenino (Castellsagué *et al.*, 2004; Taberna *et al.*, 2017) lo cual concuerda con el comportamiento de la población de este proyecto.

Los pacientes con VPH positivos tienden a ser más jóvenes en comparación con los pacientes VPH negativos, con una mediana edad de diagnóstico de 54 años, menos exposición a alcohol y tabaco, un nivel socioeconómico y de educación más alto (revisado por Elrefaey S. *et al.* 2014). La mediana de edad para hombres de la población de estudio fue de 56 años y 54 años para mujeres, el consumo de alcohol y tabaco también tuvo alta prevalencia con 68.18% y 70.45% respectivamente y el nivel básico educativo (primaria) fue el más común. Estos datos difieren con lo reportado internacionalmente, ya que la media de edad de diagnóstico de nuestra población es mayor, esto podría explicarse debido a que la población a un no presenta la transición epidemiológica hacia individuos jóvenes. Debido a que en otras poblaciones (Europa y Estados Unidos) se ha encontrado que existe una asociación entre un estatus socioeconómico y de educación alto con la presencia del VPH, nos pareció relevante analizar esta información en la población de estudio; sin embargo, debido a que el INCAN es un hospital que brinda servicio a personas de bajos recursos la mayoría de la población solo alcanzó un nivel de educación básico y no nos permitió realizar una evaluación más eficaz como habría sido de haber tenido acceso a una población con un estatus socioeconómico mixto.

Los pacientes OPSCC son usualmente diagnosticados en estadios avanzados según los reportes internacionales debido a que es una región anatómica de difícil acceso además de que no existe una cultura de prevención en esta región anatómica. El estadio clínico IVa al diagnóstico desafortunadamente fue el más común en la población, comportamiento que concuerda con los datos reportados internacionalmente.

Por otra parte, el 54.54% de los casos analizados fue positiva a la presencia del VPH mientras que el 40.90% fue negativa, diversas investigaciones se han dado a la tarea de determinar la fracción atribuible al VPH, de manera particular, los reportes para CaOF tiene un comportamiento heterogéneo estableciéndose un rango que va del 20% al 70% (Tumban, 2019). La heterogeneidad de prevalencia del VPH determinada en los diferentes estudios probablemente refleja las distintas tendencias que se dan por área geográfica, técnica utilizada para la detección del VPH, periodo de tiempo en el que se llevó a cabo el estudio, situación sociodemográfica, factores de riesgo, como consumo de alcohol y tabaco, así como prácticas sexuales a las que estuvo expuesta la población de estudio, dando como resultado una rápida evolución de los datos de prevalencia de este virus. En este trabajo se realizó la detección del VPH mediante 2 metodologías, mediante INNO-lipa y la tinción de p16 mediante IHC, mediante la técnica de INNO-lipa se detectó la presencia del VPH en más biopsias en pacientes con CaOF en comparación con la tinción de p16, debido a que la técnica de inno- lipa permite identificar con gran sensibilidad la presencia del virus en tejidos con poca integridad como lo son los tejidos embebidos en parafina gracias a que solo necesitan amplificar un pequeño segmento del DNA en comparación con las técnicas de PCR convencionales las cuales requieren e amplificar segmentos de DNA mayores.

Con respecto a los resultados obtenidos de la tinción de PSMD9 realizada mediante IHQ, se puede observar que la expresión de PSMD9 en los casos de CaOF, es más alta en comparación con los controles también se puede decir que PSMD9 no modifica su localización en cáncer ya que tanto en los controles como en las biopsias de CaOF la localización es citoplasmática y nuclear (tabla 6).

Para examinar la influencia de la presencia del VPH en la respuesta a tratamiento, la SG y la SLE en esta cohorte se realizó el análisis Kaplan-Meier correspondiente en donde se observó que los pacientes con tumores VPH+ tienen mayor tiempo de supervivencia global en

comparación con los pacientes con tumores VPH-, es decir que la presencia del VPH es un marcador de buen pronóstico lo cual va de acuerdo a la literatura (Wu, W. *et al* 2019).

Recientemente, la expresión de la sub-unidad del proteasoma 26S, PSMD9, fue descrita como factor de mal pronóstico en cáncer de mama en pacientes que recibieron radioterapia (Langlands *et al.*, 2014). Por lo que en este trabajo nos dimos a la tarea de valorar el factor pronóstico de PSMD9 en CaOF. En esta corte no se encontró asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PSMD9 y la SG. Esto podría explicarse debido a que el tamaño de la corte no fue el suficiente para alcanzar la significancia estadística.

Por otro lado, se realizó la prueba de chi cuadrada para determinar si existía alguna relación entre la expresión de PSMD9 y la respuesta a tratamiento de los pacientes; sin embargo, no se encontró significancia estadística. Entre los factores que podrían haber impactado en estos resultados se encuentra el tamaño de la corte, pues se contó con un número reducido de pacientes, además de que el comportamiento de cada proteína en tipo de cáncer podría ser diferente, por lo que hace falta realizar mayores investigaciones para poder definir el valor de PSMD9 como biomarcador de respuesta a radioterapia.

## **10 . SUMARIO**

Bajo las condiciones de este proyecto se logró encontrar que la expresión de PSMD9 se ve modificada (aumenta su expresión) en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 en los dos modelos celulares descritos mediante la técnica de IF. También se puede concluir que la localización de PSM9 se modifica, relocalizándose en núcleo en presencia del VPH. Se pudo determinar que existe interacción entre PSMD9 y la oncoproteína E6 mediante el ensayo de *pull-down*.

Por otro lado, la expresión de PSMD9 no se encontró relacionada estadísticamente con la respuesta a tratamiento de los pacientes con CaOF, en la población estudiada. Además, el aumento de PSMD9 por la oncoproteína E6 del VPH16 después del tratamiento de radiación podría estar involucrada en los mecanismos de radiosensibilidad, aunque no se asoció con el resultado clínico de los pacientes en este trabajo.

Los resultados obtenidos apuntan a una relación muy interesante entre PSMD9 y las oncoproteínas E6 y E7 que nos podrían ayudar a entender la biología molecular del CaOF VPH+ y su participación en mecanismos de radiosensibilidad

## 11 . CONCLUSIÓN

Se encontró que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 modifican los niveles de expresión de PSMD9 en dos modelos celulares, pero no se encontró ninguna relación con el desenlace clínico de los pacientes en esta población. Por lo tanto, más investigación es requerida para evaluar a PSMD9 como un posible biomarcador.

## 12 . REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Alfaro, A. y Fournier, M. (2013). *Virus del papiloma Humano*. Revista Médica de Costa Rica y Centroamerica lxx (606) 211-217.
- 2) Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, NguyenTân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmon KP, GillisonML. (2010). *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer*. The New England Journal of Medicine: 363:24-35.
- 3) Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Meyer, L., Gress, D. M., Byrd, D. R., & Winchester, D. P. (2017). *The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging*. CA: A cancer journal for clinicians, 67(2), 93–99.
- 4) Asmita Pal y Rita Kundu. (2020). *Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy*. Frontiers in Microbiology, vol. 10, pp 3116.
- 5) Barbosa, M.S.; Edmond, C.; Fisher, C.; Schiller, J.T.; Lowy, D.R.; Vousden, K.H. (1990). *The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation*. The EMBO Journal, 153– 160.
- 6) Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, et al. (1988). *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer*. Cancer Research; 48(11):3282–3287.
- 7) Benard VB, Johnson CJ, Thompson TD, et al. (2008). *Examining the association between socioeconomic status and potential human papillomavirus associated cancers*. Cancer;113:2910- 8.
- 8) Brianti P., De Flammineis E. and Mercuri S. R. (2017). “Review of HPV-related diseases and cancers,” New Microbiologica, vol. 40, no. 2, pp. 80–85.
- 9) Bodily J, Laimins LA. (2011). *Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression*. Trends in Microbiology; 19(1): 33–39.
- 10) Book, A.J. et al. (2010). *Affinity purification of the Arabidopsis 26S proteasome reveals a diverse arrays of plant proteolytic complexes*. Journal of Biological Chemistry. 285, 25554-25569.
- 11) Bosch F, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. (2002) *The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer*. Journal of Clinical Pathology: 55:244-65.
- 12) Buckley L, Jackett L, Clark J, et al. (2018). *HPV-related oropharyngeal carcinoma: a review of clinical and pathologic features with emphasis on updates in clinical and pathologic staging*. Advances in Anatomic Pathology; 25:9
- 13) CDC. (2017). *El VPH y el cáncer orofaríngeo*. Public Health Foundation, Washington, D.C.
- 14) Castellsague X et al. (2016). *HPV involvement in head and neck cancer; comprehensive assessment of biomarkers in 3680 patients*. Journal of the National Cancer Institute, 108(6).
- 15) C Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M. T., Sibug-Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C. F., Wentzensen, N., Jordan, R. C., Altekruze, S., Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., & Gillison, M. L. (2011). *Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States*. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 29(32), 4294-430

- 16) Chen XS, et al. (2001). *Structure of small virus like particules assembly of HPV 11 and HPV16 L1*. Journal of molecular biology; 307(1):173-182.
- 17) Chen XS et al., (2000). *Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16*. Molecular Cell;5(3):557-567.
- 18) Chu A, genden E, Posner M, et al. (2013). *A patient centered approach to counseling patients with head and neck cancer undergoing human papillomavirus testing: a clinician's guide*. Oncologist; 18:180-9
- 19) Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C, Wang Y (2005). *Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet; 366(9503):2087–2106.
- 20) Craiu A, Gaczynska M, Akopian T, Gramm CF, Fenteany G, Goldberg AL, Rock KL (1997) *Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation*. Journal of Biological Chemistry; 272(20):13437–13445.
- 21) Day P, Lowy DR, Schiller, JT. (2008). *Heparan Sulfate-Independent Cell Binding and Infection with Furin-Pre-cleaved Papillomavirus Capsids*. Journal of Virology; 82:12565-8.
- 22) Dalla Torre D, Burtscher D, Soelder E, Offermanns V, Rasse M, Puelacher W. (2018). *Human papillomavirus prevalence in a mid-European oral squamous cell cancer population: a cohort study*. Journal of Oral Diseases; 24:948–56.
- 23) De Martel C, Plummer M, Vignat J and Franceschi S. (2017). *Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type*. International Journal of Cancer: 141, 664–670.
- 24) Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C. & Rechsteiner, M. (1994). *A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates*. Journal of Biological Chemistry. 269, 7059-7061.
- 25) D'Souza, G.; Agrawal, Y.; Halpern, J.; Bodison, S.; Gillison, M.L. (2009). *Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection*. The Journal of Infectious Diseases; 199, 1263–1269.
- 26) Doorbar, J., Egawa, N., G0riffin, H., Kranjec, C., & Murakami, I. (2015). *Human papillomavirus molecular biology and disease association*. Reviews in medical virology, 25 Suppl 1(Suppl Suppl1), 2–23.
- 27) Doorbar J. (2006). *Molecular biology of human papilloma-virus infection and cervical cancer*. Clinical Science (Lond); 110:525-41.
- 28) Dunne E.F., Park I.U. (2013). *HPV and HPV-associated diseases*. Infectious Disease Clinics of North America. 27, 765-778.
- 29) Elfadl D, Hodgkinson VC, Long ED, Scaife L, Drew PJ, Lind MJ, Cawkwell L (2011). *A pilot study to investigate the role of the 26S proteasome in radiotherapy resistance and loco-regional recurrence following breast conserving therapy for early breast cancer*. Breast; 20(4):334–337.
- 30) Elrefaey S., Massaro M.A, S. Chiocca, F. Chiesa, M. Ansarin. (2014). *HPV in oropharyngeal cancer: the basics to know in clinical practice ACTA*. Otorhinolaryngologica italica 34:299-309
- 31) Goldenberg D, Begum S, Westra WH et al. (2008). *Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: an HPV-associated phenomenon*. Head Neck; 30(7): 898–903.
- 32) Goldstein, G. et al. (1975). *Isolation of a polypeptide that has lymphocyte differentiating properties and is probably represented universally in living cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A. 72, 11 15
- 33) Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. (2015). *Epidemiology of human papillomavirus– positive head and neck squamous cell carcinoma*. Journal of Clinical Oncology; 33:3235–42.
- 34) Gillison ML, Alemany L, Snijders PJF, Chaturvedi A, Steinberg BM, Schwartz S, et al. (2012). *Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis*. Vaccine; 30 (Suppl 5): F34–54.
- 35) Hammarstedt L, Dahlstrand H, Lindquist D, et al. (2007). *The incidence of tonsillar cancer in*

- Sweden is increasing. *Acta otolaryngol*; 127:988-92.
- 36) Hanns E, Job S, Coliat P et al. (2015). *Human papillomavirus-related tumours of the oropharynx display a lower tumour hypoxia signature*. *Oral Oncology*; 51(9): 848–856.
  - 37) Hoskin PJ (2006). *Radiotherapy in Practice: External beam therapy*. Oxford: Oxford University Press.
  - 38) Howard JD, Chung CH. (2012). *Biology of Human papillomavirus –related oropharyngeal cancer*. *Seminars in Radiation Oncology*; 22:187-93
  - 39) Huang SH, Perez-Ordóñez B, Liu F-F et al. (2012). *Atypical clinical behavior of p16-confirmed HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radical radiotherapy*. *International Journal of Radiation Oncology - Biology - Physics*; 82(1): 276–283.
  - 40) Huber M. A. and Tantiwongkosi B. (2014). *Oral and Oropharyngeal Cancer, Medical Clinics of North America*, Volume 98, Issue 6, 2014, Pages 1299-1321,
  - 41) Joseph AW, D'Souza G. (2012). *Epidemiology of human papillomavirus-related head and Neck cancer*. *Otolaryngologic Clinics of North America*; 45:739-64.
  - 42) Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC et al. (2013). *Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer*. *Cancer Research*; 73(15): 4791–4800.
  - 43) Klussman JP, Weissenborn SJ, Wieland U, et al. (2001). *Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas*. *Cancer*; 92:2875-84.
  - 44) Kurepa, J. & Smalle, J.A. (2008). *Structure, function and regulation of plant proteasomes*. *Biochimie* 90, 324-335.
  - 45) Kornitzer, D. & Ciechanover A. (2000). *Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation*. *Journal of Cellular Physiology*. 182, 1-11.
  - 46) Lassen P, Eriksen JG, Krogdahl A et al. (2011). *The influence of HPV-associated p16-expression on accelerated fractionated radiotherapy in head and neck cancer: evaluation of the randomised DAHANCA 6&7 trial*. *Radiotherapy and Oncology*; 100(1): 49–55.
  - 47) Leemans R, Snijders P. and Brakenhoff R. (2018). *The molecular landscape of head and neck cancer*. *Nature*: Volume 18.
  - 48) Loza ML y Fernandez C. (2009). *Factores transcripcionales en la célula  $\beta$  adulta*. *Revista de investigación clínica*. Vol. 61 Núm5.
  - 49) McIntyre, M.C.; Frattini, M.G.; Grossman, S.R.; Laimins, L.A. (1993). *Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X<sub>2</sub>C motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding*. *Journal of Virology*. 67, 3142–3150.
  - 50) Martel M, Alemany L, Taberna M et al. (2017). *The role of HPV on the risk of second primary neoplasia in patients with oropharyngeal carcinoma*. *Oral Oncol*; 64: 37–43.
  - 51) Manzo Merino J, Thomas M, Fuentes Gonzalez A. M, Lizano M & Banks L. (2013). *HPV E6 oncoprotein as a potential therapeutic target in HPV related cancers*, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17:11, 1357-1368.
  - 52) Massimi, P.; Banks, L. (2000). *Differential phosphorylation of the HPV-16 E7 oncoprotein during the cell cycle*. *Virology*; 276, 388–394.
  - 53) Mignogna MD, Fedele S, Iorio L. (2004). *The world cancer report and the burden of oral cancer*. *European Journal of Cancer*, 13:139-42.
  - 54) Mistry N, Wibom C, Evander M. (2008) *Cutaneous and mucosal human papillomaviruses differ in net surface charge, potential impact on tropism*. *Virology Journal*: 5:118.
  - 55) Modis Y, Trus BL, Harrison SC. (2002). *Atomic model of the papillomavirus capsid*. *The EMBO Journal*. 21:4754-62.
  - 56) Mukhopadhyay, D. & Riezman, H. (2007). *Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling*. *Science* 315, 201-205.
  - 57) Oh JE, Kim Jo, Shin Jy. (2013). *Molecular genetic characterization of p53 mutated oropharyngeal squamous cell carcinoma cells transformed with human papillomavirus E6 and E7 oncogenes*. *International Journal of Oncology*: 43:383-93.
  - 58) Oh, K.J.; Kalinina, A.; Wang, J.; Nakayama, K.; Nakayama, K.I.; Bagchi, S. (2004). *The papillomavirus E7 oncoprotein is ubiquitinated by UbcH7 and Cullin 1- and Skp2-containing E3 ligase*. *Journal of Virology*; 78, 5338-5346.

- 59) Ohlenschlager, O., Seiboth, T., Zengerling, H., Briese, L., Marchanka, A., Ramachandran, R., et al. (2006). *Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7*. *Oncogene* 25, 5953–5959.
- 60) Parkin, D.M.; Bray, F. (2006). *Chapter 2: The burden of HPV-related cancers*. *Vaccine* 24 (Suppl. 3), S11–S25.
- 61) Peck BW, Dahlstrom KR, Gan SJ et al. (2013). *Low risk of second primary malignancies among never smokers with human papillomavirus-associated index oropharyngeal cancers*. *Head Neck*; 35(6): 794–799.
- 62) Perry ME. (1994). *The specialized structure of crypt epithelium in the human palatine tonsil and its functional significance*. *Journal of Anatomy*; 185:111-27
- 63) Picconi, A. (2013). *Detección de virus papiloma humano en la prevención del cancer cérvico-uterino*. *Medicina (B. Aires)* vol.73 no.6.
- 64) Premoli, G., González A., Juana Villarreal, T. y Pierina Pietrocino, L. (2005). *Virus del papiloma humano; visión actual en biomedicina*. *Asociación Dental Mexicana* pp 213- 224.
- 65) Puig-Tintoré LM, Alba A, Cortes X, Bosch FX, Torné A et al. (2002). *La infección por Papilomavirus Separata de Documento de Consenso S.E.G.O.* Disponible en: <http://www.aepcc.org/congreso/pdf/CONS-VPH.pdf>
- 66) Pytynia KB, Dahlstrom KR and Sturgis EM. (2014). *Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer*. *Oral Oncology*: 50:380–6.
- 67) Rampias T, Sasaki C, Weinberger P. (2009). *E6 and E7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16 - positive oropharyngeal cancer cells*. *Journal of the National Cancer Institute*: 101:412-23.
- 68) Rawls, J.A.; Pusztai, R.; Green, M. (1990). *Chemical synthesis of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein: Autonomous protein domains for induction of cellular DNA synthesis and for trans activation*. *Journal of Virology*, 64, 6121–6129.
- 69) Roos-Mattjus, P. & Sistonen, L. (2004). *The ubiquitin-proteasome pathway*. *Annals of Medicine*. 36, 285- 295.
- 70) Saber CN, Grønhoj Larsen C, Dalianis T, Von Buchwald C. (2016). *Immune cells and prognosis in HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinomas: review of the literature*. *Oral Oncology*;58: 8–13.
- 71) Sturgis EM and Ang KK. (2011). *The epidemic of HPV-associated oropharyngeal cancer is here: is it time to change our treatment paradigms?* *J natl Compr Canc netw*: 9:665-73.
- 72) Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ et al. (2013) *HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity*. *Radiotherapy Oncology*;107(2):242–246.
- 73) Rocco JW. (2015). *Mutant Allele Tumor Heterogeneity (MATH) and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. *Head & Neck Pathology*: 9:1-5.
- 74) Rubio I et al., (2011). *The N-terminal region of the human papillomavirus L2 protein contains overlapping binding sites for neutralizing cross-neutralizing and non-neutralizing antibodies*. *Virology*; 402(2):348-359
- 75) Langlands FE, Dodwell D, Hanby AM, Horgan K, Millican-Slater R, Speirs V, Verghese E, Smith L and Hughes T. (2014). *PSMD9 expression predicts radiotherapy response in breast cancer*. *Molecular Cancer*: 13:73.
- 76) 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.
- 77) Thomas MK, Yao KM, Tenser MS, et al. (1999) *Bridge-1, a novel PDZ-domain coactivator of E2A-mediated regulation of insulin gene transcription*. *Molecular and Cellular Biology* 19: 8492- 8504.
- 78) Tomaić V, Ganti K, Pim D, Bauer C, Blattner C and Banks L. (2013). *Interaction of HPV E6 oncoproteins with specific proteasomal subunits*. *Virology*: 446(1-2):389-96.
- 79) Serrano B, Brotons M, Bosch FX, Bruni L. (2018). *Epidemiology and burden of HPV-related*

*disease*. Best Practice and Research in Clinical Obstetrics and Gynaecology; 47:14-26.

- 80) Smith L, Qutob O, Watson MB, Beavis AW, Potts D, Welham KJ, Garimella V, Lind MJ, Drew PJ, Cawkwell L. (2009). *Proteomic identification of putative biomarkers of radiotherapy resistance: a possible role for the 26S proteasome?* Neoplasia; 11(11):1194–1207.
- 81) Stanojevic V, Yao KM, Thomas MK. (2005). *The coactivator Bridge-1 increases transcriptional activation by pancreas duodenum homeobox-1 (PDX-1)*. Molecular and Cellular Endocrinology 237: 67-74.
- 82) Steinberg BM, et al. (1989). *Tissue site-specific enhancer function of the upstream regulatory region of human papillomavirus type 11 in cultured keratinocytes*. Journal of virology;63(2):957- 960.
- 83) Syrjanen S. (2004). *HPV infections and tonsillar carcinoma*. Journal of Clinical Pathology; 57:449-55
- 84) Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, et al. (2010). *Towards a knowledge-based Human Protein Atlas*. Nature Biotechnology, 28: 1248-1250.
- 85) Van Monsjou hS, Balm AJ, van den Brekel MM, et al. (2010). *Oropharyngeal squamous cell carcinoma: a unique disease on the rise?*. Oral oncology; 46:780-5.
- 86) Vigneswaran, N., & Williams, M. D. (2014). *Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis*. Oral and maxillofacial surgery clinics of North America, 26(2), 123–141.
- 87) Vigneswaran N, Tilashalski K, Rodu B, et al. (1995). *Tobacco use and cancer. A reappraisal*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology; 80(2):178–182.
- 88) Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM et al. (1999). “Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide,” The Journal of Pathology, vol.189, no. 1, pp. 12–19.
- 89) Weaver AN, Cooper TS, Rodriguez M et al. (2015). *DNA double strand break repair defect and sensitivity to poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibition in human papillomavirus 16-positive head and neck squamous cell carcinoma*. Oncotarget; 6(29): 26995–27007.
- 90) Wehmer, M.; Rudack, T.; Beck, F.; Aufderheide, A.; Pfeifer, G.; Plitzko, J.M.; Förster, F.; Schulten, K.; Baumeister, W.; Sakata, E. (2017). *Structural insights into the functional cycle of the ATPase module of the 26S proteasome*. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA; 114, 1305–1310.
- 91) Woelk, T., Sigismund, S., Penengo, L. & Polo, S. (2007). *The ubiquitination code: a signalling problem*. Cell division. 2, 11.
- 92) Wolf M et al. (2010). *Subunit interactions in bovine papillomavirus*. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America; 107(14): 6298-6303.

## 13 ANEXOS



XII Congreso Nacional de Virología  
Sociedad Mexicana de Virología, A.C.  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Del 29 de septiembre al 2º de octubre del 2021

Adriana Morán Torres  
Instituto Nacional de Cancerología

Estimado Congresista,

En nombre de la Sociedad Mexicana de Virología, tenemos el gusto de comunicarle que el trabajo que lleva como título, “PSMD9 increases its expression and relocates to the nucleus in the presence of the E6 oncoprotein of Human Papillomavirus type 16” ha sido aceptado para presentarse en la modalidad POSTER, con número AVI 01 en la sesión de posters del miércoles 29 de septiembre del 2021 en el horario de 4:45 a 6:00 pm (Hora central de México). En breve recibirá las instrucciones la elaboración y presentación de posters.

Los integrantes del Comité Organizador agradecemos su interés por participar en el XII Congreso Nacional de Virología y le enviamos un saludo.

Quedo de usted,

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero  
Organizador del Congreso Nacional de Virología 2021

Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza Nuevo León. A 01 de septiembre del 2021.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Otorga el presente reconocimiento a

**Adriana Moran**

Por su Asistencia al XII Congreso Nacional de Virología llevado a cabo del 29 de septiembre al 2° de octubre del 2021

Dr. José Ignacio González Rojas  
Director FCB-UANL

Dra. Cristina Rodríguez Padilla  
Responsable LIV

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero  
Organizador CNV 2021

Dr. Ramón A. González  
Presidente Sociedad Mexicana de Virología

Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México. Al 02 de octubre del 2021.