



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la mutación A7729T en la Región Larga de Control (LCR) de la variante Asiático-Americana del virus del papiloma humano 16 (VPH16) en líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
QFB. ALBERTO ZARZA VELA

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Jaime Berumen Campos
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Juan Carlos Gómora Martínez
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México. abril, 2024



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.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

“Efecto de la mutación A7729T en la Región Larga de Control (LCR) de la variante Asiático-Americana del virus del papiloma humano 16 (VPH16) en líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino”

que presenté para obtener el grado de ----Maestría-----es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

A blue ink handwritten signature, appearing to read 'Alberto Zarza Vela', written over a horizontal line.

**ALBERTO ZARZA VELA
408019758**

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Jaime Berumen Campos en el laboratorio de la Unidad de Medicina Genómica del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga".

Durante los estudios de Maestría el sustentante gozó de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, CVU/Becario: 819611/620355.

Se reconoce la colaboración y asesoría técnica de la Dra. Ana María Espinoza García, de la Dra. Eira Valeria Barrón Palma y de la M. en C. María Eligia Juárez Torres de la Unidad de Medicina Genómica.

Se agradecen los valiosos comentarios y observaciones del comité tutor que asesoró el desarrollo de este trabajo, así como de los miembros del jurado asignado para la revisión de la presente tesis.

Comité tutor:

Dra. Marcela Lizano Soberón, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, Instituto de Fisiología Celular-UNAM

Dr. Jaime Berumen Campos, Facultad de Medicina-UNAM

Jurado:

PRESIDENTE Dra. Leticia Rocha Zavaleta

SECRETARIO Dr. Greco Hernández Ramírez

VOCAL Dra. María Elena Ibarra Rubio

VOCAL Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez

VOCAL Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez

ÍNDICE

1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	3
2. RESUMEN	4
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1. Cáncer	6
3.2. Infección por virus del papiloma humano (VPH)	8
3.3. Cáncer cérvico uterino.....	8
3.4. Virus del Papiloma Humano (VPH).....	11
3.4.1. Genoma de VPH16.....	13
3.4.2. LCR.....	13
3.4.3. E6.....	14
3.4.4. Regulación transcripcional de genes virales.....	15
3.5. Factores de la carcinogénesis viral de CC.....	17
3.5.1. Tipo viral.....	17
3.5.2. Papel de los estrógenos.....	18
3.6. Incidencia de VPH y edad de presentación de CC.....	19
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVOS	23
6.1. Objetivo general.....	23
6.2. Objetivos particulares.....	23
7. METODOLOGÍA	24
7.1. Construcción de un vector para expresión.....	24
7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de LCR- <i>E6</i> de VPH16.....	24
7.3. Purificación de banda de producto de PCR.....	25
7.4. Clonación de insertos en el vector pCR TM 2.1-TOPO®.....	26
7.5. Transformación de células competentes XL10® Gold.....	27
7.6. Aislamiento de clonas.....	27
7.7. Ensayos de restricción.....	27
7.8. Secuenciación.....	27
7.9. Análisis de secuencias.....	28
7.10. Cultivo celular.....	28
7.11. Tratamiento con 17β-estradiol.....	29
7.12. Efecto de 17β-estradiol en la transcripción de <i>E6</i>	29
7.13. Transfección en C33A y HeLa.....	29
7.14. Extracción de RNA total.....	30
7.15. Verificación de la integridad del RNA y cuantificación.....	30
7.16. Tratamiento con Dnasa I.....	31
7.17. Reverso Transcripción.....	31
7.18. RT-qPCR	31
8. RESULTADOS	33
8.1. PCR de LCR- <i>E6</i> de VPH16.....	33
8.2. Clonación de los fragmentos de LCR- <i>E6</i> en el vector pCR 2.1 TOPO.....	34
8.3. Secuenciación del sitio múltiple de clonación.....	36
8.4. RNA total de células SiHa.....	40

8.5.	RNA de curso temporal post-transfección.....	41
8.6.	Efecto del tratamiento con Dnasa I.....	42
8.7.	Análisis de la expresión génica de <i>E6</i> en C33A transfectadas con pCR2.1TOPO-LCR- <i>E6</i> D2 C en un curso temporal.....	43
8.8.	RNA de C33A transfectadas con pCR 2.1-TOPO-LCR- <i>E6</i>	44
8.9.	Análisis de la expresión génica de <i>E6</i> en C33A transfectadas con cada una de las tres clonas.....	45
8.10.	Niveles de RNAm de <i>E6</i> en células C33A.....	46
8.11.	Ensayo de proliferación en presencia de 17 β -estradiol.....	47
8.12.	Efecto de 17 β -estradiol sobre la transcripción de <i>E6</i>	48
8.13.	Efecto de 17 β -estradiol sobre la transcripción de <i>E6</i> de cada una de las tres clonas.....	49
9.	DISCUSIÓN	51
10.	CONCLUSIONES	55
11.	LIMITACIONES	55
12.	REFERENCIAS	56

1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

IARC Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

OMS Organización mundial de la salud

INEGI Instituto nacional de estadística y geografía

VPH Virus del Papiloma Humano

VIH Virus de la Inmunodeficiencia Humana

CC Cáncer cérvico uterino

DNA Ácido desoxirribonucleico

RNA Ácido ribonucleico

RNA_t Ácido ribonucleico total

RNA_m Ácido ribonucleico mensajero

ORF Marco abierto de lectura

LCR Región larga de control

URR Región reguladora río arriba

AP-1 Proteína activadora-1

NF1 Factor Nuclear 1

SP1 Factor de transcripción humano

C/EBP- $\alpha\beta$ CCAAT/Proteína alfa de unión a potenciador, factor de transcripción que presenta la capacidad de unirse en forma de homodímero a ciertos promotores y potenciadores.

c-Myb Factor de transcripción de tipo hélice-giro-hélice implicado en la regulación de procesos como proliferación y diferenciación celular

NFATx Factor de transcripción implicado en la inducción de varios genes de citocinas

Pax5 Factor de transcripción con función durante la diferenciación de las células B.

WT1 Factor de transcripción que contiene cuatro motivos de dedos de zinc, asociado al tumor de Wilms.

2. RESUMEN

En las mujeres mexicanas, el cáncer cérvico uterino (CC) se sitúa como la segunda causa de mortalidad y la tercera en incidencia. La infección persistente por el virus del papiloma humano (VPH) es el factor principal de riesgo para el desarrollo de CC. El genoma del VPH presenta una región larga de control (LCR) que contiene elementos de respuesta reconocidos por activadores y represores transcripcionales, así como un promotor temprano denominado P97 para el tipo VPH16, que regula principalmente la transcripción de la región temprana viral (*E*). Esta región codifica para E6, una oncoproteína que contribuye de manera cooperativa a la inmortalización y transformación celular.

Aunque la infección por VPH es común, no todas las mujeres desarrollan CC, indicando la participación de otros factores en la carcinogénesis cervical. Entre estos factores se encuentran las hormonas sexuales, ya que diversos estudios han demostrado que 17 β -estradiol aumenta la expresión génica de VPH16, relacionándolo con el desarrollo de CC.

Se ha identificado que la variante D2 de VPH16 incrementa el riesgo de desarrollar CC antes de los 50 años en 3.3 veces en comparación con otras variantes. En el 72.0 % de los casos de CC tipificados con la variante D2 de VPH16, se encuentra la mutación A7729T en la LCR. Se postula que esta mutación podría aumentar la capacidad transcripcional del promotor P97, resultando en mayores niveles de mRNA de *E6*, lo que explicaría en parte la rápida progresión hacia el CC en pacientes con esta variante.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la mutación A7729T sobre la capacidad transcripcional de la variante D2. Se realizaron transfecciones en las líneas celulares C33A y HeLa (tratada con 17 β -estradiol) con plásmidos que integran LCR-*E6*, y se determinaron los niveles de transcripción del mRNA de *E6* mediante RT-qPCR. Los resultados establecen que la LCR-*E6* de la variante D2 con la mutación A7729T confiere el nivel más alto de transcripción de mRNA de *E6*, seguido por la mutación A7729C, mientras que la LCR-*E6* de A1/2 mostró el nivel más bajo de transcripción. Este perfil de expresión se confirmó en las células HeLa tratadas con 17 β -estradiol, sugiriendo una interacción entre esta hormona y VPH que podría favorecer la persistencia de la infección, especialmente cuando está presente la mutación A7729T.

3. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades más devastadoras para la humanidad, sus estadísticas muestran una visión impactante de la magnitud de esta enfermedad. De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que en el año 2020 hubo aproximadamente 19.3 millones de nuevos casos y 10 millones de muertes a nivel mundial. Cerca del 70 % de las muertes por cáncer se registran en países de ingresos medios y bajos. Las infecciones oncogénicas, entre ellas las causadas por virus de la hepatitis o por papilomavirus humanos, ocasionan el 25 % de los casos de cáncer en los países de ingresos medios y bajos (1).

En México, el cáncer es un problema importante de salud pública, ya que es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. En el año 2020 se registraron 1,086,743 defunciones, de las cuales 8.0 % fueron por tumores malignos (90,603 casos). La tasa de defunciones por esta causa aumentó durante la última década, al pasar de 6.18 defunciones por cada 10 mil personas en 2010 a 7.17 por cada 10 mil personas en 2020 (INEGI).

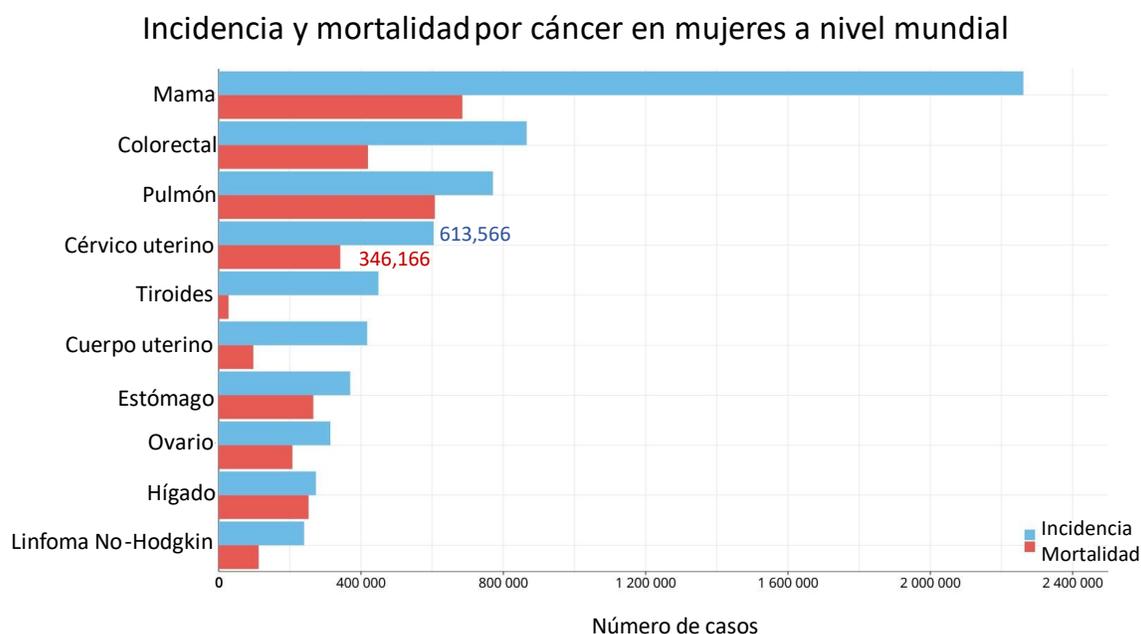


Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres en el mundo. Se grafican el número de casos y muertes en el año 2020. <http://gco.iarc.fr>

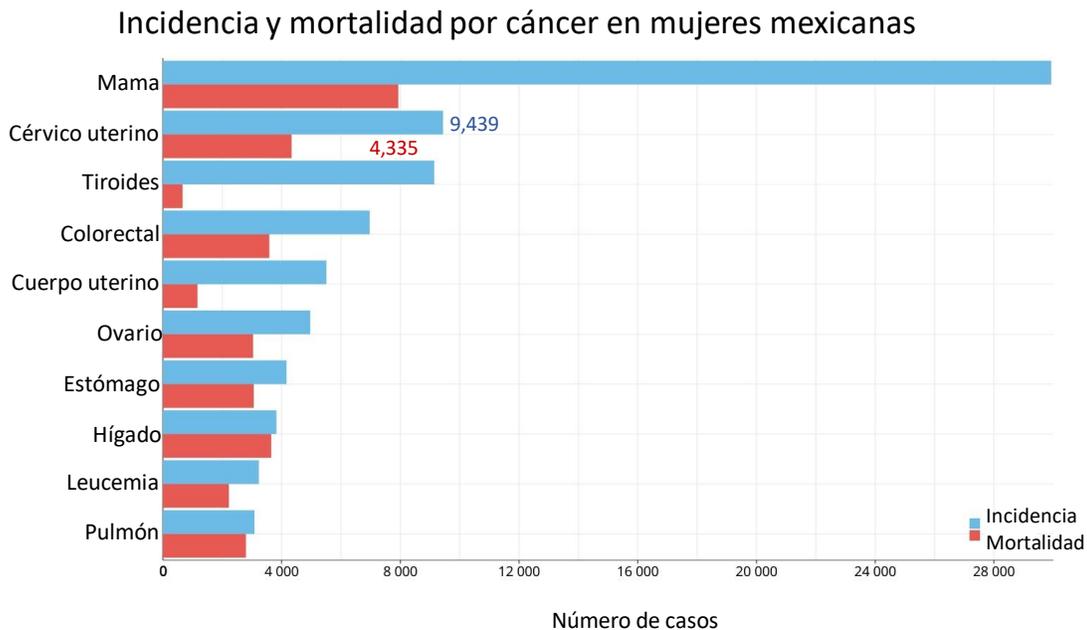


Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres en México. Se grafican el número de casos y muertes en el año de 2020. <http://gco.iarc.fr>

3.1. Cáncer

El “cáncer” es un término general que se utiliza para describir un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales. En condiciones normales, las células del cuerpo se dividen, crecen y mueren en un proceso regulado que mantiene el equilibrio y la homeostasis. Sin embargo, en el cáncer, este proceso se ve alterado, y las células malignas pueden acumularse y formar masas de tejido llamadas tumores, estos tumores pueden extenderse más allá de sus límites habituales e invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina metástasis. (3).

El cáncer surge de la transformación de células normales en células tumorales en un proceso de múltiples etapas que generalmente progresa de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estos cambios son el resultado de la interacción entre los factores genéticos de una persona y 3 categorías de agentes externos, que incluyen (3):

- Carcinógenos físicos: como radiación ultravioleta y ionizante;

- Carcinógenos químicos: como asbesto, componentes del humo del tabaco, aflatoxina (un contaminante de los alimentos) y arsénico (un contaminante del agua potable)
- Carcinógenos biológicos: como infecciones con ciertos virus, bacterias o parásitos.

El envejecimiento es otro factor fundamental para el desarrollo del cáncer. La incidencia de cáncer aumenta drásticamente con la edad, debido a una acumulación de riesgos. La acumulación de riesgo general se combina con la tendencia a que los mecanismos de reparación celular sean menos efectivos a medida que una persona envejece.

El consumo de tabaco y alcohol, la dieta poco saludable y la inactividad física son los principales factores de riesgo de cáncer en todo el mundo y también son los 4 factores de riesgo compartidos con otras enfermedades no transmisibles (1).

Factores genéticos relacionados con el desarrollo de cáncer: mutaciones genéticas hereditarias, predisposición genética, inestabilidad genómica:

Genes supresores de tumores: son responsables de la regulación del ciclo celular y la prevención de la formación de tumores. Estos genes codifican proteínas que participan en la inhibición del ciclo celular, la reparación de DNA y la inducción de la apoptosis. Cuando estos genes se alteran por mutaciones o inactivan, pueden permitir que las células se dividan sin control, lo que aumenta el riesgo de desarrollar cáncer, ejemplos clave de genes supresores de tumores: *p53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RB1*, *PTEN* y *APC* (7).

Oncogenes: A diferencia de los genes supresores de tumor, los oncogenes promueven el crecimiento celular y la proliferación cuando están activados. Tipos de oncogenes: factores de crecimiento (factores de crecimiento epitelial EGF), receptores de crecimiento (como el factor de crecimiento epidérmico EGFR), proteínas de señalización celular (7).

Algunas infecciones crónicas son factores de riesgo de cáncer y tienen mayor relevancia en los países de ingresos bajos y medianos. Aproximadamente el 15 % de los cánceres diagnosticados en 2012 se atribuyeron a infecciones, como *Helicobacter pylori*, virus del papiloma humano (VPH), virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C y virus de Epstein-Barr (4).

Los virus de la hepatitis B y C y algunos tipos de VPH aumentan el riesgo de cáncer de hígado y de cáncer cérvico uterino (CC), respectivamente. La infección por el VIH aumenta sustancialmente el riesgo de cánceres como el de CC (4).

3.2. Infección por virus del papiloma humano (VPH)

La infección viral por VPH es la más común del tracto reproductivo (Fig. 3 y 4). La mayoría de las mujeres y hombres sexualmente activos se infectarán en algún momento de sus vidas y algunos pueden infectarse repetidamente (4).

Las infecciones por VPH generalmente desaparecen sin ninguna intervención unos meses después de la adquisición, y aproximadamente el 90.0 % desaparecen en 2 años, sin embargo, una pequeña proporción de infecciones con ciertos tipos de VPH pueden resistir y progresar a cáncer cérvico uterino (CC) [5].

El CC es la enfermedad más relacionada con el VPH. Casi todos los casos de CC (99.7 %) pueden atribuirse a la infección por VPH (5).

Los tipos de VPH que no causan cáncer (especialmente los tipos 6 y 11) pueden causar verrugas genitales y papilomatosis respiratoria y rara vez provocan la muerte. Las verrugas genitales son muy comunes, altamente infecciosas y afectan la vida sexual (5).

Aunque la mayoría de las infecciones por VPH desaparecen por sí solas y la mayoría de las lesiones precancerosas se resuelven espontáneamente, existe el riesgo de que la infección por VPH se convierta en crónica y las lesiones precancerosas progresen a cáncer de cuello uterino invasivo (5).

Se necesitan de 15 a 20 años para que el CC se desarrolle en mujeres con sistemas inmunitarios normales, sin embargo, solo puede llevar de 5 a 10 años en mujeres con sistemas inmunitarios debilitados, como aquellas con infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH) no tratada (4).

3.3. Cáncer cérvico uterino

El cáncer cérvico uterino (CC) es un cáncer que se origina en las células del cuello del útero (Fig. 3 y 4). También se puede mencionar como cáncer cervical, cáncer de cérvix o cáncer de cuello uterino. En todo el mundo, el CC es el cuarto cáncer más frecuente en mujeres, con un estimado de 613,566 casos nuevos y 346,166 muertes estimadas por CC, más del 85 % de ellas ocurren en países de ingresos bajos y medianos (Fig. 1) [1].

En los países de ingresos bajos y medianos, el acceso a medidas preventivas es limitado y el CC a menudo no se identifica hasta estadios avanzados con la aparición de síntomas. Además, el acceso al tratamiento de esta enfermedad en etapa avanzada (por ejemplo,

cirugía de tumor, radioterapia y quimioterapia) puede ser muy limitado, lo que da como resultado una mayor tasa de muerte por CC en estos países (4).

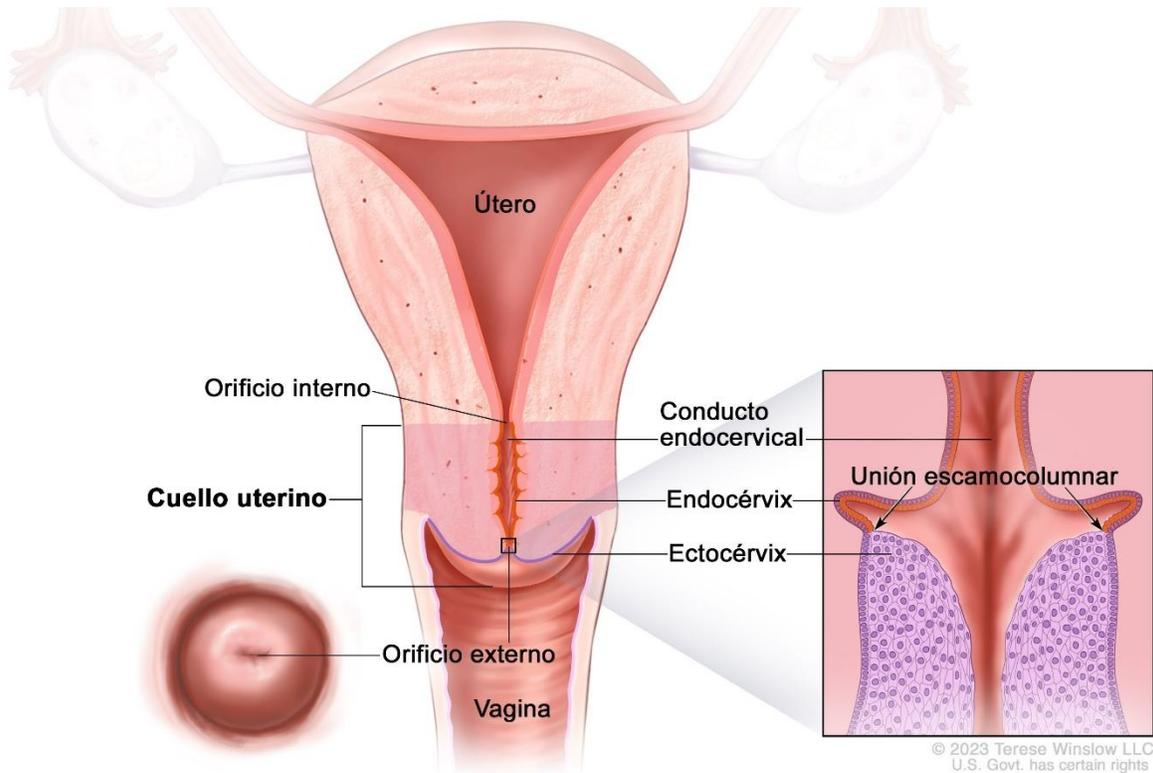


Figura 3. Características anatómicas del cuello uterino. El cuello uterino es la porción final, inferior y estrecha del útero que conecta al útero con la vagina. Está formado por el orificio interno (abertura entre el cuello uterino y la parte superior del útero), el endocérvix (parte interna del cuello uterino que forma el conducto endocervical), el ectocérvix (parte externa del cuello uterino que se conecta con la vagina) y el orificio externo (abertura entre el cuello uterino y la vagina). El área donde el endocérvix se une al ectocérvix se llama unión escamocolumnar, y contiene células glandulares (células delgadas y planas) del ectocérvix. La unión escamocolumnar también se conoce como zona de transformación.

El CC surge a partir de una vía de cuatro pasos: transmisión del VPH, persistencia viral, progresión de una clona con infección persistente a precáncer, e invasión a través de la membrana basal del epitelio. El VPH infecta a las células basales pasando a través de micro abrasiones en el epitelio cervical y comienza a replicar su genoma dentro de la célula de forma episomal. La progresión a cáncer invasivo está asociada a la integración del DNA viral al genoma del hospedero (Fig. 4) (6).

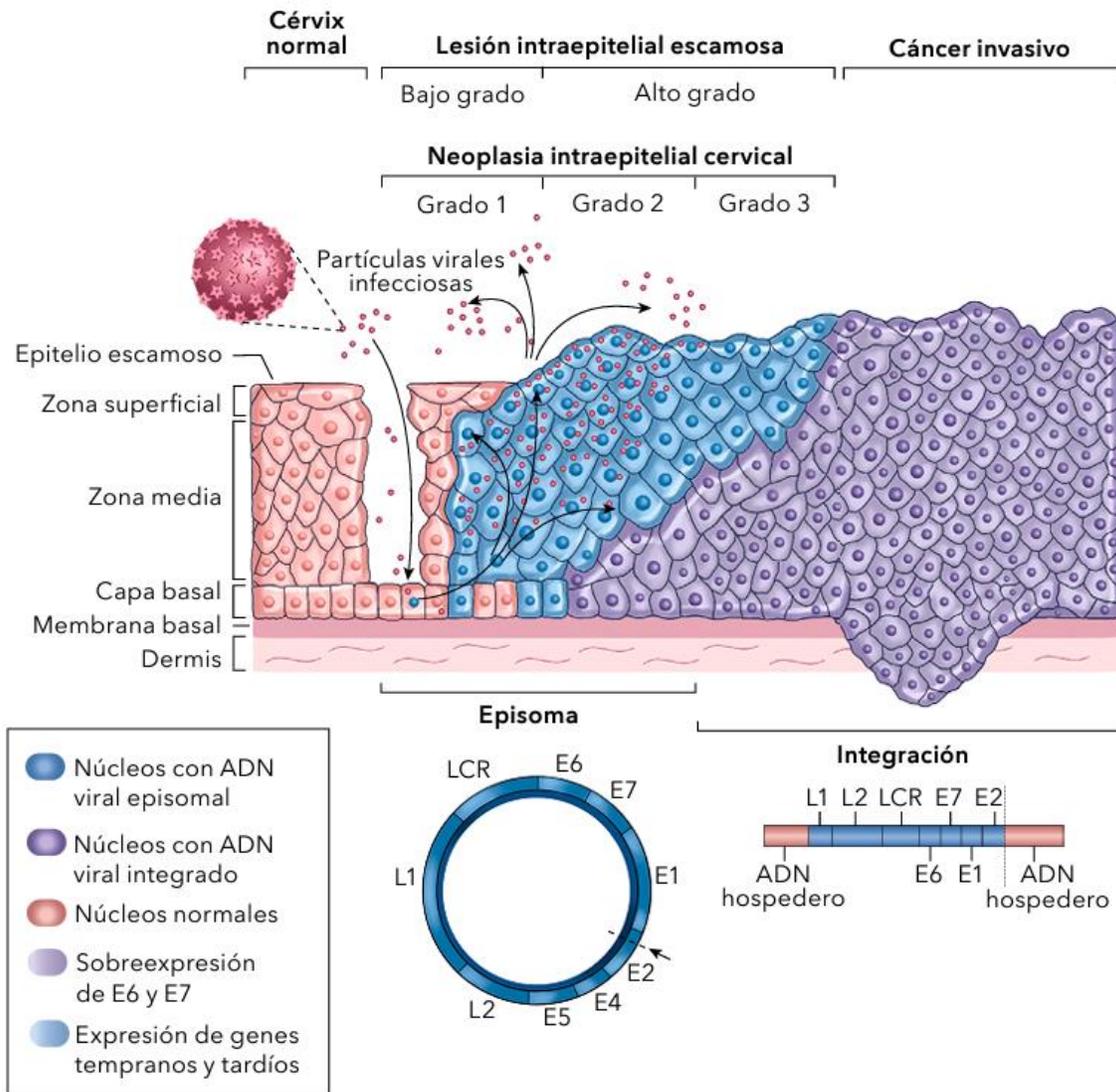


Fig 4. Historia natural de la infección del VPH y su asociación con cáncer cérvico uterino. El virus del papiloma humano (VPH) accede a las células basales a través de microabrasiones en el epitelio cervical. Después de la infección se expresan los genes tempranos E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y el ADN viral se replica a partir del ADN episomal. En las capas superiores del epitelio (las zonas media y superficial), el genoma viral se replica aún más y se expresan los genes tardíos L1 y L2, y E4. L1 y L2 encapsulan los genomas virales para formar partículas virales en el núcleo, las cuales son excretadas e inician una nueva infección. Las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado corresponden a la infección con replicación activa del virus. En el caso de las infecciones por VPH de alto riesgo, existe la posibilidad de desarrollar una lesión intraepitelial escamosa de alto grado. La progresión posterior de estas lesiones de alto grado, sin tratamiento adecuado, hacia un cáncer invasor, se asocia con la integración del genoma del VPH de alto riesgo en los cromosomas del hospedero. Tomada y modificada (10).

La infección por VPH que progresa a cáncer incluye varios procesos como la integración del genoma viral, la división celular incontrolada, y la participación de cambios celulares y epigenéticos (6). Luego de la infección inicial por un virus de alto riesgo, como VPH16, su genoma se conserva en forma episomal, lo cual tiene como manifestación las lesiones intraepiteliales de bajo grado iniciales (Fig. 4). Los VPH de alto riesgo inducen la transformación de las células como resultado del aumento en la expresión de las proteínas virales E6 y E7, lo cual conduce a la integración del genoma viral al celular (9). Con la integración del ADN viral, el ADN celular sufre una serie de mutaciones que inducen la proliferación celular y la inhibición de mecanismos celulares apoptóticos (8). La proteína viral E6 se une a p53 del hospedero, una proteína supresora de tumores, induciendo su degradación y, por lo tanto, aumentando la proliferación celular (9). Por otro lado, la proteína viral E7 se une a la proteína de retinoblastoma (pRB), otra proteína supresora de tumores, causando su inactivación y degradación (9).

3.4. Virus del Papiloma Humano (VPH)

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, cuyos miembros se caracterizan por ser virus pequeños de DNA circular de doble cadena capaces de infectar el epitelio estratificado (Fig.3 y 4). Más de 200 tipos virales han sido descritos, con una diferencia del 10 % en su genoma (11). A nivel mundial el virus del papiloma humano tipo 16 (VPH16) es detectado en aproximadamente el 50 % de los casos de CC, seguido por el VPH18 en un 15 % (12).

El marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) de *L1*, es el gen más conservado dentro del genoma viral por lo que se ha utilizado para la identificación de nuevos tipos de VPH. Un nuevo VPH es reconocido como tal si su genoma completo ha sido clonado y la secuencia de DNA del ORF de *L1* difiere por más del 10 % del tipo de VPH conocido más cercano. Las diferencias en homología entre 2 % y 10 % se definen como subtipo o linaje y menos del 2 % como variante (13).

En 1993 Ho y colaboradores realizaron el primer estudio de linajes de **virus de papiloma humano tipo 16** (VPH16) utilizando la región larga de control (LCR, por sus siglas en inglés), quienes reportaron 4 linajes o subtipos principales: el europeo (**E**), el asiático-americano (**D**), y los africanos 1 (**Af1**) y 2 (**Af2**). Sus nombres derivan de la procedencia geográfica de las poblaciones en las que son más frecuentes (13, 26).

Actualmente, basado en la secuenciación completa del genoma de VPH, el **VPH16** se puede dividir en cuatro linajes o subtipos principales:

A: incluidos A1-A3 (anteriormente denominado Europeo) y A4 (Asiático);

B: incluidas B1 (africano 1a) y B2 (africano 1b)

C: Afri2a

D: D1 (antes norteamericana NA1), **D2** (antes asiático-americana AA2) y D3 (antes asiático-americana AA1) (13).

Para efectos de este trabajo se utilizará la nomenclatura A1/2 para la variante europea y D2 para la variante asiático-americana de VPH16.

Los VPH se dividen en dos grupos con base a sus propiedades oncogénicas; los de alto riesgo, que incluyen VPH 16 y 18, considerados los más virulentos y responsables del 70.0 % de los casos de cáncer cervical, y los de bajo riesgo, que ocasionan lesiones benignas como los condilomas y la papilomatosis respiratoria recurrente, entre otras (14).

VPH	Genotipos	Enfermedad asociada
Alto riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Cáncer cervical, anal, vaginal, vulvar, orofaríngeo y lesiones precursoras asociadas
Bajo riesgo	6, 11	Verrugas genitales, papilomatosis respiratorio recurrente
Probablemente carcinogénico*	68	Cáncer cervical
Posiblemente carcinogénicos*	5,8	Carcinoma de células escamosas de la piel en pacientes afectados por epidermodisplasia verruciforme
Posiblemente carcinogénicos*	26, 30, 34, 53, 66, 67, 70, 73, 82, 85, 97	Incierta

*De acuerdo a la evaluación de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) [1].

Tabla 1. Clasificación de los papilomavirus (VPH) de acuerdo con el riesgo oncogénico y las enfermedades asociadas (1).

3.4.1. Genoma de VPH16

El genoma del VPH16 (Fig. 5) contiene una LCR o región reguladora río arriba (URR) localizada entre el último codón del gen *L1* (codifica para la principal proteína estructural de la cápside) y el inicio del gen *E6* (codifica para la proteína del mismo nombre). Esta secuencia contiene elementos de respuesta que son reconocidos por proteínas reguladoras como activadores transcripcionales, represores, terminadores e iniciadores de replicación (16-18). Además, incluye el promotor temprano P97 para VPH16 y P105 para VPH18 (18) que regulan principalmente la transcripción de la región temprana viral (*E*) codificando seis ORF. El genoma viral codifica a seis proteínas E (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y dos proteínas L (L1 y L2). Las proteínas virales E1 y E2 son necesarias para la replicación del genoma; E4 tiene implicación en la liberación del virión; E5 activa el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) (19); E6 y E7 son las oncoproteínas más importantes (20) que ejercen de manera cooperativa inmortalización celular y transformación interfiriendo con la función de dos proteínas supresoras de tumor, p53 y Rb, respectivamente (21). La proteína E6 se une a la proteína p53 estimulando la degradación de p53, la cual está activamente participando en la regulación del ciclo celular y apoptosis (22-26). La proteína E7 interactúa con la forma hipofosforilada de Rb interfiriendo con su unión a E2F (factor de transcripción celular, lo que resulta en la liberación de E2F. Esto subsecuentemente, activa los genes esenciales para la progresión de la fase G1 a la S (25).

Los genes *L1* y *L2* codifican para las proteínas de la cápside. La proteína L2, es la minoritaria de la cápside viral, que como L1, se produce en células que expresan E4 (27). La proteína mayoritaria L1 y que conforma cerca del 80 % de la cápside, se expresa después de L2. La cápside contiene 360 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros de una partícula icosaedral (27).

3.4.2. LCR

La LCR contiene elementos regulatorios de la transcripción viral específicos de células epiteliales (29). Factores de transcripción que interactúan con la LCR han sido ampliamente caracterizados, incluyendo AP-1, NF1, Oct1, SP1 y YY1, los cuales pueden activar o reprimir la transcripción viral (30). De igual manera se ha reportado que algunos factores de transcripción como C/EBP- α , - β , c-Myb, NFATx, Pax5 y WT1 están involucrados en la expresión de genes virales tempranos y tardíos (31).

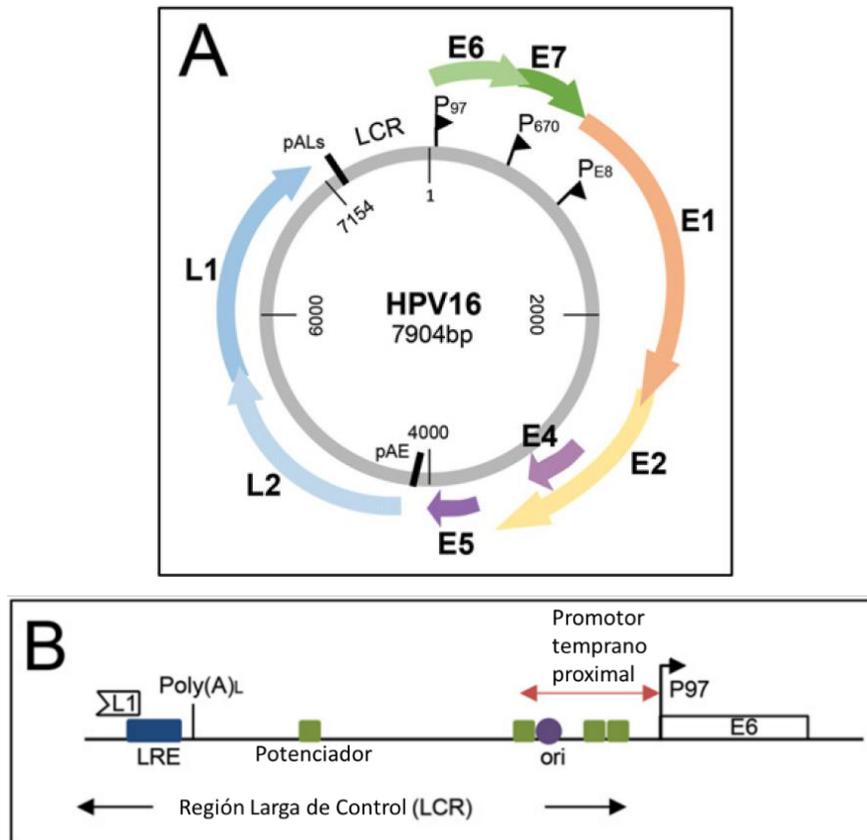


Figura 5. El genoma de VPH16. (A) Diagrama del genoma circular de doble hebra de VPH16 (círculo gris). Otros genomas de VPH son muy similares en organización. Los ORF virales están indicados con arcos de colores sobre el genoma. Los promotores se indican con la letra P y flechas (P97, P670, PE8). Los sitios de poliadenilación temprano (pAE) y tardíos (pALs) están indicados con líneas negras sobre el genoma circular. (B) Detalles en la LCR. El ORF de E6 está mostrado como un rectángulo. El final del ORF de L1 está mostrado como un rectángulo parcialmente abierto. El promotor temprano (P97) está indicado con una banderilla. La región promotora proximal está indicada con una doble flecha roja. Cuatro sitios de unión de E2 son indicados con cuadrados verdes. El origen de replicación (ori) al cual se une E1 está indicado como un círculo morado. El sitio de poliadenilación tardío está indicado como Poly(A)L. El elemento regulatorio tardío (LRE) que controla la expresión génica tardía está indicado con una caja azul. Modificado de Graham, 2017 (9).

3.4.3. E6

El gen *E6*, de aproximadamente 450 a 500 pb, codifica para una proteína de casi 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa. La proteína del gen *E6* tiene un potencial oncogénico en líneas celulares y coopera con la proteína E7 para la plena capacidad transformante e inmortalizante. La proteína E6 es de las que se producen tempranamente durante una infección por VPH. Esto le confiere varias funciones que

alteran el ambiente celular, como por ejemplo el bloqueo de la apoptosis mediante la degradación de p53, la alteración de la transcripción de genes celulares a través de la interacción con p300 y CBP incremento de la vida celular por la sobre activación de la telomerasa (32). La acción clave de E6 de los VPH de alto riesgo (E6-AR) es inhibir la función de p53, una proteína supresora de tumores, mediante su degradación por la vía de la ubiquitinación (22). Para ello E6 requiere a la proteína celular asociada a E6 (E6-AP). Esta proteína reemplaza a Mdm2, que en células normales no infectadas es quien degrada a p53. Este cambio reduce dramáticamente el nivel de proteína en las células de CC a menos de la mitad del nivel presente en las células normales. La mayoría de las proteínas E6 de los VPH de bajo riesgo (E6-BR) no se unen a p53 o lo hacen débilmente. E6 también puede retener a p53 en el citoplasma bloqueando su translocación al núcleo y así inhibiendo su función independientemente de su degradación (32). E6 puede superar la apoptosis dependiente e independiente de p53. Respecto a esto último se ha visto que E6 interactúa con Bak, una proteína proapoptótica que se expresa en altos niveles en las capas superiores del epitelio en diferenciación (33).

3.4.4. Regulación transcripcional de genes virales

La regulación de la transcripción de los genes de VPH16 es un proceso complejo que implica interacciones específicas entre las proteínas virales y la maquinaria celular del huésped. Dado que el VPH16 es un virus de ADN de doble cadena que infecta células epiteliales, su ciclo de replicación está vinculado al estado de diferenciación de las células epiteliales infectadas (28). Aspectos clave de la regulación de la transcripción de los genes de VPH16 son:

Promotores y elementos reguladores: El VPH tiene dos promotores principales, el promotor temprano y el promotor tardío (Fig. 5). En VPH16, P97 y P670 han sido identificados como promotor temprano y tardío, respectivamente. También ha sido localizado un intensificador transcripcional dentro de la LCR, al cual se han asociado varios factores de transcripción celulares. Los sitios de unión del regulador transcripcional E2 (E2BS), están localizados en la LCR de VPH16. La expresión génica viral es regulada por el estado de ocupación de estos sitios de unión para E2BS, ocupación que está parcialmente definida por la expresión de E2 que a su vez está controlada por el estado de diferenciación celular (36, 37, 38). E2 tiene una función en la segregación del genoma viral a través de la unión del DNA viral a la cromatina mitótica, en dicha unión está implicada la proteína 4 con “bromodominio” (Brd4). La interacción entre E2 y Brd4 es requerida para la

activación y represión transcripcional mediada por E2 (36,37). El factor de transcripción ubicuo, Sp1, es bien conocido por ser regulador de la expresión génica de VPH. Los sitios de unión de Sp1 están parcialmente sobrelapados con un E2SB (E2SB#2), y una caja TATA localizada muy cerca del E2BS#1. La unión de E2 a sus E2SBs, además, interfiere con el ensamblaje del complejo de iniciación transcripcional, resultando en la supresión de la expresión de *E6/E7* que es gobernada para la actividad del promotor temprano (38, 39).

Proteínas virales: la proteína viral E6 interactúa con factores de transcripción como p53, p300/cbp y NFX1-91 y la proteína viral E7 interactúa con la proteína del retinoblastoma (pRb), con la liberación del factor de transcripción E2 (E2F), p21, p130 y el factor de transcripción activador de proteínas 1 (AP-1) [40].

Diferenciación celular: el blanco de la infección por VPH es el epitelio estratificado. En el epitelio normal, la célula que está anclada a la membrana basal es la única que tiene potencial de proliferación (Fig. 3 y 4). La célula basal se dividirá en nuevas células basales, una célula hija se desanclará de la membrana basal iniciando un proceso de diferenciación. Esta célula hija saldrá del ciclo celular y cambiará su patrón de expresión génica con lo que terminará de diferenciarse y separarse del epitelio. El ciclo de replicación de VPH está estrictamente regulado por el programa de diferenciación de las células hospederas (Fig. 4). Después de entrar en la célula, el DNA genómico de VPH es transportado al núcleo y se mantiene de forma episomal en un bajo número de copias dentro de las células basales (50-100 copias por célula) en la fase temprana del ciclo viral. Después de dejar la membrana basal las células infectadas inician el programa de diferenciación. A medida que estas células se dividen, producen células hijas que maduran hacia la superficie epitelial. Diferentes eventos en el ciclo de vida del virus se activan durante esta migración. Las células en las capas inferiores expresan E6 y E7 y son conducidas a través del ciclo celular y estimuladas a dividirse. En las capas intermedias las proteínas necesarias para la amplificación del genoma aumentan en estas células. Estas células expresan la proteína E4 viral y están en las fases S o G2 del ciclo celular. En las capas epiteliales superiores, las células abandonan el ciclo celular y en un subconjunto de células E4-positivas, se sintetizan las proteínas L1 y L2 del virus, lo que permite su ensamblaje (9) (Fig. 4).

3.5. Factores de la carcinogénesis viral de CC

Actualmente está bien establecido que la infección con tipos de VPH de alto riesgo es la causa necesaria para el desarrollo de CC. Sin embargo, la infección por sí sola no es suficiente y existen otros factores exógenos o endógenos que, en conjunción con el VPH, influyen en el riesgo de progresión de la infección por VPH a CC.

Estos factores se clasifican en tres grupos: 1) factores ambientales o exógenos, incluyendo el uso de anticonceptivos orales, el consumo de tabaco, la dieta, el trauma cervical y la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y otros agentes de transmisión sexual; 2) factores virales, como la infección por tipos específicos, la coinfección con otros tipos, variantes de VPH, la carga viral y la integración viral; y 3) cofactores del huésped o endógenos, incluidas las **hormonas**, factores genéticos, tales como el antígeno leucocitario humano y otros factores relacionados con la respuesta inmune del huésped.

3.5.1. Tipo viral

Los genomas del linaje **D** y **A** de VPH16 difieren en aproximadamente 1.0 % (44), sin embargo, para algunos genes como *E2* (45), difieren hasta en un 2 %. Esta diferencia en el genoma es suficientemente grande como para esperar cambios funcionales entre dos entidades biológicas. De hecho, diferencias biológicas respecto a la transformación celular han sido reportadas entre los linajes **D** y **A** (42). La unión de la proteína *E2* de las variantes del linaje **A** tiene cuatro sitios de unión en la LCR disminuyendo la expresión de *E6* y *E7* (43). Sin embargo, experimentos *in vivo* demuestran que *E2* de la variante D2, en contraste con la *E2* de **A**, no reprime significativamente la transcripción de *E6* y *E7*, además la LCR de D2 es menos susceptible a la represión por *E2* (43). Si esto ocurre *in vivo*, la expresión de oncogenes virales de D2 puede ocurrir inmediatamente después de la infección, ya que la proteína *E2* no reprime la LCR viral. En contraste, con infecciones por linaje **A**, la progresión de estadios más avanzados puede tomar lugar más lentamente, como consecuencia de que la transcripción de los oncogenes *E6* y *E7* es reprimida por la proteína *E2* (46, 49). Variantes del linaje **A** pierden el gen *E2* durante la integración viral al genoma de las células tumorales más frecuentemente que las variantes D2 y D3 (50, 45, 46) pero esto ocurre ya tarde en el desarrollo del tumor (52). Basados en experimentos *in vitro*, la proteína *E2* de D3, la cual difiere en cinco posiciones con la proteína *E2* de D2, reprime la expresión de oncogenes virales de forma similar a la proteína *E2* de las variantes del linaje

A (46). Así como lo que ocurre con variantes del linaje A, lo anterior podría explicar el retraso en la progresión de CC. Otro factor que puede estar implicado en la edad de presentación de la enfermedad, es el número de copias virales en el tumor (55,56). En la mayoría de los casos de CC, las variantes del linaje D retienen los genes E1/E2 y la carga viral es muy alta; en promedio, es dos veces más alta que la carga viral en tumores infectados por el linaje A (45). No obstante, esto parece no ser un factor clave en el tiempo de desarrollo de CC, ya que D3 tiene una carga viral igual de alta. Se sabe que el oncogen E6 de variantes del linaje D tiene mayor potencial carcinogénico en comparación con las variantes del linaje A (42, 47).

3.5.2. Papel de los estrógenos

La positividad de la variante D2 de VPH16 empieza a disminuir de los 35 (26.0 %) a los 50 años (4.0 %), este declive puede relacionarse con la menopausia, sugiriendo que D2 es susceptible a influencias hormonales. Inferir una asociación causal entre las hormonas y la infección por VPH resulta complicado (58).

El cérvix es una porción fibromuscular inferior del útero que responde a los estrógenos (Fig. 3). En particular, el ectocervix es el sitio de iniciación de la tumorigénesis, es altamente sensible a la estimulación hormonal esteroidea (72-77).

Ciertas secuencias que han sido encontradas en el genoma de VPH podrían asemejarse a secuencias de respuesta a estrógenos (72- 77). La expresión génica mediada por la LCR de VPH16 ya ha sido estudiada en respuesta a estrógenos sintéticos y naturales, pero, este estudio tenía varias limitaciones como el uso de una concentración suprafisiológica de estradiol (100 nM), la cual no representa a la concentración fisiológica (1-10 nM) ni la concentración farmacológica (más de 10 μ M) de estradiol. Además, el antiestrógeno tamoxifeno aumentó la expresión viral a través de la LCR, sin embargo, no se llevaron a cabo análisis estadísticos (75).

Los estrógenos pueden ejercer control sobre mecanismos nucleares a través del complejo ER-estrógeno con secuencias de DNA específicas regulatorias conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE) presentes en la LCR (76). Dos elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) en las posiciones 7477-7491 y 7643-7657 en la LCR, así como varios GREs y EREs, han sido identificados en el genoma de VPH16 (77, 78).

El promotor de VPH contiene siete diferentes regiones con un alto grado de similitud a la secuencia consenso ERE (5'-GGTCANNNTGACC-3'), de estas secuencias la mitad son

incompletas o palíndromos parciales. Los ERE también son conocidos por unirse a variantes de elementos de respuesta como GRE (5'GGTACANNNTGTTCT3'), elementos que difieren por dos pares de bases del ERE (58, 74).

El estradiol es una hormona sexual femenina del grupo de los estrógenos que es sintetizada en los ovarios y que participa en el desarrollo sexual de la mujer. Entre otras cosas, esta hormona estimula la secreción de moco uterino y el engrosamiento del endometrio. El mecanismo de acción se lleva a cabo a través de la unión del estradiol a un factor de transcripción específico denominado receptor de estrógenos (ER), localizado en el citoplasma y en el núcleo celular, y el cual, al unirse a su ligando, forma dímeros que a su vez regulan la transcripción de genes blanco para esta hormona. Actualmente se han identificado dos receptores de estrógeno conocidos como $ER\alpha$ y $ER\beta$, los cuales forman homodímeros o heterodímeros una vez que se han unido a su ligando (59). Se ha descrito que $ER\alpha$ está implicado en el desarrollo de CC, ya que, en su ausencia, el cáncer no se observa (82).

En el caso del CC, numerosos análisis estadísticos relacionan el uso prolongado de anticonceptivos hormonales con la susceptibilidad de desarrollar este tipo de cáncer, aunque aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual se produce este efecto (60, 61).

17β -estradiol es una hormona que ha sido ampliamente relacionada con el desarrollo de CC. Se ha probado en modelos murinos que expresan E6/E7 de VPH16, que el CC solo se desarrolla cuando hay una exposición crónica a esta hormona (85). También se ha estudiado que 17β -estradiol puede regular la expresión de los oncogenes E6 y E7 de células SiHa debido a que VPH16 contiene secuencias similares a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en la región promotora y el receptor nuclear de estrógeno puede unirse a este ERE (75).

3.6. Incidencia de VPH y edad de presentación de CC

El VPH16 es el tipo viral más común mundialmente y es encontrado en aproximadamente 50.0 % de los casos de CC, seguido por VPH18, VPH45 y VPH31 (14).

Estudios han examinado los cambios en la positividad para VPH16 en mujeres con CC y muestran que la frecuencia de VPH16/18 es más alta en mujeres jóvenes alrededor del mundo (63).

La distribución de casos de CC sigue una curva estándar, con un máximo de presentación a los 50 años. Además, la mitad de los casos de CC son diagnosticados en mujeres premenopáusicas jóvenes y la otra mitad en mujeres posmenopáusicas (66). La mayoría de los casos de CC ocurren a los 15-20 años después de la infección inicial de VPH (8). De acuerdo con la distribución de la frecuencia de VPH en mujeres sanas, esta latencia puede ser explicada en la mayoría de los casos de CC en mujeres jóvenes y de mediana edad, pero no en casos de mujeres mayores de 50 años (15). Estas mujeres pudieron haber adquirido el VPH poco antes de la presentación de la enfermedad o muchos años antes. En cualquier caso, los datos sugieren que los eventos que llevan a la carcinogénesis cervical en pacientes mayores pueden diferir de los respectivos en pacientes jóvenes. El promedio de edad de los pacientes con CC, quienes son positivos para VPH16, 18 o 45 es menor que la de los pacientes infectados con otros VPH (66). Un estudio en México documentó que el porcentaje de positividad de VPHs de alto riesgo en casos de CC varía con la edad de los pacientes. Se identificaron 3 tendencias diferentes, una para el VPH16, otra para el VPH18/45 y otras para otros VPH. En el caso de VPH16, la positividad porcentual alcanzó su punto máximo (63.2 %) a los 35 años; y luego disminuyó gradualmente hasta los 56-60 años (31.1 %). Se encontró un segundo pico (52.5 %) entre los 61-65 años, seguido de una disminución conforme aumenta la edad. La positividad porcentual del VPH18/45 mostró una tendencia decreciente desde mujeres más jóvenes (19.3 %) hasta mayores (> 70 años, 12.8 %). En cambio, la positividad porcentual de los otros VPH de alto riesgo aumentó de mujeres jóvenes (15.8 %) a mayores (46.2 %). Estos datos indican que la mayoría (> 80.0 %) de los casos de CC en mujeres jóvenes dependen de la presencia de VPH altamente oncogénicos (Tipos 16, 18 y 45) [66]. En contraste, cerca de la mitad de los casos de CC en pacientes mayores fueron asociados con VPH menos oncogénicos.

La tendencia bimodal de positividad por edad de VPH16 en CC (65) sugiere la presencia de dos tipos de infección debida a variantes diferentes, cambios genéticos y/o fisiológicos o a factores en los estilos de vida de los pacientes.

También en México, se ha registrado que cerca del 40 % de las infecciones por VPH16 se deben a las variantes asiático-americana D2 y D3, que confieren 9 veces mayor riesgo que la variante A1/2 para el desarrollo de CC. Además, las pacientes D2-positivas son, en promedio, 6 años más jóvenes que los pacientes positivos para A1/2 y D3 (67). Esto sugiere

que la variante D2 podría ser más agresiva y estar asociada a pacientes jóvenes, y otras variantes de VPH16 podrían estar asociadas con pacientes mayores en México.

En otro estudio de nuestro grupo, demostramos que variantes de VPH16 están asociadas de manera diferencial a mujeres con CC jóvenes y adultas. D2 fue asociada con pacientes jóvenes (≤ 49 años) y D3 con pacientes mayores (≥ 50 años), mientras que A1/2 se distribuye uniformemente en ambos grupos de edad (68). También en ese estudio se determinó que el 72 % de casos tipificados con D2 presentan la mutación A7729T en la LCR, además de que esta variante incrementa 3.3 veces el riesgo de desarrollar CC antes de los 50 años (68). La frecuencia de D2 disminuye de los 35 (26.0 %) a los 50 años (4.0 %). Este decaimiento puede estar relacionado con la premenopausia, sugiriendo que D2 es susceptible a influencias hormonales. Secuencias consenso en la LCR, incluyendo algunas relacionadas con respuesta hormonal, tienen varias mutaciones en las variantes del linaje D.

	LCR																					
Nucleótido	7 4 8 5	7 4 8 9	7 5 0 7	7 6 6 9	7 6 8 9	7 2 2 9	7 7 3 0	7 7 4 3	7 7 6 4	7 7 8 6	7 7 2 6	7 8 3 4	7 8 3 7	7 8 3 9	7 8 4 2	7 8 7 6	7 8 2 6	7 8 2 4	7 8 3 5	7 8 1 1	7 8 3 3	
Referencia	A	G	A	C	C	A	A	T	C	C	G	G	A	A	G	C	C	C	T	C	A	n
A1/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
D2	C	A	G	T	A	T	-	-	T	T	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	34
	C	A	G	T	A	C	-	-	T	T	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	12
	C	A	G	T	A	T	-	-	T	T	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	2
	C	A	G	T	A	C	-	-	T	T	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	2
D3	C	A	-	T	A	C	-	G	T	T	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	41	

Figura 6. Cambios en la secuencia de nucleótidos en la LCR de las variantes A1/2, D2 y D3. La figura muestra los cambios en la secuencia de nucleótidos en la LCR que fueron encontrados en 235 muestras de ADN de CC positivos a VPH16. La variación de las posiciones de los nucleótidos están colocados verticalmente. El panel muestra 21 posiciones de LCR. La posición en la secuencia que no se modifica en cada variante está indicada con un guión. El número (n) de muestras de CC positivas para cada variante se muestra a la derecha. La secuencia de VPH16 (7906 pb) anotada como NC_001526.4 en el GenBank, se utilizó como secuencia de referencia para todos los alineamientos (68).

4. JUSTIFICACIÓN

El CC representa una causa significativa de mortalidad en México y a nivel mundial. Por lo tanto, es crucial investigar la oncogenicidad de los tipos virales que afectan a nuestra población y comprender parte de los mecanismos mediante los cuales las mujeres infectadas por ciertos tipos de virus del papiloma humano (VPH) evolucionan a CC.

Como se mencionó previamente, la edad promedio de las mujeres con CC positivo para los tipos virales más oncogénicos (VPH16, 18 o 45) es menor que la edad promedio de las pacientes infectadas con otros tipos de VPH. Es altamente probable que los eventos carcinogénicos en mujeres jóvenes difieran de los eventos en mujeres de mayor edad. No todas las mujeres infectadas con VPH desarrollan CC, lo que sugiere que hay otros factores implicados en la inducción de la carcinogénesis cervical.

Uno de estos factores son las hormonas sexuales, las cuales han sido ampliamente relacionadas con el desarrollo de CC. Esto ha llevado a la realización de varios estudios que demuestran que el 17β -estradiol incrementa la expresión génica de VPH16.

En este contexto, la mutación A7729T encontrada en la región larga de control (LCR) de variante D2, junto con cierta influencia hormonal, podría intensificar la actividad del promotor, lo que resultaría en un aumento de los niveles de transcripción de *E6*, llevando a explicar parte de los mecanismos moleculares esenciales para comprender por qué las pacientes asociadas a esta variante desarrollan CC antes que aquellas asociadas a otras variantes de VPH16.

5. HIPÓTESIS

La presencia de la mutación A7729T en la variante D2 de VPH16 junto con la influencia hormonal, especialmente la exposición a 17β -estradiol, intensificará la actividad del promotor en la LCR, lo que resultará en un aumento significativo en los niveles de transcripción de *E6*.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la mutación A7729T e influencia de 17 β -estradiol en la capacidad transcripcional de la LCR de la variante D2 de VPH16.

6.2. Objetivos particulares

1. Determinar el nivel de transcripción de *E6* con la LCR de la variante D2 con la mutación A7729T (D2 T), con la LCR de D2 con la mutación A7729C (D2 C) y con la LCR de A1/2.
2. Investigar el efecto de 17 β -estradiol sobre cada LCR a través de la transcripción de *E6*.

7. METODOLOGÍA

7.1. Construcción de un vector para expresión.

En nuestro estudio se construyó un vector clonando fragmentos constituidos por las secuencias de LCR y E6, la LCR como regulador nativo de la transcripción, dentro de LCR el promotor P97 y E6 como gen reportero. Se utilizó como soporte el vector de subclonación pCR 2.1 TOPO.

7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de LCR-E6 de VPH16

Se estandarizó una PCR para la amplificación de las secuencias completas de la LCR y de E6 con el siguiente diseño de primers:

LOCUS	PRIMER	Secuencia (5' - 3')	pb	T _m (°C)	Posición del primer en el genoma	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO (pb)
LCR	LCR-F	GTATTGTATGTATGTTGAATTAGTGT	26	66	7157-7182	832
	LCR-R	AAAATGTCTGCTTTTATACTAACCGG	26	70	57-82	
E6	E6-F	ATGCACCAAAGAGAACTGCAATGTTT	27	74	83-108	477
	E6-R	TTACAGCTGGGTTTCTCTACGTGTTT	26	76	537-562	
LCR-E6	LCR-F	GTATTGTATGTATGTTGAATTAGTGT	26	66	7157-7182	1309
	E6-R	TTACAGCTGGGTTTCTCTACGTGTTT	26	76	537-562	

Tabla 2. Primers para PCR de LCR y E6.

Se realizaron reacciones que contenían 2.5 µL de Buffer PCR 10X, 1.25 µL MgCl₂ (50 mM): probando una curva de concentración de 1.5 a 4 mM, 2.5 µL de dNTP's (2 mM), 2.5 µL de oligonucleótidos sentido (LCR-F 10 µM) y antisentido (E6-R 10 µM), 0.2 µL de Taq Polimerasa (5 U/µL), 5 µL de DNA (100 ng/µL) y se aforó a un volumen de 25 µL con H₂O (8.55 µL). Para la amplificación se utilizó el siguiente programa de ciclaje: un paso inicial de 90° C por 5 min, seguido de 40 ciclos constituidos por cambios de 94° C por 30 s, 60° C por 30 s y 72° C por 2 min, así como un paso final de 72° C de 7 min. Como equipos y reactivos para los PCR de punto final de LCR-E6 se utilizó un 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems™), Platinum™ Taq Polymerase (Invitrogen™): contiene Platinum Taq (5 U/µL), Buffer 10X y MgCl₂; dNTP (Invitrogen™) y H₂O inyectable (PiSA®).

7.3. Purificación de banda de producto de PCR.

En un gel de agarosa al 1 % se corrieron los productos de amplificación de las tres variantes de LCR-E6, se cortaron las bandas correspondientes y se purificaron con QIAEX® II Gel extraction kit (Qiagen®, GER): Las bandas se colocaron dentro de un tubo de microfuga de 1.5 mL, aproximadamente 250 mg de agarosa por tubo. Se agregó 300 µL de amortiguador QX1. La resina QIAEX II se resuspendió por 30 s y enseguida se agregó 10 µL de la resina a la muestra. Se incubó a 50° C por 10 min, cada 2 min se agitó la muestra para mantener la resina en suspensión. Después, la muestra se centrifugó por 30 s y con cuidado se removió el sobrenadante. La pastilla se lavó con 500 µL amortiguador QX1. Se resuspendió la pastilla por vortexeo y enseguida se centrifugó por 30 s y con una pipeta se eliminó todas las trazas de sobrenadante. Se realizaron un par más de lavados, con 500 µL de amortiguador PE.

7.4. Clonación de insertos en el vector pCR™2.1-TOPO®

Los productos de amplificación purificados se clonaron en el vector pCR™2.1-TOPO® (Invitrogen™, CA, USA). Se llevó a cabo en un volumen de reacción de 6 µL, en donde 4 µL corresponden al inserto de interés, 1 µL de solución salina y 1 µL de vector. La mezcla se incubó 30 min a 23° C y quedó lista para realizar la transformación de células competentes.

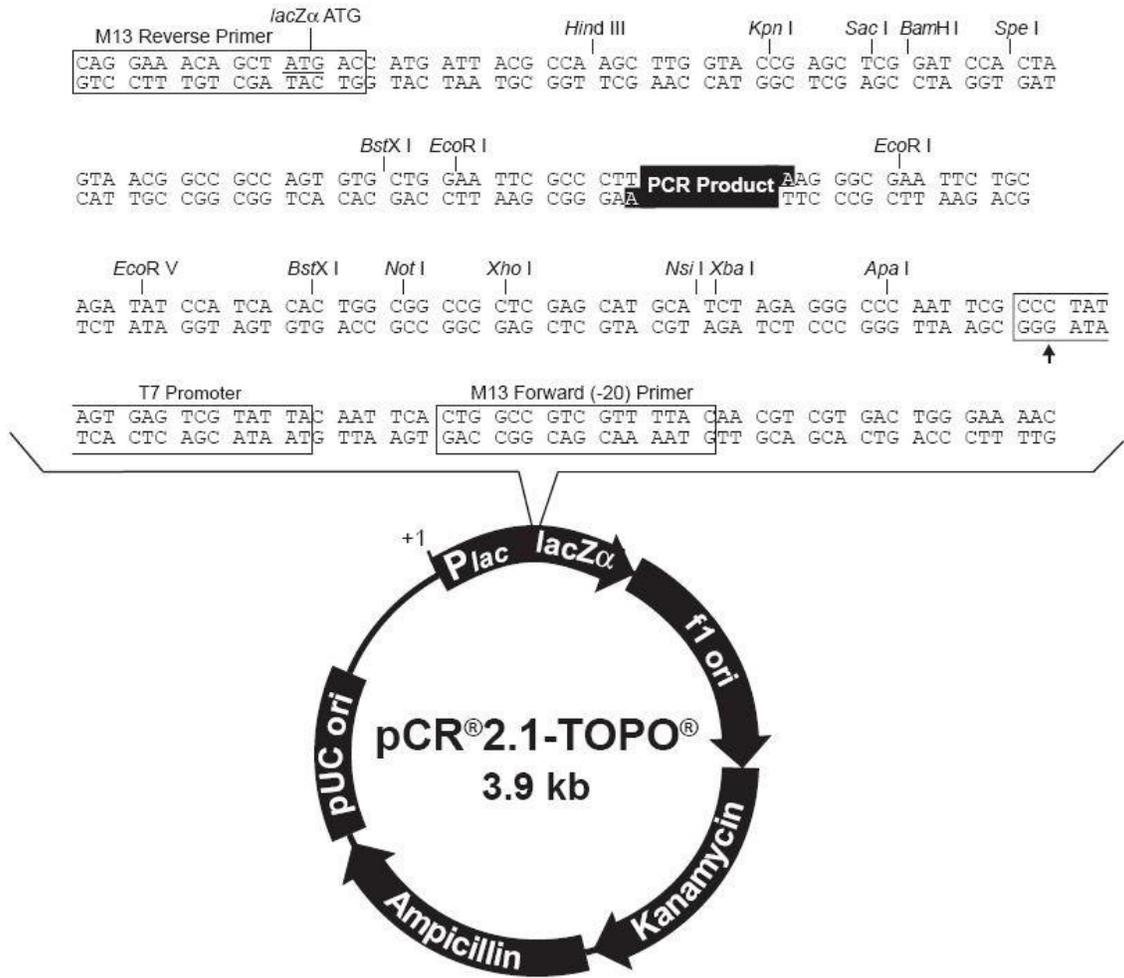


Figura 7. Esquema del vector pCR™2.1-TOPO®.

7.5. Transformación de células competentes XL10® Gold.

Una vez que el inserto de interés se clonó en el vector, le fueron adicionados en frío 50 µL (D. O. de 0.5 a 600 nm) de células competentes XL10® Gold (Stratagene™) preparadas en el laboratorio. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente se dio un choque térmico a 42° C por 45 s y después 2 min en hielo, se adicionó 450 µL de medio Luria Broth Ready Made Powder™ y se incubaron a 37° C durante una hora a 225 rpm. Finalmente, se inoculó una placa de medio Luria Broth Ready Made Powder™ (Affymetrix™), Agar Bacteriological Type A™ (Affymetrix®) con Ampicilina 100 ng/µL (USB®) con células transformadas y se dejó crecer a 37° C durante 16 h.

7.6. Aislamiento de clonas.

Las colonias seleccionadas se amplificaron en medio Terrific Broth™ (Affymetrix®) con Ampicilina 100 ng/µL (USB®) por 24 h a 37° C y 210 r.p.m. Los plásmidos se extrajeron con QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen®, GER) siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

7.7. Ensayos de restricción

Los ensayos se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 10 µL. La mezcla contuvo 1µL de buffer de reacción, 1 µL de *Hind* III y 1 µL de *Xho* I (10 U/µL, Invitrogen™), 1 µg de plásmido purificado y agua libre de nucleasas c.b.p. 10 µL. La reacción se incubó una hora a 37° C y 10 min a 80° C.

7.8. Secuenciación.

De las construcciones obtenidas que tuvieron el fragmento clonado se secuenció el sitio múltiple de clonación (MCS).

Oligos para secuenciación:

M13 Forward: 5´-GTAAAACGACGGCCAG-3´

M13 Reverse: 5´-CAGGAAACAGCTATGAC-3´

Se realizaron las reacciones con 2 µL de BigDye® (Applied Biosystems™), 1 µL de Buffer 5X, 1 µL de oligo sentido M13 (10 µM) u oligo antisentido M13 (10 µM) y 2 µL de plásmido (100 ng/µL) con el ciclaje de secuenciación siguiente: 1 min a 96° C, 25 ciclos de 30 s a 96°

C, 15 s a 55° C y 3 min a 60° C, en el equipo 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems™). Se agregaron 14 µL de agua libre de nucleasas a los 6 µL de producto de secuenciación y en seguida se filtraron con una columna con Sephadex™ G-50 (GE Healthcare). Los productos filtrados se secaron en CentriVap hasta quedar completamente secos para poder agregar 20 µL de Formamida. Posteriormente las secuencias se leyeron en el equipo Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer.

7.9. Análisis de secuencias

Se alinearon las secuencias obtenidas en un Basic Local Alignment Research Tool (BLAST) del NCBI, y se verificó que cada LCR tuviera las mutaciones correspondientes.

7.10. Cultivo celular

Las líneas celulares SiHa, HeLa y C33A fueron cultivadas con Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco® DMEM, Cat: 12100-038, Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con suero fetal bovino 10 % (Gibco®, Life Technologies) y solución de antibiótico-antimicótico 1 % (Gibco® Cat: 15240-062, Life Technologies), a 37° C en atmósfera de 5 % de CO₂. Cuando la monocapa de células alcanzaba una confluencia entre 85 y 95 % el medio de cultivo era retirado con una pipeta pasteur y las células se lavaban con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS; en mM: 154 NaCl, 3 Na₂HPO₄ y 1 KH₂PO₄, pH 7.2). El PBS se retiraba y se agregaba 1 mL de Tripsina al 0.05 % y 0.53 mM de EDTA. Después de 5 min de incubación, se retiraba el mL de tripsina y se agregaba a otra botella que ya contenía 5 mL de DMEM. Para los ensayos en placa de 24 pozos, la concentración de células en la suspensión celular se cuantificó empleando cámara de Neubauer.

Tabla 3. Información general de las líneas celulares de CC empleadas.

	SiHa	HeLa	C33A
Padecimiento	Carcinoma escamoso	Adenocarcinoma	Carcinoma
Tumor primario	Cérvix	Cérvix	Cérvix
Tipo de VPH	VPH16	VPH18	Negativo
Etnicidad	Asiática	Africana	Caucásica
Receptores a estrógenos	+	+	-

American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, E.U.A.)

7.11. Tratamiento con 17β-estradiol

Para corroborar la presencia de receptores nucleares a estrógenos en la línea celular HeLa, se realizó un ensayo de proliferación celular. Para ello, dicha línea celular se creció en medio DMEM, sin antibióticos, suplementado con 1 mM piruvato de sodio, 25 mM HEPES y 5 % de SFB tratado con carbón-dextrán para eliminar estrógenos. Se realizó una curva de proliferación con las células HeLa sembrando una cantidad conocida de células en cada uno de los 6 pozos de una placa multipozos a partir de una misma suspensión celular. Después de 24 horas se inició el tratamiento con 137 ng/mL de β-Estradiol (Sigma- Aldrich ≥ 98 %) en la mitad de los pozos, mientras que el resto permaneció con medio de cultivo sin estradiol. Cada 24 h se cambió el medio a todos los pozos y se contó el número de células de cada condición por duplicado con una cámara de Neubauer.

7.12. Efecto de 17β-estradiol en la transcripción de E6

El efecto del 17β-estradiol en la transcripción de E6 se exploró en células HeLa al transfectarlas con el plásmido pCR 2.1-TOPO-LCR-E6 D2 T e incubarlas en presencia de diferentes concentraciones de la hormona (2.7, 27.3 y 137 ng/mL) por 48 horas. Al término del tratamiento, las células se cosecharon y lisaron con TRIZOL para la posterior extracción de RNA total.

7.13. Transfección en C33A y HeLa.

Las construcciones fueron nombradas de la siguiente manera:

Variante	Símbolo del plásmido	Plásmido
VPH16 A1/2	A	pCR 2.1-TOPO LCR-E6 A1/2
VPH16 D2 con mutación A7729C	C	pCR 2.1-TOPO LCR-E6 D2 C
VPH16 D2 con mutación A7729T	T	pCR 2.1-TOPO LCR-E6 D2 T
Plásmido vacío	E	pCR 2.1-TOPO vacío

Tabla 4. Plásmidos

En pozos de 2 cm² de área, se sembraron aproximadamente 50000 células C33A o HeLa por pozo, se incubaron 24 hrs a 37°C y 5% de CO₂ con 500 μL de medio DMEM suplementado hasta alcanzar una confluencia de 50 – 70 %, posteriormente se cambió por medio DMEM sin suplemento ni antibiótico. Las células se transfectaron con Xfect™ Transfection Reagent (Takara™ Bio USA), la mezcla de transfección por pozo se constituyó de la siguiente forma: se diluyó 1 μg de plásmido con buffer de reacción Xfect a un volumen final de 25 μL, se agregó 0.3 μL de polímero Xfect, se mezcló en vortex por 10 s y se incubó por 10 min a temperatura ambiente; el total de la solución se agregó al pozo. Después de

4 horas de tratamiento (a 37° C y 5 % de CO₂), se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por medio fresco, suplementado y con antibiótico. Se hizo un curso temporal post-transfección extrayendo RNA total (RNAt) a las 24 h, 48 h y 72 h para determinar en qué momento es mayor la transcripción del RNAm de *E6*.

7.14. Extracción de RNA total.

A cada pozo se le agregó 150 µL de TRIZOL LS Reagent (Invitrogen™), la suspensión se subió y bajó con punta de pipeta hasta homogenizar, se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Las suspensiones de dos pozos se juntaron en un tubo de 1.5 mL. A cada tubo se le adicionó 60 µL de cloroformo y enseguida se agitaron vigorosamente por 15 s en vortex. Se incubaron a temperatura ambiente por 3 min, agitando cada minuto. Se centrifugaron a 12000 g por 15 min a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Se agregaron 150 µL de 2-propanol para precipitar el RNA agitando por inversión del tubo. Las muestras se colocaron a -20° C por 2 h, después se centrifugaron a 12000 g por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se agregó 300 µL de etanol al 80 % v/v para lavar el RNA y enseguida se agitó por inversión. Se centrifugaron las muestras a 7500 g por 5 min a 4 °C. El RNA quedó precipitado en el fondo del tubo. Se eliminó el sobrenadante y el RNA se secó en la campana de flujo laminar por 30 min. El RNA se disolvió en 30 µL de agua libre de nucleasas. Antes de guardar las muestras de RNA a -70 °C, se tomaron 4 µL para su posterior verificación de integridad y cuantificación.

7.15. Verificación de la integridad del RNA y cuantificación.

De las muestras de RNAt aislados se cargaron 2 µL en un gel de agarosa al 1.0 % p/v en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X. El RNAt fue separado en una cámara horizontal a la cual se le aplicó una diferencia de potencial de 120 V. La integridad de los RNA se determinó revisando los geles en el transiluminador donde se observaron dos bandas intensas y nítidas que corresponden a las subunidades 28 S y 18 S de RNA ribosomal. Los RNA que se encontraron con las dos bandas intensas y definidas se cuantificaron en un espectrofotómetro (DeNovix® DS-11 FX), programado para la cuantificación de ácidos nucleicos en las longitudes de onda de 260/280 nm. El cero del equipo se ajustó leyendo inicialmente H₂O libre de nucleasas. Las muestras de RNA que presentaban una relación de absorbancia (A) de 260/280 de 1.8-2.1 fueron consideradas con suficiente grado de pureza y por lo tanto útiles para su transcripción reversa.

7.16. Tratamiento con Dnasa I.

A fin de eliminar la presencia de DNA plasmídico, el RNAt fue tratado con DNasa. Para esto cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L que contuvieron: 2 μ g de RNAt, 1 μ L de DNasa I (1 U/ μ L, Invitrogen™) 1 μ L de buffer de DNasa I (Tris-HCl 200 mM (pH 8.4), MgCl₂ (20 mM), KCl (500 mM) y el volumen necesario de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para completar el volumen final. Se incubaron las muestras a 37° C por 30 min, tiempo al cual se agregaron 1 μ L de ácido etildiaminotetraacético (EDTA, 25 mM pH 8.0, Invitrogen) y después se llevó al termoblock a 75 °C por 10 min.

7.17. Reverso Transcripción.

Posteriormente el RNA fue reverso-transcrito utilizando MultiScribe® Reverse Transcriptase (Invitrogen™). Brevemente; en un volumen final de 20 μ L, 10 μ L con 2 μ g de RNAt se mezclaron con 2 μ L de buffer de reverso transcripción 10x, 0.8 μ L de dNTP's 25 X, 2 μ L de oligos aleatorios 10X, 1 μ L de transcriptasa reversa (50 U/ μ L), 0.2 μ L de inhibidor de RNasa (400 U/ μ L) y 4 μ L de H₂O DEPC. Se usó el equipo 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems™) con 2 hrs a 37° C de reacción.

7.18. RT-qPCR.

La expresión del gen *E6* se cuantificó mediante RT-qPCR utilizando sondas TaqMan® (Applied Biosystems™): *E6*, RNA ribosomal 18S (Hs99999901_s1), GAPDH y los siguientes oligos:

Locus	Primer	Secuencia (5' - 3') (Y = C + T) (K = T + G)	pb	Tm (°C)	Posición del primer en el genoma	Tamaño del amplificado (pb)
E6	F104	ATGTTYCAGGACCCACAGGA	20	60	104-123	149
	R252	AAATCCCGAAAAGCAAAGTCATAT	24	58	252-229	
	SONDA TaqMan®	6-FAM-CCACAkTTATGCACAGAGCTGCAAAcAACT-TAMRA	30	68	140-169	

Tabla 5. Oligos para RT-qPCR de E6.

El cDNA de 20 pozos de células C33A se exploró en reacciones por duplicado, en un volumen final de 20 μ L, el cual incluyó 2 μ L de cDNA (100 ng/ μ L), 10 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 0.5 μ L de sonda TaqMan® (250 nM), 2 μ L de oligonucleótido Forward F104 (10 μ M), 2 μ L de oligonucleótido Reverse R253 (10

μM) y $3.5 \mu\text{L}$ de H_2O DEPC (Affymetrix™). La cuantificación del mRNA se realizó en un equipo CFX96™ Real-Time System (BioRad™), el programa de ciclaje fue de: 2 min a 50°C , 10 min a 95°C , y 40 ciclos de 30 s a 95°C , 30 s a 58°C , 30 s a 72°C y 8 min a 72°C . El análisis de E6 se realizó con curva relativa estándar, construida a partir de diluciones seriadas ($1000 - 0.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$) de cDNA de células SiHa. Los valores relativos del transcrito se obtuvieron interpolando los valores de Ct en las curvas de calibración. La expresión del gen se normalizó respecto al gen constitutivo Rn 18s o GAPDH. Para la preparación de una curva estándar relativa, se hizo una mezcla de los cDNA de células SiHa. De esta se obtuvieron diluciones sucesivas de 1:10 en agua DEPC, a fin de obtener las siguientes concentraciones: Punto A: $1000 \text{ ng}/\mu\text{L}$, punto B: $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$, punto C: $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$, punto D: $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y punto E: $0.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

8. RESULTADOS

8.1. PCR de LCR-E6 de VPH16.

Se realizó la PCR para cada fragmento LCR-E6, LCR y E6 (Fig. 7 y 8). Las bandas de LCR-E6 se cortaron y se purificaron como se menciona en el apartado *Purificación de banda de producto de PCR*.

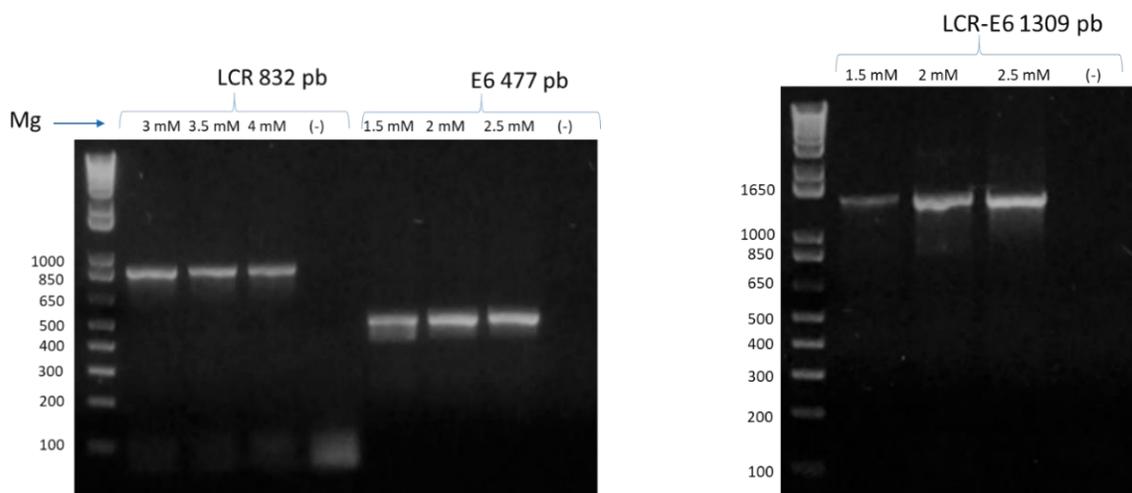


Figura 8. Productos de amplificación de PCR de LCR, E6 y LCR-E6. Se puede apreciar en el gel LCR-E6 una banda entre 1000 y 1650 pb, que corresponde a la banda esperada de 1309 pb del fragmento LCR-E6.

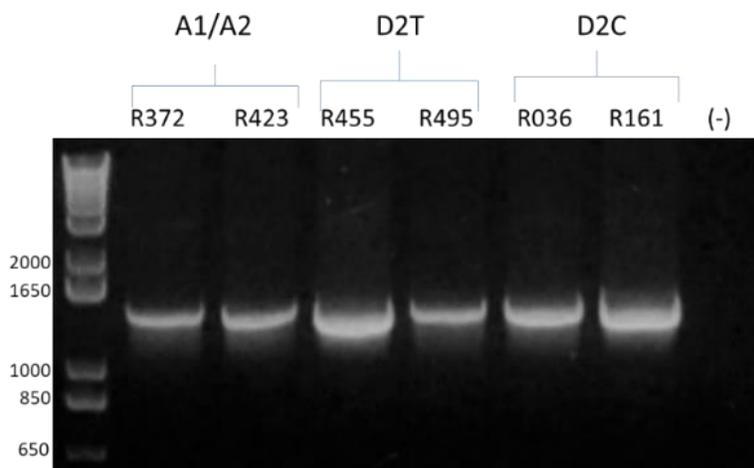


Figura 9. Productos de amplificación de LCR-E6. **A1/A2:** a partir de DNA de VPH16 variante Europea. **D2 T:** a partir de DNA con VPH16 D2 con mutación en LCR A7729T. **D2 C:** a partir de DNA con VPH16 D2 con mutación en LCR A7729C. R372, R423, R455, R495, R036 y R161: muestras de DNA de citologías exfoliativas.

8.2. Clonación de los fragmentos LCR-E6 en el vector pCR 2.1 TOPO.

Una vez que se obtuvieron las bandas purificadas, éstas se insertaron en el vector de clonación (pCR 2.1 TOPO), y la construcción inserto-vector se utilizó para transformar células competentes XL10 GOLD. Se seleccionaron las colonias que incorporaron el inserto-vector mediante ensayos de restricción. Se eligieron 10 colonias al azar, se amplificaron y se extrajo el plásmido para después ser digerido. Como se muestra en las siguientes imágenes, de las 10 colonias elegidas solo una incorporó la construcción inserto-vector (Fig. 10,11 y 12).

Minipreparaciones de pCR 2.1-TOPO-LCR-E6 D2 C

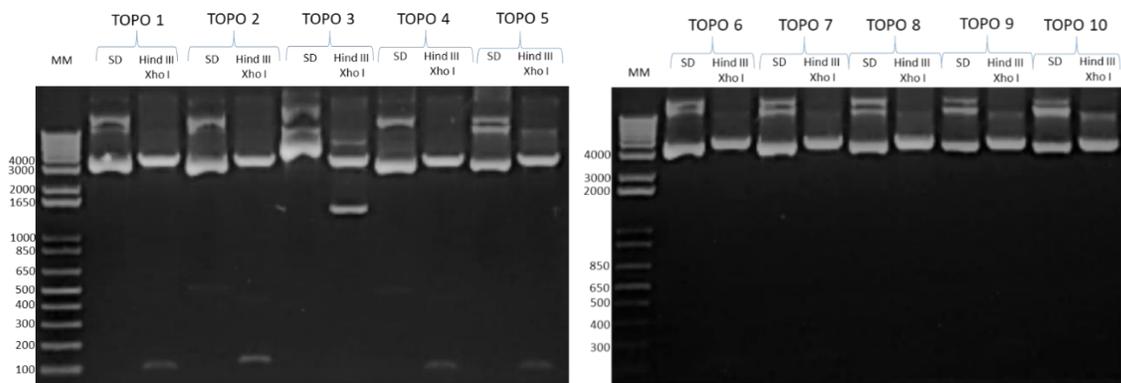


Figura 10. Minipreparaciones digeridas de D2 C. SD: Plásmido sin digerir, Hind III Xho I: 1 µg de plásmido digerido con 10 U de Hind III y 10 U de Xho I. De la transformación se obtuvieron 10 colonias. Solo una incorporó la construcción inserto-vector, que corresponde al plásmido TOPO 3. La banda esperada aparece entre 1000 y 1650 pb, el fragmento es de 1309 pb más 100 pb del MCS.

Minipreparaciones de pCR 2.1-TOPO-LCR-E6 D2 T.

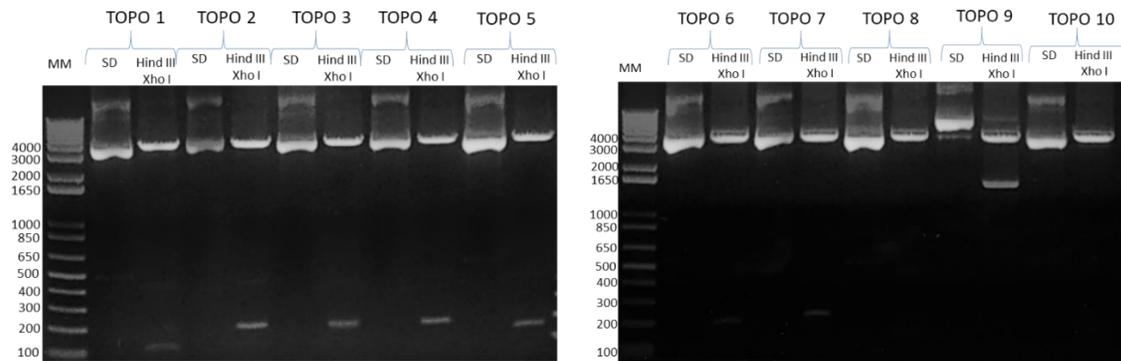


Figura 11. Minipreparaciones digeridas de D2 T. SD: Plásmido sin digerir, Hind III Xho I: 1 µg de plásmido digerido con 10 U de Hind III y 10 U de Xho I. De la transformación se obtuvieron 10 colonias. Solo una incorporó la construcción inserto-vector, que corresponde al plásmido TOPO 9. La banda esperada aparece entre 1000 y 1650 pb, el fragmento es de 1309 pb más 100 pb del MCS.

Minipreparaciones de pCR 2.1-TOPO-LCR-E6 de A1/2.

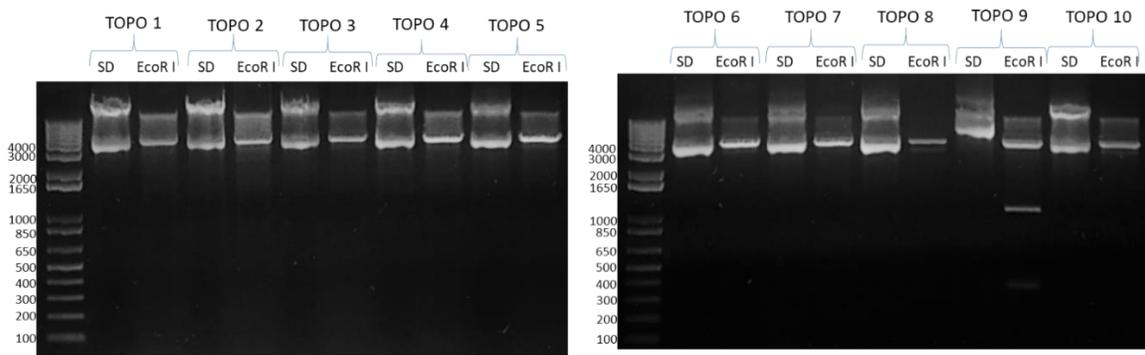


Figura 12. Minipreparaciones digeridas de A1/2. SD: Plásmido sin digerir, EcoR I: 1 μ g de plásmido digerido con 10 U de EcoR I. De la transformación se obtuvieron 10 colonias. Solo una incorporó la construcción inserto-vector, que corresponde al plásmido TOPO 9. La banda esperada aparece entre 1000 y 1650 pb.

8.3. Secuenciación del sitio múltiple de clonación.

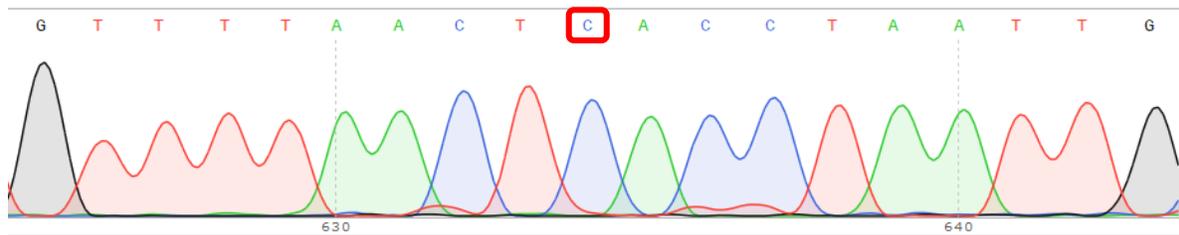
Para confirmar la clonación del fragmento LCR-E6 y las mutaciones reportadas en la LCR así como las mutaciones en la posición 7729, se secuenció el MCS de los tres pCR 2.1-TOPO-LCR-E6 (Fig. 13).

Ubicación de la posición 7729 en las secuencias reversas del MCS de pCR 2.1-TOPO-LCR-E6 de VPH16.

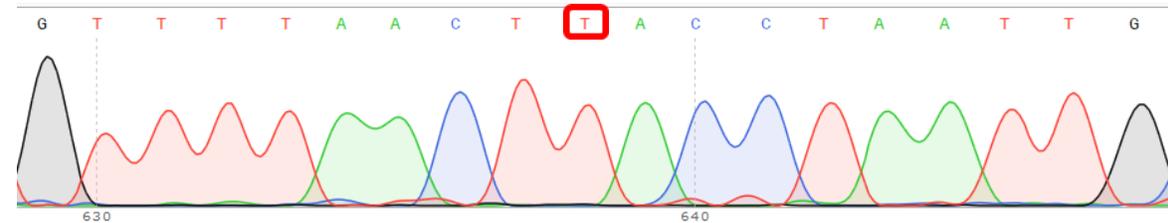
Mutaciones en la posición 7729.

```
Posición 7729
VPH16 D2-A1/2      GTTTTAACT[C/T/A]ACCTAATTG
                    |||||
REFERENCIA          GTTTTAACT  A  ACCTAATTG
```

A



B



C

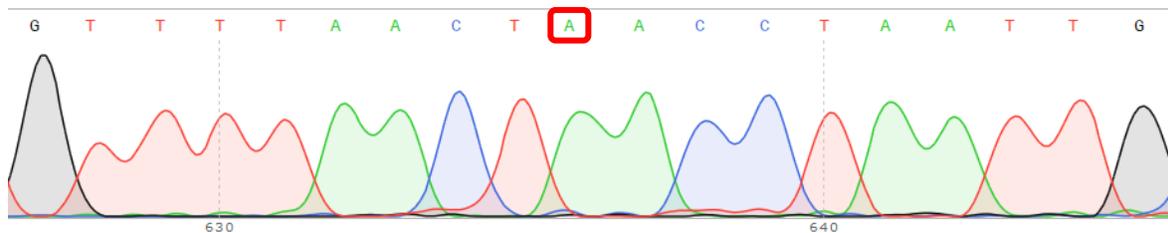


Figura 13. Parte del electroferograma de la secuenciación del MCS de los vectores pCR 2.1-TOPO-LCR-E6 de VPH16. Se indica con cuadro rojo la mutación en la posición 7729. **A:** pCR 2.1-TOPO-LCR-E6 D2 **C,** B: pCR 2.1-TOPO-LCR-E6 D2 T y **C:** pCR 2.1-TOPO-LCR-E6 A1/2.

Alineación de secuencias de LCR

Antes de amplificar las clonas se aseguró que además de tener la mutación en la posición 7729, las LCR también tuvieran las otras mutaciones reportadas. Por lo que se alinearon en un BLAST y se buscó base por base cada mutación (Fig. 13), con ayuda de la tabla siguiente:

	LCR																				
Nucleótido	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0	0	0	0
	4	4	5	6	6	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8	0	0	0	0
	8	8	0	6	8	2	3	4	6	8	2	3	3	3	4	7	8	2	2	3	8
	5	9	7	9	9	9	0	3	4	6	6	4	7	9	2	6	6	4	5	1	3
Referencia	A	G	A	C	C	A	A	T	C	C	G	G	A	A	G	C	C	C	T	C	A
A1/A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D2	C	A	G	T	A	T	-	-	T	T	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-
	C	A	G	T	A	C	-	-	T	T	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-

Tabla 6. Mutaciones en la LCR de cada variante clonada. Se indica la posición del nucleótido en la LCR. La mutación que diferencia a las tres LCR se muestra en sombreado.

Secuencias de LCR alineadas en un BLAST. Se muestra parte de la secuencia donde se presentan las mutaciones indicadas en la tabla 6.

Secuencia D2 C

Secuencia ID: [KP965094.1](#)

Identities	Gaps
866/874 (99%)	5/874 (0%)
VPH16 D2 C 7457	AATTCGGTTGCATGCTTTTTGGCACAAACTGTATTTTTTTAAATAGTTCCTGTGTCAGCAA
REFERENCIA	AATTCGGTTGCATGCTTTTTGGCACAAACTGTATTTTTTTAAATAGTTCCTGTGTCAGCAA
VPH16 D2 C 7637	TCACATATGTACATTGTGTCATATAAAATAAATTACTATGCGCCAACGCCTTAAATACCGC
REFERENCIA	TCACATATGTACATTGTGTCATATAAAATAAATTACTATGCGCCAACGCCTTAAATACCGC
VPH16 D2 C 7697	TGTTAGGCACATATTTTTGGCTTGTTTAACTCACCTAATTGCATATTTGGCATAAGGTT
REFERENCIA	TGTTAGGCACATATTTTTGGCTTGTTTAACTCACCTAATTGCATATTTGGCATAAGGTT
VPH16 D2 C 7757	TAAACTTTAAGGCCAACTAAATGTCACCTTAGTTTCATACATGAACTGTGTAAAGGTTAG
REFERENCIA	TAAACTTTAAGGCCAACTAAATGTCACCTTAGTTTCATACATGAACTGTGTAAAGGTTAG
VPH16 D2 C 7877	ATTTACAAGCAACTTATCTAATAATACTAACTACAATAATTCATGTATAAACTAAGGG
REFERENCIA	ATTTACAAGCAACTTATCTAATAATACTAACTACAATAATTCATGTATAAACTAAGGG

Secuencia D2 T

Secuencia ID: [KP965092.1](#)

Identities Gaps
862/870 (99%) 3/870 (0%)

```
VPH16 D2 T 7457 AATTCGGTTGCATGCTTTTTGGCACAAACTGTATTTTTTTAAATAGTTCCTGTGTCAGCAA
|
Referencia AATTCGGTTGCATGCTTTTTGGCACAAACTGTATTTTTTTAAATAGTTCCTGTGTCAGCAA

VPH16 D2 T 7637 TCACTATGTACATTGTGTATATAAAATAAATTACTATGCGCCAACGCCTTAAATACCGC
|
Referencia TCACTATGTACATTGTGTATATAAAATAAATTACTATGCGCCAACGCCTTAAATACCGC

VPH16 D2 T 7697 TGTTAGGCACATATTTTTGGCTTGTTTAACTACCTAATTGCATATTTGGCATAAGGTT
|
Referencia TGTTAGGCACATATTTTTGGCTTGTTTAACTACCTAATTGCATATTTGGCATAAGGTT

VPH16 D2 T 7757 TAAACTTTAAGGCCAACTAAATGTCACCTTAGTTCATACATGAAGTGTAAAGGTTAG
|
Referencia TAAACTTTAAGGCCAACTAAATGTCACCTTAGTTCATACATGAAGTGTAAAGGTTAG

VPH16 D2 T 7877 ATTTACAAGCAACTTATCTAATAATACTAACTACAATAATTCATGTATAAACTAAGGG
|
Referencia ATTTACAAGCAACTTATCTAATAATACTAACTACAATAATTCATGTATAAACTAAGGG
```

Secuencia A1/2

Secuencia ID: [KP965122.1](#)

Identities Gaps
855/864 (99%) 7/864 (0%)

```
VPH16 A1/2 7457 AATTCGGTTGCATGCTTTTTGGCACAAAATGTGTTTTTTAAATAGTTCCTATGTCAGCAA
|
Referencia AATTCGGTTGCATGCTTTTTGGCACAAAATGTGTTTTTTAAATAGTTCCTATGTCAGCAA

VPH16 A1/2 7637 TCACTATGTACATTGTGTATATAAAATAAATCACTATGCGCCAACGCCTTACATACCGC
|
Referencia TCACTATGTACATTGTGTATATAAAATAAATCACTATGCGCCAACGCCTTACATACCGC

VPH16 A1/2 7697 TGTTAGGCACATATTTTTGGCTTGTTTAACTACCTAATTGCATATTTGGCATAAGGTT
|
Referencia TGTTAGGCACATATTTTTGGCTTGTTTAACTAACCTAATTGCATATTTGGCATAAGGTT

VPH16 A1/2 7757 TAAACTTCTAAGGCCAACTAAATGTCACCTTAGTTCATACATGAAGTGTAAAGGTTAG
|
Referencia TAAACTTCTAAGGCCAACTAAATGTCACCTTAGTTCATACATGAAGTGTAAAGGTTAG

VPH16 A1/2 7877 ATTTACAAGCAACTTATATAATAATACTAACTACAATAATTCATGTATAAACTAATGG
|
Referencia ATTTACAAGCAACTTATATAATAATACTAACTACAATAATTCATGTATAAACTAATGG
```

Figura 14. Parte del alineamiento de la secuencia de la LCR de cada uno de los tres plásmidos. Se resalta en rojo el nucleótido A7729 y en azul los nucleótidos donde ocurren las mutaciones en las tres LCR.

Como se muestra en la figura 15, los tres fragmentos clonados fueron secuenciados y después alineados con BLAST, en los tres casos, corresponden a los fragmentos LCR-E6 con sus respectivas mutaciones. También se determinó la orientación en la que se clonaron los fragmentos LCR-E6. Dado la ubicación del cebador sentido y del cebador antisentido en el sitio múltiple de clonación, se tomaron como referencia en la secuencia y en los tres casos la LCR está del lado del cebador anti sentido y E6 del cebador sentido (Fig x).

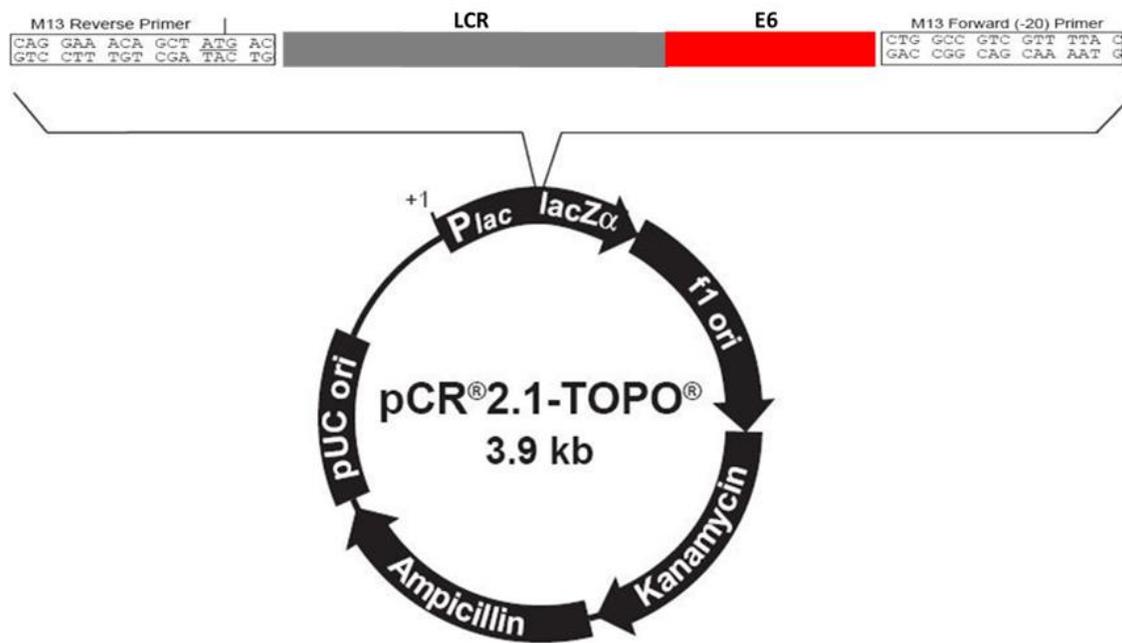


Figura 15. Mapa de las construcciones obtenidas. Las tres construcciones se clonaron en el mismo sentido.

8.4. RNA total de células SiHa.

Para determinar la expresión de *E6* a nivel de RNAm como consecuencia de su transfección en cada uno de los ensayos, se construyó una curva patrón a partir de RNAt de células SiHa (Fig. 14), dichas células se cultivaron en las condiciones mencionadas en el apartado *cultivo celular* y en una placa de cultivo de 24 pozos, hasta alcanzar una confluencia del 100 %.

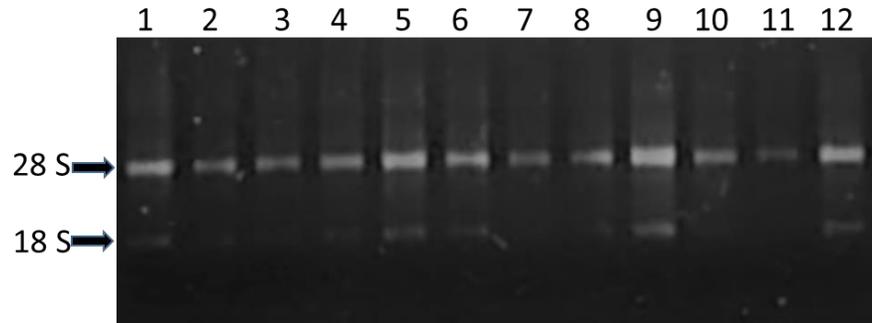


Figura 16. Separación electroforética del RNAt de células SiHa. Fotografía de un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. En cada carril se cargaron 2 μ L de RNAt. Las muestras 5 y 9 fueron elegidas para reverso-transcripción. Nótese la integridad de las dos fracciones de RNA ribosomales (28 S y 18 S).

El RNA total obtenido de células SiHa (1-2 copias del genoma de VPH16) fue cuantificado y reverso-transcrito. Se hizo un pool de DNA complementario (cDNA) de las muestras 5 y 9, el cual se tomó como el punto A y a partir de este se hicieron las diluciones seriadas. Esta curva patrón se utilizó para medir E6 obtenida de cada uno de los ensayos.

8.5. RNA de curso temporal post-transfección.

Dado que se usó un vector de sub-clonación como soporte para un modelo de transcripción, se empezó por determinar si este sistema es capaz de expresar moléculas de RNAm además de precisar en qué tiempo es donde ocurre el máximo de transcripción. Después de transfectar la línea celular C33A con el plásmido pCR 2.1-TOPO-LCR-E6 D2 C, se extrajo el RNAt a las 24, 48 y 72 horas pos-transfección (Fig. 15).

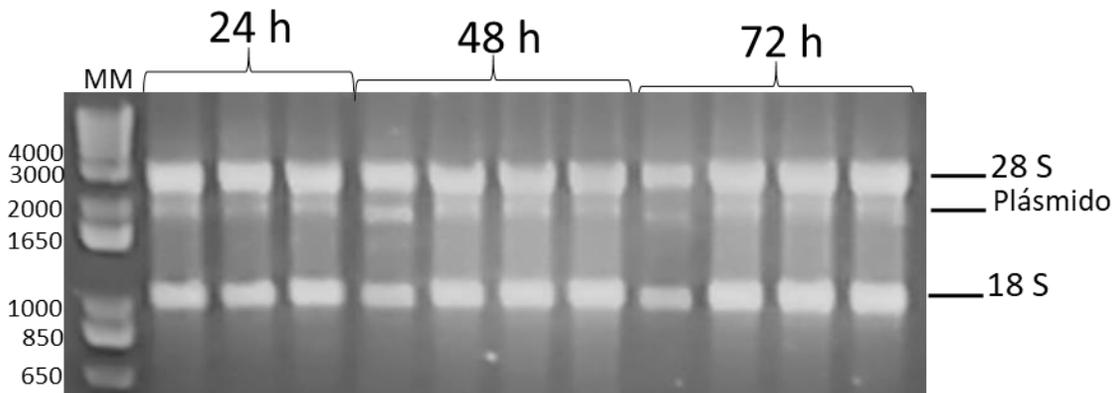


Figura 17. Separación electroforética del RNAt de células C33A transfectadas con pCR2.1 TOPO-LCR-E6 D2 C. Fotografía de un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. En cada carril se cargaron 2 μ L de RNAt extraído a las 24, 48 y 72 horas pos-transfección.

Nótese la integridad de las dos fracciones de RNA ribosomales esperadas (28 S y 18 S, fig. 15).

8.6. Efecto del tratamiento con Dnasa I.

Se encontró que en el proceso de extracción de RNA_t las muestras acarreaban plásmido, por lo que se trató con Dnasa I antes de la Reverso-transcripción. Posteriormente se realizó una qPCR para comprobar que la expresión en ésta se debía a cDNA de E6 y no al plásmido que se acarreaba en las muestras de RNA_t (fig. 16).

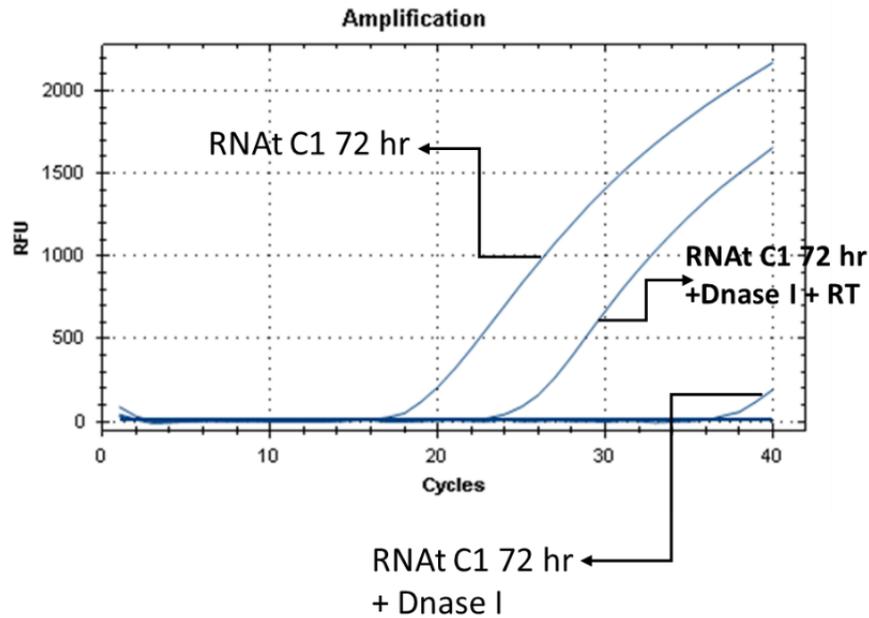


Figura 18. Gráfico de amplificación de E6, efecto del tratamiento con Dnasa I. La curva de menor Ct (**RNA_t C1 72 hr**: RNA total de C33A transfectada con pCR2.1TOPO LCR-E6 D2 C extraído a las 72 horas pos-transfección) corresponde a la amplificación de DNA plasmídico. La curva de mayor Ct (**RNA_t C1 72 hr + Dnasa I + RT**) corresponde a RNA_t tratado con Dnasa I y reverso transcrito, por lo que la amplificación se debe a la presencia de cDNA de E6. No hay amplificación con la muestra de RNA_t tratado con Dnasa I (**RNA_t C1 72 hr + Dnasa I**).

Se demuestra que nuestro sistema de expresión funciona, si bien se acarrea plásmido en el proceso de extracción de RNA, este se puede eliminar con DNAsa y después reverso transcribir RNAm, para posteriormente ser detectado con sonda Taqman y confirmar que la amplificación de E6 se debe a su RNAm y no a la secuencia en el plásmido.

8.7. Análisis de la expresión génica de E6 en C33A transfectadas con pCR2.1TOPO-LCR-E6 D2 C en un curso temporal.

Para estimar el tiempo pos-transfección al cual la expresión del mRNA de E6 es la máxima, se llevaron a cabo ensayos de RT-qPCR (Fig. 17-18).

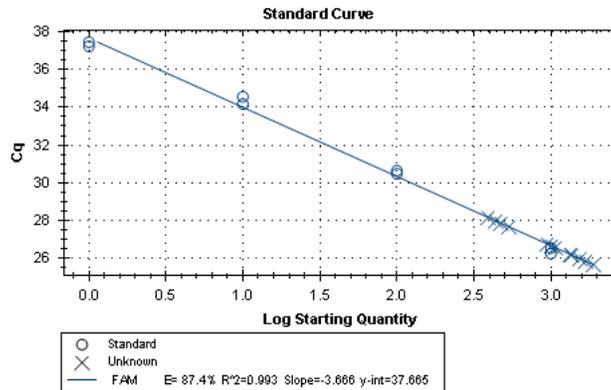


Figura 19. Curva estándar de E6. Se muestra en círculos los puntos de la curva patrón y en cruces los puntos de las muestras.

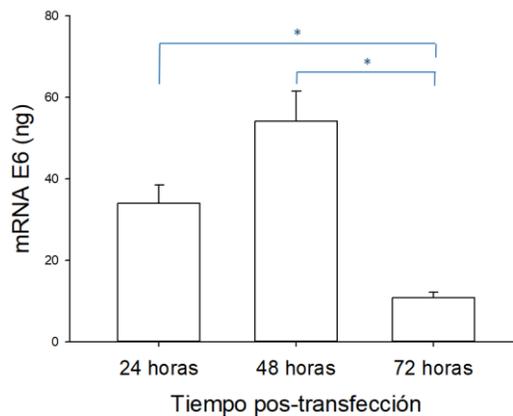


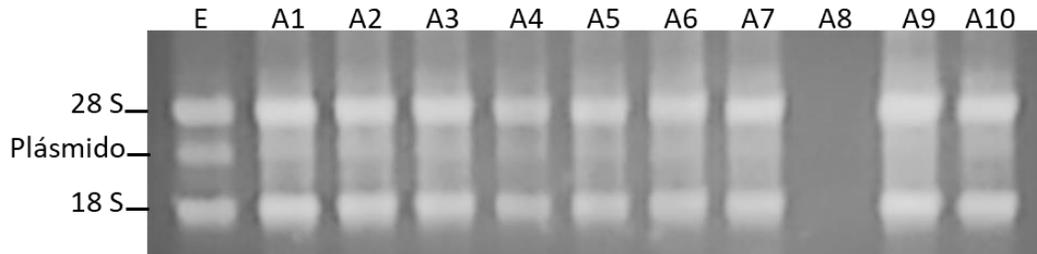
Figura 20. RT-qPCR, curso temporal pos-transfección. El plásmido pCR2.1TOPO-LCR-E6 D2 C fue transfectado en células C33A. Se muestran los promedios con error estándar. Valores de E6 normalizados con GAPDH. $p = 0.001$ ANOVA de una vía. * $P = 0.009$, Prueba de Tukey.

Se establece que el mejor tiempo pos-transfección para la extracción de RNA_t y donde se tiene mayor expresión de mRNA de E6 son 48 horas. Además, se determina que el modelo de expresión funciona correctamente.

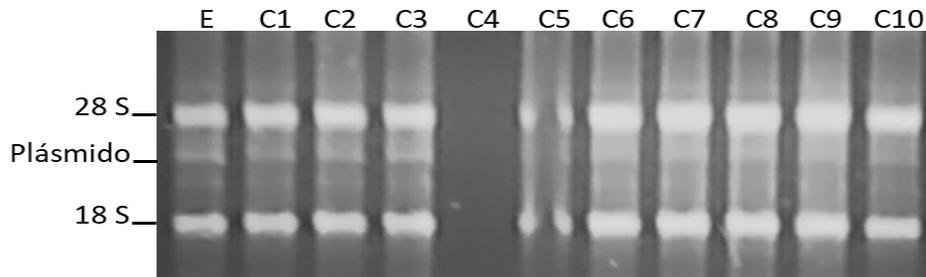
8.8. RNA de C33A transfectadas con pCR 2.1-TOPO-LCR-E6

La transfección de C33A se realizó con cada una de las construcciones de LCR-E6 de cada variante, construcciones que se corroboró tuvieran las mutaciones indicadas. Después de 48 horas pos-transfección, se extrajo el RNA total (Fig. 19), se cuantificó, se verificó integridad, se trató con Dnasa I y se reverso-transcribió.

A



B



C

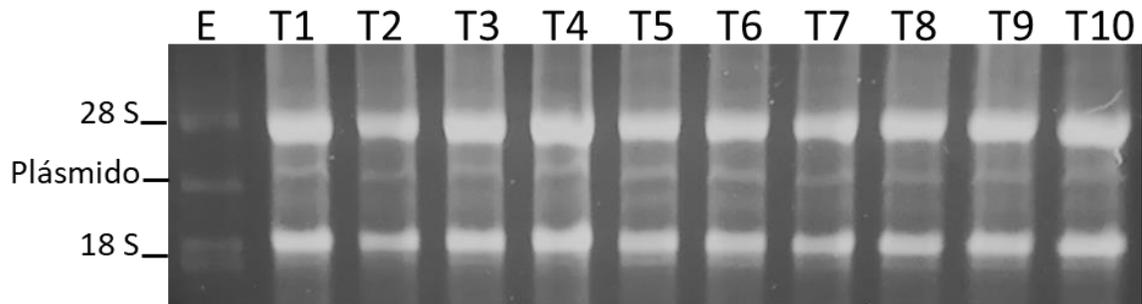


Figura 21. Separación electroforética del RNA total de células C33A transfectadas con pCR2.1 TOPO-LCR-E6. Fotografía de un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. **A:** pCR2.1 TOPO-LCR-E6 A1/2. **B:** pCR2.1 TOPO-LCR-E6 D2 C. **C:** pCR2.1 TOPO-LCR-E6 D2 T. E: pCR2.1 TOPO vacío.

8.9. Análisis de la expresión génica de E6 en C33A transfectadas con cada una de las tres clonas.

Para realizar un análisis cuantitativo de la expresión de mRNA de E6 en la línea celular C33A como consecuencia de su transfección con cada uno de los tres plásmidos descritos, se llevaron a cabo experimentos de RT-qPCR (Fig. 20-21) con cDNAs de RNA_t obtenidos de los transfecciones de C33A con cada una de las construcciones.

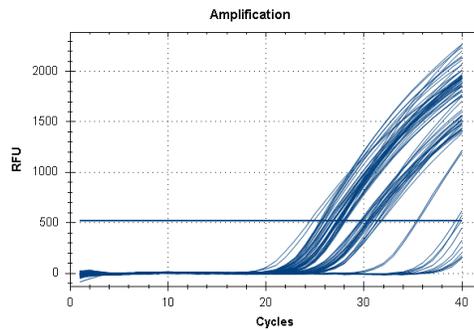


Figura 22. Amplificación del gen E6 mediante qPCR. Gráfica de la amplificación del gen E6 en las reacciones qPCR empleando sonda Taqman. Se muestran las curvas de amplificación tanto de las muestras de cDNA de E6 provenientes de transfecciones, como de la curva patrón hecha a partir de cDNA de células SiHa. La línea azul horizontal indica el umbral elegido para determinar los valores de Ct de cada reacción.

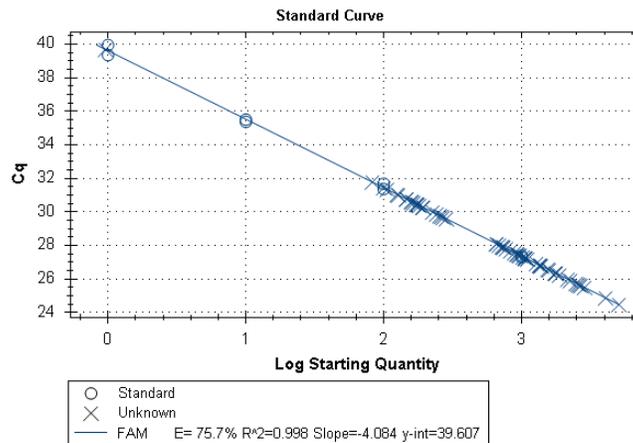


Figura 23. Regresión lineal de la curva patrón. Se muestran en círculos los puntos de la curva patrón construida a partir de diluciones seriadas de cDNA de células SiHa y en x los puntos de las muestras de cDNA de transfecciones en C33A.

8.10. Niveles de RNAm de E6 en células C33A.

Después de realizar la qPCR de E6 y normalizar estos valores con los obtenidos de la qPCR del gen endógeno 18S, se realizó un análisis Delta Delta Ct. Se grafican los valores de cambio en la proporción y se determina que la mayor expresión de E6 se da con la construcción que integra la LCR-E6 de la variante D2 de VPH16 que tiene la mutación A7729T (1381.99 ng/ μ L), seguida de la construcción A7729C (812.83 ng/ μ L) y con la menor expresión la construcción A7729 (187.16 ng/ μ L) (Fig 22).

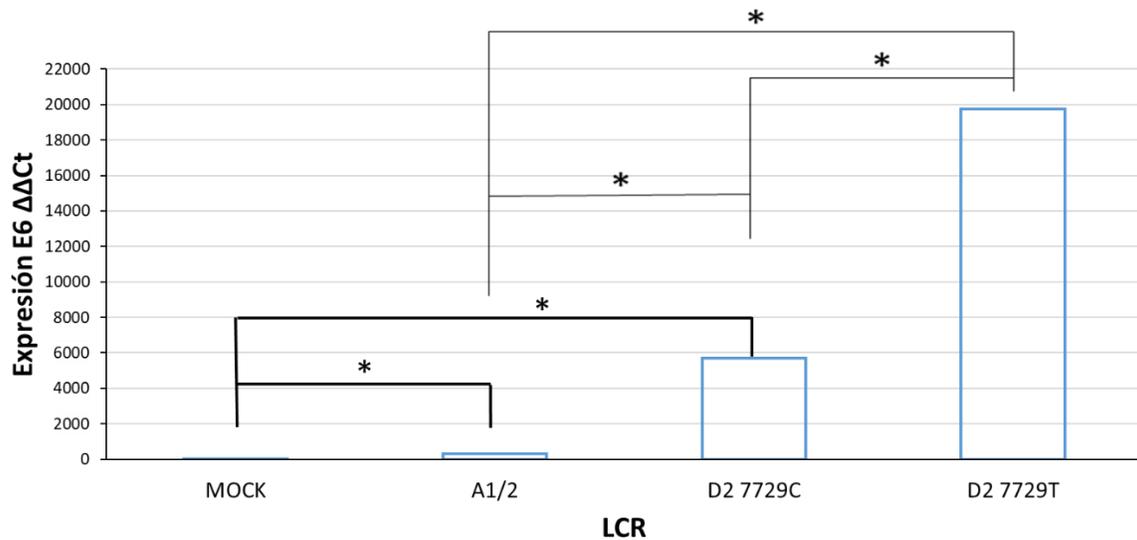


Figura 24. Cambio en la proporción de E6. Gráfico de cambio en la proporción de E6 resultado del análisis $\Delta\Delta$ Ct tomando como control la expresión de E6 de la variante europea. **A1/2**: LCR-E6 variante Europea. **D2 7729C**: LCR-E6 de D2 con mutación A7729C. **D2 7729T**: LCR-E6 de D2 con mutación A7729T. * $p < 0.001$. Mann Whitney.

8.11. Ensayo de proliferación en presencia de 17β-estradiol

Para determinar si 17β-estradiol promueve la proliferación de células HeLa, se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar dicha respuesta. En los resultados que se presentan en la figura 23 se puede notar que la proliferación de las células HeLa aumenta considerablemente con el tratamiento de 17β-estradiol.

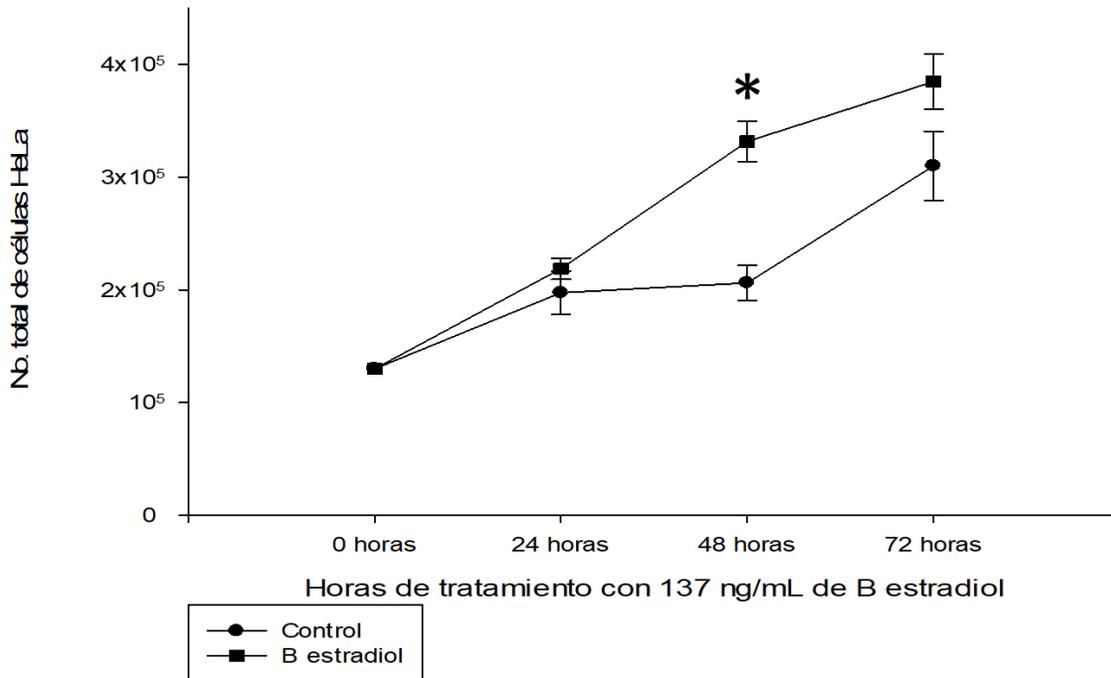


Figura 25. Efecto de 17β-estradiol en la proliferación de HeLa. Gráfica de proliferación en presencia y ausencia de 137 ng/mL de β-estradiol de la línea celular HeLa. Los datos se presentan como el promedio de dos observaciones ± error estándar del número de células totales a los tiempos indicados. *P < 0.001. T de Student n = 16.

8.12. Efecto de 17β-estradiol sobre la transcripción de *E6*.

Establecido que la línea celular HeLa responde a 17β-estradiol, se transfectó con el plásmido pCR 2.1-TOPO LCR *E6 D2 T*, y se dio tratamiento con una curva de β-estradiol para determinar la concentración a la cual se da la mayor expresión de *E6* (Fig. 24).

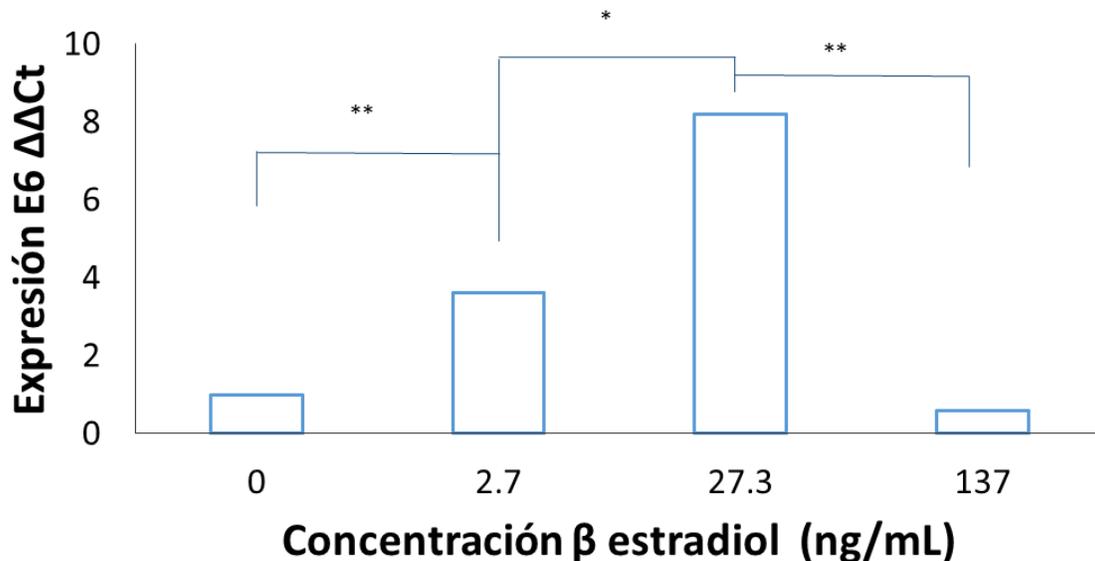


Figura 26. Expresión de *E6* en HeLa tratada con tres concentraciones de 17β-estradiol. Gráfico de expresión de *E6* resultado del análisis $\Delta\Delta C_t$ tomando como basal *E6* de HeLa transfectada con *D2 T* sin exposición a 17β-estradiol, usando GAPDH como gen endógeno. ** $P = 0.002$, * $p = 0.03$ Mann Whitney.

Se grafican los valores de cambio en la proporción y se determina que la mayor expresión de *E6* (148.75 ng/μL) se da con la concentración de 27.3 ng/mL de β-estradiol, seguida de la concentración de 2.7 ng/mL (100.56 ng/μL), después se presenta la expresión de *E6* en HeLa sin tratamiento (40.76 ng/μL) y con la menor expresión la concentración de 137 ng/mL (31.11 ng/μL) (Fig 24).

8.13. Efecto de 17 β -estradiol sobre la transcripción de *E6* de cada una de las tres clonas

Se demostró que β -estradiol tiene efecto en la expresión de *E6* de la clona D2 T y habiendo determinado una concentración a la cual se tiene la mayor expresión, se transfectaron células HeLa con cada una de las tres clonas, aplicando tratamiento de β -estradiol de 27.3 ng/mL a un grupo y otro grupo sin tratamiento. Se extrajo el RNA_t (Fig. 25) después de 48 horas pos-transfección, se trató con Dnasa I y se realizó la RT-qPCR (Fig. 26).

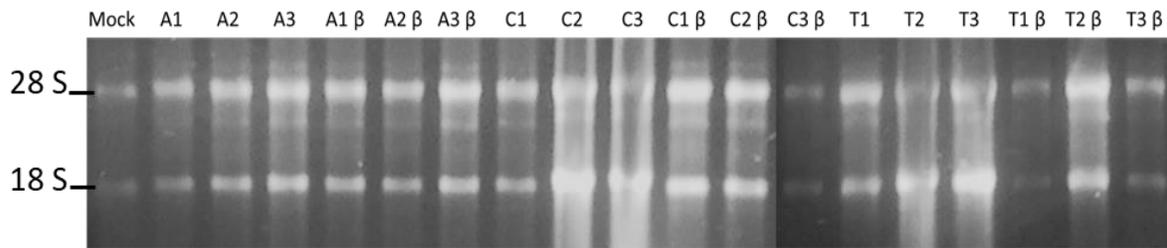


Figura 27. Separación electroforética del RNA total de células HeLa transfectadas con las tres construcciones de LCR-E6. Fotografía de un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. Nótese la integridad de las dos fracciones de RNA ribosomales esperadas (28 S y 18 S). **Mock:** pCR 2.1 TOPO VACÍO. **A1-3:** pCR 2.1-TOPO-LCR-E6 A1/2. **C1-3:** pCR 2.1-TOPO-LCR-E6 D2 C. **T1-3:** pCR2.1 TOPO-LCR-E6 D2 T. **β:** Tratamiento de 27.3 ng/mL de β -estradiol.

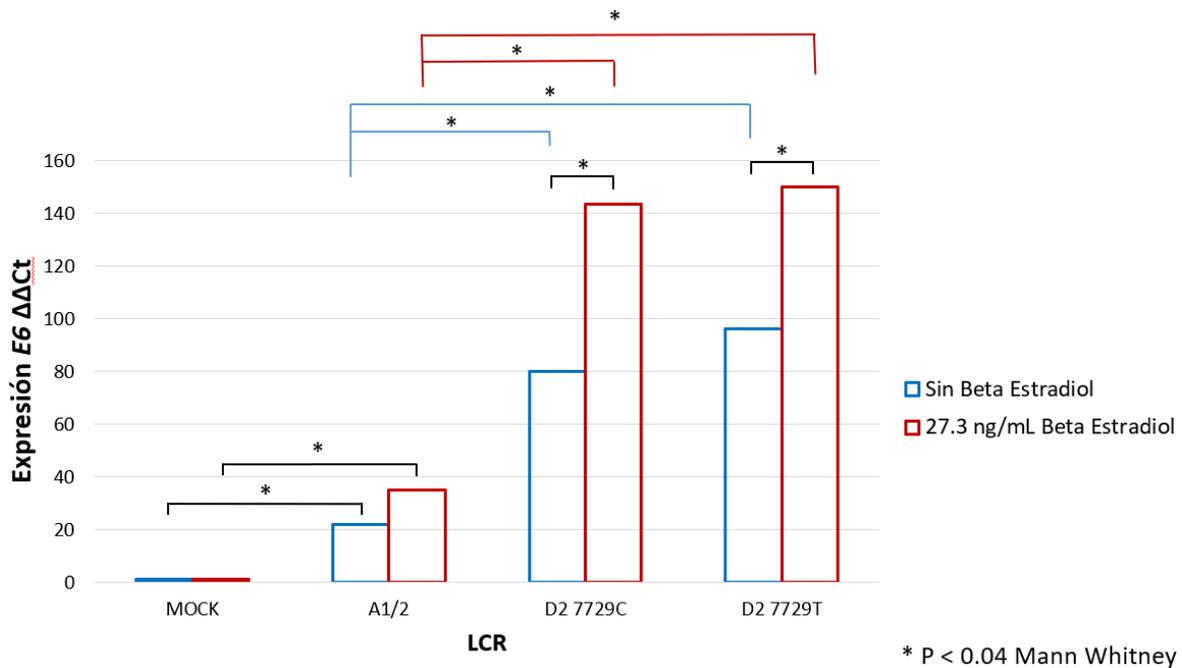


Figura 28. Expresión de E6 en HeLa tratada 27.3 ng/mL de β-estradiol. Gráfico de expresión de E6 resultado del análisis $\Delta\Delta C_t$. Se transfectaron células HeLa con cada una de las tres clonas, a un grupo se aplicó un tratamiento de 48 horas con 27.3 ng/mL de β-estradiol. Se usó GAPDH como gen normalizador. **MOCK:** Plásmido vacío. **E:** Plásmido pCR 2.1-TOPO-LCR E6 A1/2. **D2 7729C:** Plásmido pCR 2.1 TOPO-LCR-E6 D2 C. **D2 7729T:** Plásmido pCR 2.1 TOPO-LCR-E6 D2 T.

Se observa que la expresión de E6 en HeLa sin tratamiento con β estradiol es la misma que se observa en el perfil de expresión con la transfección de C33A: la mayor expresión se da con la construcción A7729T (77.83 ng/μL) seguida de la construcción A7729C (61.34 ng/μL) y con la menor expresión la construcción A7729 (23.74 ng/μL). Aunque el mayor nivel de expresión se da con A7729T esto no es estadísticamente significativo con respecto a A7729C, pero ambas si son estadísticamente significativas con respecto a A7729.

Se nota el mismo perfil de expresión con tratamiento de β-estradiol, donde la mayor expresión también se da con A7729T (131.38 ng/μL), seguida de A7729C (109.54 ng/μL) y con la menor concentración de E6 la construcción A7729 (26.11 ng/μL). Al igual que en el perfil sin tratamiento con estradiol, no hay diferencia significativa entre A7729T y A7729C pero si la hay entre éstas y A7729. También se determina que las clonas A7729T (De 77.83 a 131.38 ng/μL) y A7729C (De 61.34 a 109.54 ng/μL) están respondiendo al tratamiento hormonal, ya que en ambos casos hay diferencia significativa respecto a HeLa sin β-estradiol, diferencia que no se da entre la clona A7729 (De 23.74 a 26.11 ng/μL) (Fig. 26).

9. DISCUSIÓN

La clonación de los fragmentos LCR-E6 nos permitió determinar los niveles de transcripción de E6, demostrando que la LCR de la variante D2 de VPH16 con la mutación A7729T tiene una mayor influencia sobre la capacidad transcripcional de P97 al presentar el nivel más alto de mRNA de E6, seguido de la LCR de la misma variante, pero con mutación A7729C, en contraste con la variante A1/2 que tuvo el nivel más bajo de transcripción. La diferencia en la secuencia de las dos LCR clonada de D2 reside en el nucleótido 7729, diferencia que puede influenciar la unión de factores de transcripción y así modificar la fuerza de un promotor. También existe la posibilidad de que nuevos sitios de unión a proteínas sean generados como consecuencia del cambio de nucleótido identificado.

La LCR y el promotor P97 de variantes de VPH16 ya han sido clonados en un vector de gen reportero exhibiendo diferencias en la actividad promotora, las variantes D2 y D1 mostraron un incremento de 3 veces la actividad promotora de P97, mientras que B1 y B2 fueron menos activas que la clona de referencia (A1/2) (71). Otros resultados de experimentos de transfección transitoria con fragmentos de LCR demostraron que la actividad transcripcional aumentada se atribuye a la región 3' comprendida entre la posición 7619 y 124 de las LCR de D2 y D1, incluso, las actividades de LCR combinadas de B1-D2 y B1-D1 son más altas (3.9 veces y 3.4 veces) que los fragmentos de LCR originales (69). Resultados similares se obtuvieron por Veress *et al.* (1999), quien demostró que la actividad intensificada de D2 puede atribuírsele a cambios nucleotídicos en la región 3' de la LCR (70). Kämmer *et al.*, 2000 identificó una sustitución de un nucleótido en la posición 7729 (Transición A/C) que fue característica de mayor actividad en las variantes D2 y D1. Con la ayuda de mutagénesis sitio dirigida, la transición A/C fue revertida en las variantes D2 y D1, generando Mut-D2 y Mut-D1, sin más cambios en la secuencia, con experimentos de expresión de luciferasa demostraron que el cambio de un solo nucleótido disminuyó la actividad promotora de P97 de las variantes D2 y D1, incluso más baja que la actividad promotora de la clona europea de referencia (71). Al parecer la actividad intensificada de P97 puede ser atribuida en general a las variantes D2 (54). Investigaciones ya demostraban un mayor riesgo de desarrollar CC con infecciones por variantes como D2 respecto a variantes prototipo como A1/2 (54, 50). Por lo que se asume que el potencial oncogénico aumentado de las variantes asiático-americanas puede deberse a diferencias en la actividad biológica de la proteína E6 y de la regulación al alza del promotor P97. Los resultados de nuestro estudio muestran que la actividad transcripcional de P97 de la LCR

con transición A/C (mediana = 812.8 ng/ μ L) con respecto a la variante europea es 18.1 veces más grande ($p < 0.05$) en contraste con la actividad aumentada 3 veces determinada con el gen de luciferasa (68), además la transición A/T (1382 ng/ μ L) muestra un aumento de 62.7 veces más que la variante A1/2 ($p < 0.05$). Por lo anterior, la actividad transcripcional intensificada de D2 es atribuida al cambio en el nucleótido 7729, actividad que se intensifica mucho más con la transición A/T, demostrado contundentemente en nuestro estudio.

Se tiene que considerar que los resultados obtenidos y los resultados con los que se compara se obtuvieron de diferentes modelos de expresión. Cuando se describió la mutación A7729C se clonó la región comprendida entre la posición 7009 y 124 con lo que se abarcaba la LCR y parte de E6 terminándose por acoplar a un gen reportero de luciferasa (69). En cambio, cuando describimos la mutación A7729T, se clonó la LCR completa junto con E6 completo en un vector de subclonación. Establecido que la LCR y el promotor P97 son activos en líneas celulares derivadas de carcinoma cervical como la línea C33A, donde se transfectó nuestro vector, puede inferirse que el vector utilizado tenía los suficientes elementos en la secuencia que respondieran a factores celulares de transcripción proporcionados por C33A, lo que derivó en una aumentada actividad transcripcional.

La actividad del promotor P97 es también regulada por una región intensificadora, una secuencia de DNA distal localizada a aproximadamente 300 pares de bases arriba del promotor P97 (86). Muchos factores de transcripción positivos y negativos son conocidos por su unión en esta región. Similar al promotor P97, el intensificador es activo en queratinocitos humanos y líneas celulares derivadas de carcinoma cervical, pero inactivo en células de hígado, de riñón, linfocitos y fibroblastos. Factores positivos como receptores de glucocorticoides o progesterona (GR/PR) son conocidos por su unión a esta región (87). La mutación A7729T está localizada a 273 pares de bases río arriba del promotor P97, dentro de la región intensificadora de la LCR. Además, se ha determinado una secuencia consenso de elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) a 67 pb arriba de la mutación A7729T todavía dentro del intensificador transcripcional, pero lo hasta ahora reportado en la literatura no describe alguna secuencia consenso en la mutación estudiada. Ya ha sido reportado que progesterona y hormonas glucocorticoides inducen la expresión génica de VPH16 vía tres GRE en la LCR (87).

Dada la asociación ya establecida entre la variante D2 con el desarrollo de CC en mujeres jóvenes (68), se buscaron secuencias de elementos de respuesta a estrógenos. Se comparó con la secuencia consenso ya descrita **GGTCANNNTGAC** y se encontraron tres secuencias parecidas:

ESR1 **AAGTCACCCTGACCT** MA0112.2

ESR2 **AGGTCACGNTGACC** MA0258.2

ESRRA **CCAAGGTCAC** MA0592.1

Dos secuencias son palindrómicas, secuencias ligeramente parecidas a la secuencia donde se encuentra la mutación estudiada (A7729T): **TTTAACTAA CCTAATTGCA**.

Por otro lado, el 17 β -estradiol es una hormona que junto con sus receptores α y β (ER- α , ER- β) ha sido ampliamente relacionada con el CC. Para explorar parcialmente esta relación, se diseñaron experimentos para determinar si hay efecto de este estrógeno sobre la expresión de E6 y si la mutación A7729T tiene influencia en esta expresión. En primeros ensayos se comprobó que β -estradiol aumenta la proliferación de células HeLa lo que concuerda con otro estudio donde además se encuentra que estimula la proliferación de células CaSki (62). Posteriormente, se transfectó HeLa con el plásmido pCR 2.1-TOPO-LCR-E6 D2 T para la subsecuente exposición a diferentes concentraciones de β -estradiol; los datos arrojan una relación de dosis-respuesta denotando que la LCR es estimulada de forma positiva por β -estradiol con lo que se supone la existencia de elementos de respuesta a estrógenos (ERE). Sin embargo, estos sitios de unión de ER a la LCR de VPH no han sido esclarecidos. Con este ensayo se encuentra que a una exposición de 27.3 ng/mL de β -estradiol se obtiene la mayor expresión de RNAm de E6, estableciendo una relación entre este estrógeno y E6 a través de la LCR de VPH16 D2 con mutación A7729T.

Por otra parte, para comprobar el perfil de expresión obtenido en C33A en otra línea celular, las tres clonas se transfectaron en HeLa sin exposición a estradiol. Se encuentra que la mayor expresión de E6 de VPH16 se tiene con la clona D2 T seguida de la clona D2 C y con la menor expresión la clona A1/2: es la misma tendencia determinada en C33A con lo que se confirma el mismo perfil de expresión de E6 en dos líneas celulares derivadas de carcinoma cervical. Paralelamente, un segundo grupo de HeLa transfectada con las tres clonas se trató con 27.3 ng/mL de β -estradiol, en los tres ensayos aumenta la expresión de E6 respecto al mismo ensayo, pero sin tratamiento hormonal. Solo las transfecciones con D2 T y D2 C muestran diferencia respecto a las transfecciones sin exposición a β -estradiol

($p < 0.04$), estos resultados evidencian más el hecho de que la LCR de variantes D2 responde a estrógenos y no así la LCR de A1/2. En otro modelo de estimulación hormonal se determinó que los niveles de RNAm de *E6* y *E7* de VPH18 en HeLa (62) y RNAm de *E6* y *E7* de VPH16 en SiHa aumentan significativamente por β -estradiol ($p < 0.05$) (73). Igualmente se demostró que *E6* y *E7* de VPH16 y VPH18 intensifican la expresión de mRNA de ER- α en un rango de 2.38-5.48 y de ER- β en un rango de 2.02-5.41 veces más que el control, resultados que coinciden con la inmunofluorescencia (73). También se ha descrito otro mecanismo en el que la transcripción de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* es estimulada por β -estradiol, ambos genes son componentes de AP-1, por lo que este último puede tener un papel en la respuesta temprana de proliferación inducida por estrógeno (88). Se sabe que VPH16 tiene tres sitios de unión para AP-1 en la LCR y que la sobreexpresión de *c-fos* y *c-jun* resulta en el incremento de tres veces la actividad del promotor P97 en células cervicales HT-3 (89).

10. CONCLUSIONES

La presencia de la mutación A7729T en la variante D2 de VPH16 se correlaciona significativamente con una mayor actividad del promotor de la LCR, indicando que esta mutación puede desempeñar un papel importante en la regulación de la expresión de *E6*.

La exposición a 17 β -estradiol ha demostrado tener influencia en la intensificación de la actividad del promotor con la mutación A7729T, sugiriendo una interacción compleja entre factores genéticos y hormonales en la regulación de la expresión génica de VPH16.

Estos hallazgos apuntan a una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la actividad del promotor en la LCR de VPH16, destacando la importancia de la mutación A7729T y la influencia hormonal en este proceso.

A reserva de dilucidar la precisa localización de EREs u otros factores de transcripción funcionales en el genoma de VPH16, los resultados obtenidos y relacionados al CC en mujeres jóvenes sugieren su participación en el desarrollo más temprano de este cáncer.

11. LIMITACIONES DEL PROYECTO

La principal limitación del desarrollo del proyecto fue la falta de normalización de los experimentos de transfección con un vector de control. Se tiene presente que no se recomienda omitir esta práctica debido a sus beneficios en términos de precisión y reproducibilidad de resultados. Esta limitación se debió a la falta de disponibilidad de vectores de control adecuados, así como a la insuficiencia de recursos materiales necesarios para su obtención y generación.

12. REFERENCIAS

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. (2020) Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (<https://gco.iarc.fr/today>).
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2022). Estadísticas demográficas 2020. <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/estadistica/>
3. Hanahan D & Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5): 646-74.
4. Stelzle D, Tanaka LF, Lee KK, et al. (2020). Estimates of the global burden of cervical cancer associated with HIV. *Lancet Glob Health*; published online Nov 16.
5. Crosbie E, Einstein M, Franceschi S, Kitchener HC (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 382(9895):889-99
6. Woodman CB, Collins SI, Young LS (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 7:11-22
7. Hanahan D, (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 12:31-46.
8. Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, Azizan A (2019). Human papillomavirus infection and cervical cancer: Epidemiology, screening, and vaccination-review of current perspectives. *J Oncol*. 3257939.
9. Graham SV, (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical Science*. 131:2201-2221.
10. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. (2019). Cervical cancer. *Lancet*. 393:169-182
11. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S, (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 370:890:907.
12. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2:16086
13. Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, et al. (1993). The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*. 67(11)6413-23.
14. De Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. (2018). The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 47:2-13

15. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. (2005). A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* 191(11):1808-16.
16. Chan WK, Chong T, Bernard HU, Klock G, (1990). Transcription of the transforming genes of the oncogenic human papillomavirus-16 is stimulated by tumor promoters through AP1 binding sites. *Nucleic Acids Res.* 18:763-769.
17. Chong T, Apt D, Gloss B, Isa M, Bernard HU, (1991). The enhancer of human papillomavirus type 16: Binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J. Virology.* 65:5933-5943.
18. Thierry F, Heard JM, Dartmann K, Yaniv M, (1987). Characterization of a transcriptional promoter of human papillomavirus 18 and modulation of its expression by simian virus 40 and adenovirus early antigens. *J Virology.* 61:134-142.
19. Di Maio D, Petti LM, (2013). The E5 proteins. *Virology.* 445:99-114.
20. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA, (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* 30(Suppl. 5):F55-F70.
21. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E, (1989). The HPV-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 234:934-7.
22. Werness BA, Levine AJ, Howley PM, (1990). Association of human papillomavirus type 16 and 18, E6 protein with p53. *Science.* 248:76-9.
23. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM, (1993). Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol.* 13:4918-27.
24. Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernov OB, Strark GR, (1998). The p53 network. *J Biol Chem.* 273:1-4.
25. Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM, (1992). Interactions of HPV E6 and E7 with tumor suppressor gene products. *Cancer Surv.* 12:197-217.
26. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H, (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology.* 324(1):17-27.

27. Day PM, Roden RBS, Lowy DR (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication E2, to PML oncogenic domains. *J. Virol.* 72: 142-50.
28. Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H, (2012). Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front Microbiol.* 3:152.
29. Garcia-Vallve S, Iglesias-Rozas JR, Alonso A, Bravo IG, (2006). Different papillomaviruses have different repertoires of transcription factor binding sites: Convergence and divergence in the upstream regulatory region. *BMC Evol Biol.* 6:20.
30. Steger G & Corbach S, (1997). Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virology.* 71:50-58.
31. Hadaschik D, Hinterkeuser K, Oldak M, Pfister HJ, and Smola-Hess S, (2003). The papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation. *J Virology.* 77:5253-5265.
32. Mantovani F, Banks L (1999). Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical cancer derived cell lines. *Oncogene* 18, 3309-3315.
33. Krajewski S, Krajewska M, Reed JC (1996). Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. *Cancer research* 56, 2849-2855.
34. Ramírez IG, Ramírez de Arellano A, Jave-Suárez LF, Hernández Silva CD, García Chagollan M, Hernández Bello J, Lopez-Pulido EI, Macias Barragan J, Montoya Buelna M, Muñoz-Valle JF, Pereira-Suárez AL (2019). Interaction between 17 β -estradiol, prolactin and human papillomavirus induce E6/E7 transcript and modulate the expression and localization of hormonal receptors. *Cancer Cell Int* 19:227.
35. Auborn KJ, Woodworth C, DiPaolo JA, Bradlow HL (1991). The interaction between HPV infection and estrogen metabolism in cervical carcinogenesis. *Int J Cancer* 49:867-9
36. McPhillips MG, Oliveira JG, Spindler JE, Mitra R and McBride AA, (2006). Brd4 is required for E2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomavirus. *J Virology.* 80:9530-9543.

37. Wu SY, Lee AY, Hou SY, Kemper JK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chiang CM, (2012). Brd4 links chromatin targetin to HPV transcriptional silencing. *Genes Dev.* 20: 2383-2396.
38. Tan SH, Gloss B, Bernard HU, (1992). During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res.* 20:251-256.
39. Schwartz, S. (2008). HPV-16RNAPro- cessing. *Front.Biosci.* 13, 5880–5891.
40. Moody CA, Laimins LA, (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 10:550-560.
41. Huertas-Salgado A, Martín-Gámez DC, Moreno P, Murillo R, Bravo MM, Villa L, et al., (2011). E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: and updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology.* 410(1):201-15.
42. Richard C, Lanner C, Naryzhny SN, Sherman L, Lee H, Lambert PF, et al., (2010). The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer. *Oncogene.* 29(23):3435-45.
43. Smith JA, Haberstroh FS, White EA, Livingston DM, DeCaprio JA, Howley PM. (2008). SMCX and components of the TIP60 complex contribute to E2 regulation of the HPV E6/E7 promoter. *Virology.* 468-470:311-21.
44. Burk RD, Harari A, Chen Z, (2013). Human papillomavirus genome variants. *Virology.* 445(1-2):232-43.
45. Casas L, Galvan SC, Ordoñez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J, (1999). Asian-american variants of Human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer.* 83(4):449-55.
46. Ordóñez RM, Espinosa AM, Sánchez-González DJ, Armendáriz-Borunda J, Berumen J, (2004). Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gen Virol.* 85(Pt 6):1433-44.
47. Jackson R, Togtema M, Lambert PF, Zehbe I, (2014). Tumourigenesis driven by the human papillomavirus type 16 Asian-American E6 variant in a three-dimensional keratinocyte model. *PLoS One.* 9(7): e101540.

48. Hubert WG, (2005). Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle. *J Virol.* 79(10):5914-22.
49. Hang D, Gao L Sun M, Liu Y, Ke Y, (2014). Functional effects of sequence variations in the E6 and E2 genes of Human papillomavirus 16 European and Asian variants. *J Med Virol.* 86(4):618-26.
50. Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, Garcia-Carranca A, (1994). Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer.* 56(5):640-5.
51. Hang D, Gao L Sun M, Liu Y, Ke Y, (2014). Functional effects of sequence variations in the E6 and E2 genes of Human papillomavirus 16 European and Asian variants. *J Med Virol.* 86(4):618-26.
52. Lu X, Lin Q, Lin M, Duan P, Ye L, Chen J, et al., (2014). Multiple-integrations of HPV16 genome and altered transcription of viral oncogenes and cellular genes are associated with the development of cervical cancer. *PLoS One.* 9(7):e97588
53. Ordóñez RM, Espinosa AM, Sánchez-González DJ, Armendáriz-Borunda J, Berumen J, (2004). Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gen Virol.* 85(Pt 6):1433-44
54. Hang D, Gao L Sun M, Liu Y, Ke Y, (2014). Functional effects of sequence variations in the E6 and E2 genes of Human papillomavirus 16 European and Asian variants. *J Med Virol.* 86(4):618-26.
55. Boulet GA, Benoy IH, Depuydt CE, Horvarth CA, Aerts M, Hens N, et al., (2009). Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia ≥ 2 in a liquid-based cytology setting? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 18(11):2992-9.
56. Broccolo F, Fusetti L, Rosini S, Caraceni D, Zappacosta R, Ciccocioppo L, et al., (2009). Comparison of oncogenic HPV type-specific viral DNA load and E6/E7 mRNA detection in cervical samples: results from a multicenter study. *J Med Virol.* 85(3):472-82.
57. Hammer A, Rositch A, Qeadan F, Gravitt PE, Blaakaer J, (2016). Age-specific prevalence of HPV16/18 genotypes in cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 138(12):2795-803.

58. Moodley M, Sewart S, Herrington CS, Chetty R, Pegoraro R, Moodley J, (2003). The interaction between steroid hormones, human papillomavirus type 16, E6 oncogene expression, and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 13(6):834-42.
59. Nilsson, S. & Gustafsson, J.A. (2011). Estrogen Receptors: Therapies Targeted to Receptor Subtypes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 89:44-55
60. Moreno, V., Bosch, F.X., Munoz, N., Meijer, C.J., Shah, K.V., Walboomers, J.M., Herrero, R., & Franceschi, S. (2002). Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359:1085-1092
61. Castro Romero, J.I., Hernandez, G.C., & Madrid, M., V. (2011). Hormonal contraception as a risk factor for developing cervical cancer: biological, epidemiological and immunological evidence. *Ginecol Obstet Mex* 79:533-539
62. Kim CJ, Um SJ, Kim TY, Kim EJ, Park TC, Kim SJ, Namkoogn, Park JS, (2000). Regulation of cell growth and HPV genes by exogenous estrogen in cervical cancer cells. *Int J Gynecol Cancer*. 10:157-164.
63. Hammer A, Rositch A, Qeadan F, Gravitt PE, Blaakaer J, (2016). Age-specific prevalence of HPV16/18 genotypes in cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 138(12):2795-803.
64. Casas L, Galvan SC, Ordoñez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J, (1999). Asian-american variants of Human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer*. 83(4):449-55.
65. Guardado-Estrada M, Juárez-Torres E, Román-Bassaure, Medina-Martínez I, Alfaro A, Benuto RE, et al., (2014). The distribution of high-risk human papillomaviruses is different in young and old patients with cervical cancer. *PLoS One*. 9(10).
66. Bruni L, Diaz M, Castellsgué X, Ferrer E, Bosch FX, de San José S, (2010). Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*. 202(12):1789-99.
67. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, et al., (2001) Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 93(17):1325-30.
68. Alfaro A, Juárez-Torres E, Medina-Martínez I, Mateos-Guerrero N, Bautista-Huerta M, Román-Bassaure E, Villegas-Sepúlveda N, Berumen J, (2016). Different Association of Human Papillomavirus 16 Variants with Early and Late Presentation of Cervical Cancer. *PLoS One*. 11(12).

69. Hubert WG, (2005). Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle. *J Virol.* 79(10):5914-22.
70. Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H, (1999). Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *Journal of General Virology.* 80:1035-1043.
71. Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H, (2000). Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *Journal of General Virology.* 81:1975-1981.
72. Kim CJ, Um SJ, Kim TY, Kim EJ, Park TC, Kim SJ, Namkoogn, Park JS, (2000). Regulation of cell growth and HPV genes by exogenous estrogen in cervical cancer cells. *Int J Gynecol Cancer.* 10:157-164.
73. Ramírez IG, Ramírez de Arellano A, Jave-Suárez LF, Hernández Silva CD, García Chagollan M, Hernández Bello J, Lopez-Pulido EI, Macias Barragan J, Montoya Buelna M, Muñoz-Valle JF, Pereira-Suárez AL (2019). Interaction between 17 β -estradiol, prolactin and human papillomavirus induce E6/E7 transcript and modulate the expression and localization of hormonal receptors. *Cancer Cell Int* 19:227.
74. Remoue F, Jacobs N, Miot V, Boniver J & Delvenne P (2003). High intraepithelial expression of estrogen and progesterone receptors in the transformation zone of the uterine cervix. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 189 1660–1665. (doi:10.1016/S0002- 9378(03)00852-4).
75. Mitrani-Rosenbaum S, Tsvieli R & Tur-Kaspa R 1989 Oestrogen stimulates differential transcription of human papillomavirus type 16 in SiHa cervical carcinoma cells. *Journal of General Virology* 70 2227–2232. (doi:10.1099/0022-1317-70-8-2227)
76. Elson DA, Riley RR, Lacey A, Thordarson G, Talamantes FJ & Arbeit JM 2000 Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer Research* 60 1267–1275.
77. Chen YH, Huang LH & Chen TM, (1996) Differential effects of progestins and estrogens on long control regions of human papillomavirus types 16 and 18. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 224 651–659. (doi:10.1006/

78. Chan WK, Klock G & Bernard HU 1989 Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *Journal of Virology* 63 3261–3269.
79. Mittal R, Pater A & Pater MM 1993 Multiple human papillomavirus type 16 glucocorticoid response elements functional for transformation, transient expression, and DNA-protein interactions. *Journal of Virology* 67 5656–5659.
80. Klinge CM 2001 Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research* 29 2905–2919. (doi:10.1093/nar/29.14.2905)
81. de Villiers EM 2003 Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *International Journal of Cancer* 103 705–708. (doi:10.1002/ijc.10868).
82. Chung SH, Wiedmeyer K, Shai A, Korach KS & Lambert PF (2008). Requirement for estrogen receptor alpha in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Research* 68 9928–9934
83. Cullen AP, Reid R, Campion M, Lörincz AT, (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol.* 65(2):606-12.
84. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, et al., (2004). Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol.* 92(3):873-80.
85. Brake T, Lambert PF, (2005). Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(7):2490-5.
86. Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, Fulciniti F, Botti G, Greggi S, et al., (2011). Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol.* 121(1):32-42.
87. Khare S, Pater MM, Tang SC, Pater A, (1997). Effect of glucocorticoid hormones on viral gene expression, growth, and dysplastic differentiation in HPV16-immortalized ectocervical cells. *Exp Cell Res.* 232:232:353-60.
88. Weisz A, Rosales R, (1990). Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucl Acids Res.* 18:5097-106.
89. Nurnberg W, Artuc M, Vorbrueggen G et al., (1995). Nuclear proto-oncogen products transactivate the human papillomavirus type 16 promoter. *Br J Cancer.* 71:1018-24