

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

*ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA REGIÓN
LARGA DE CONTROL Y DEL GEN E2 DE
VARIANTES GENÓMICAS DEL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO TIPO 18*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

ALEJANDRO LÓPEZ SAAVEDRA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS:

A la doctora Marcela Lizano Soberón por su asesoría a lo largo de este trabajo

A todos mis compañeros del laboratorio por sus comentarios siempre necesarios y constructivos

A la doctora Leticia González Maya por todas sus aportaciones y apoyo en este trabajo

Al programa de posgrado en Ciencias Biológicas por el espacio brindado y por la oportunidad de realizar esta tesis

A CONACYT por el sustento económico

A todos mis amigos y compañeros del instituto por los buenos momentos y por el apoyo brindado a este trabajo

Tabla de Contenido

RESUMEN

SUMMARY

Índice de tablas

Índice de figuras

Lista de abreviaturas

1. INTRODUCCIÓN

Epidemiología y etiología del cáncer cérvicouterino

Patología

Biología molecular del virus del papiloma humano

Las variantes intratipo del virus del papiloma humano

Justificación

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

ADN de biopsias de cáncer cérvicouterino

Bacterias

Líneas celulares

Plásmidos

Construcción de vectores

La Transfección

La transfección en líneas celulares de cáncer cervicouterino

Ensayo de luciferasa

4. RESULTADOS

Construcción de vectores reporteros que contiene las diferentes LCR's de las variantes virales de VPH18

Transfección y análisis de la actividad transcripcional en líneas celulares de cáncer cérvicouterino

5. DISCUSIÓN

6. CONCLUSIONES

7. APÉNDICE A

8. REFERENCIAS

Palabras clave:

Cáncer cérvico uterino, VPH, Variantes virales, LCR, E2, Actividad transcripcional, Histopatología

Índice de tablas

- Tabla 1.1 Proteínas celulares que se unen a E6
- Tabla 1.2 Proteínas celulares que se unen a E7
- Tabla 1.3 Proteínas celulares que se unen a E1
- Tabla 1.4 Los tipos virales de papiloma mas estudiados y sus propiedades clínicas
- Tabla 3.1 Reacción de amplificación por PCR de las distintas LCR's
- Tabla 3.2 Condiciones de amplificación de las LCR's
- Tabla 3.3 Digestión del plásmido y de la LCR de cada variante viral con *Hind III*
- Tabla 3.4 Restricción con *Sma I* de los productos digeridos con *Hind III*
- Tabla 3.5 Reacción de ligación entre las distintas LCR's y el vector pGL2 - Basic
- Tabla 3.6 Digestión de pCG E2 con *Xba I*
- Tabla 3.7 Restricción con *Bam HI* del producto digerido con *Xba I*
- Tabla 3.8 Digestión de plásmidos pSEK - 455 y pGL2-Basic con *Hind III*
- Tabla 3.9 Segunda digestión con *Kpn I* de plásmidos pSEK-455 linealizados con
- Tabla 3.10 Reacción de ligación para la construcción de pSEK - Luc
- Tabla 3.11 Amplificación de LCR's para comprobar presencia de inserto en las construcciones
- Tabla 3.12 Condiciones de amplificación de las LCR's a partir de plásmidos
- Tabla 3.13 Linealización con *Hind III* de plásmidos pLCR-Luc purificados
- Tabla 3.14 Digestión con segunda enzima *Sma I* para liberar inserto de vectores
- Tabla 3.15 Reacción de secuenciación automatizada para comprobar identidad de las LCR's
- Tabla 3.16 Condiciones de ciclado y temperatura para la reacción de secuenciación
- Tabla 3.17 Mezcla de reactivos para la transfección
- Tabla 4.1 Cambios en la secuencia nucleotídica de la LCR de variantes de VPH18
- Tabla 4.2 Ejemplo de ajuste de datos obtenidos de la transfección de HeLa con los vectores reporteros
- Tabla 4.3 Cambios en la secuencia del gen E2 y en la secuencia deducida de aminoácidos para cada variante viral

Índice de figuras

- Figura 1.1 Mortalidad en mujeres con cáncer en México para el año 2002
- Figura 1.2 Viriones del VPH
- Figura 1.3 Genoma del VPH
- Figura 1.4 Interacción entre E6, E7 y proteínas celulares involucradas en el ciclo celular
- Figura 1.5 E1 y la replicación
- Figura 1.6 Estructura de E2
- Figura 1.7 Interacción entre E2 y la LCR
- Figura 1.8 E2 y la transcripción
- Figura 1.9 La región larga de control, LCR
- Figura 1.10 El ciclo viral en el epitelio estratificado
- Figura 3.1 Plásmido pGL2-Basic
- Figura 3.2 Construcción de vectores
- Figura 3.3 Vector de expresión de E2
- Figura 3.4 pSEK-455-CAT
- Figura 3.5 Construcción, clonación y secuenciación del vector con las LCR's de las variantes
- Figura 3.6 ADN acomplejado con liposomas catiónico
- Figura 3.7 Proceso de transfección por medio de lipofección
- Figura 3.8 Mezcla de transfección para cada pozo
- Figura 3.9 Reacción de bioluminiscencia
- Figura 3.10 Ensayo para medir luciferasa
- Figura 4.1 Cambios nucleotídicos en la LCR de variantes E y Af
- Figura 4.2 Expresión de GFP en las líneas de CaCu como control de eficiencia de transfección
- Figura 4.3 Transfección de HeLa con los distintos vectores pLCR-Luc
- Figura 4.4 Transfección de CaLo con los distintos vectores pLCR-Luc
- Figura 4.5 Transfección de SiHa con los distintos vectores pLCR-Luc
- Figura 4.6 Transfección de C-33 A con los distintos vectores pLCR-Luc
- Figura 4.7 Comparación de la actividad transcripcional basal de cada variante viral en las distintas líneas celulares
- Figura 4.8 Transfección de HeLa con los distintos vectores pLCR-Luc y pCG E2

- Figura 4.9 Transfección de CaLo con los distintos vectores pLCR-Luc y pCG E2
- Figura 4.10 Transfección de HeLa con el vector reportero pSEK-Luc y los vectores de expresión pCG E2
- Figura A1 Amplificación por PCR de la LCR a partir de ADN de tumores de cérvix
- Figura A2 Plásmido pGL2-Basic y LCR's de variantes, producto de PCR, cortados con *Hind III* y *Sma I* para posteriormente ligarse
- Figura A3 Plásmidos pLCR-Luc purificados por minipreparaciones rápidas
- Figura A4 Digestión de construcciones purificadas por minipreparaciones con *Sma I* y *Hind III*
- Figura A5 Amplificación de LCR a partir de las construcciones pLCR-Luc, purificadas por minipreparaciones rápidas de transformantes positivas
- Figura A6 Digestión de vectores de expresión pCG E2 para cada variante viral
- Figura A7 Digestión de vector pSEK con enzimas *Hind III* y *Kpn I* para liberar la región promotora
- Figura A8 Digestión de vectores pSEK-Luc
- Figura B1 Cromatogramas correspondientes a la secuencia de la LCR de la variante AsAi

RESUMEN

La infección persistente con tipos de alto riesgo oncogénico del virus del papiloma humano (VPH), como los tipos 16 y 18, es necesaria para el desarrollo del 99.8% de los casos de cáncer cérvicouterino (CaCu). El VPH18 está asociado con mas frecuencia a tipos histológicos glandulares de CaCu, como adenocarcinoma y carcinoma adenoescamoso. La incidencia del CaCu es muy alta en países en vías de desarrollo, como México, esto puede deberse a que los sistemas de salud pública son menos eficientes que aquellos de los países desarrollados. Sin embargo, otra posibilidad es que nuestra población esté expuesta a variantes virales con mayor potencial oncogénico. Todos los tipos virales de VPH contienen variantes genómicas que difieren entre sí por 1-5 % de su secuencia nucleotídica y se agrupan en ramas filogenéticas, según los grupos étnicos humanos a los que han sido generalmente asociadas. Las variantes de VPH18 se agrupan en las ramas Europea (E), Asiático-Amerindia (AsAi) y Africana (Af).

Diversos grupos de investigación han demostrado diferencias funcionales entre las variantes virales del VPH, sugiriendo que estas pueden repercutir en su potencial oncogénico. Lizano M y col (1997) analizó la distribución de variantes del VPH18 en biopsias de distintos tipos histológicos de CaCu¹¹⁹. La variante Af se encontró solo en carcinomas escamosos, que tienen un pronóstico clínico mas favorable que otros tipos histológicos de CaCu, como carcinomas adenoescamosos y adenocarcinomas, donde las otras variantes virales, E y AsAi, fueron encontradas. En otro estudio la misma variante Af fue también encontrada solo en citologías normales y lesiones premalignas¹³¹. Las variantes de VPH18 presentan cambios en la secuencia de distintas regiones del genoma viral, entre ellas la región larga de control (LCR) y el gen E2, ambos importantes en la regulación de la actividad transcripcional viral. Estos datos nos llevaron a estudiar diferencias en la actividad transcripcional entre las variantes virales, que pudieran correlacionar con la asociación de estas con los distintos tipos histológicos de CaCu y con los cambios en la secuencia génica. En el presente trabajo demostramos que los cambios en la secuencia de la LCR influyen en diferencias en la actividad transcripcional. Sin embargo, el origen histológico celular donde se analizó esta actividad, también influye en las diferencias observadas. Los cambios en la secuencia génica de E2, por el contrario, no repercutieron significativamente en diferencias de la actividad transcripcional entre las variantes, independientemente del origen histológico celular. No obstante, desconocemos el efecto que puedan tener estas variaciones en otras funciones biológicas de E2 involucradas en el control del ciclo viral.

Demostramos también que la variante Af tuvo la actividad transcripcional mas baja; la LCR de esta variante contiene el mayor número de cambios nucleotídicos, algunos de

ellos afectando secuencias de reconocimiento de factores de transcripción. Esto sugiere por tanto, que la variante viral Africana de VPH18 tiene una actividad biológica menos agresiva que podría influir en una progresión más lenta para el desarrollo de una lesión cervical de alto grado.

La información generada de este estudio contribuye al entendimiento y al pronóstico de aquellas lesiones premalignas infectadas con distintas variantes virales de VPH18.

SUMMARY

Persistent infection with high risk oncogenic HPV types is required for about 99.8 % of the cervical cancer cases worldwide. HPV18 is more prevalent in glandular histological types of cervical cancer, like adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma. Cervical cancer incidence is higher in developing countries, like Mexico, which could result from access to less efficient public health systems than in developed countries. However, another possibility is that our population could also be exposed to more oncogenic viral variants. Every HPV type occurs in form of genomic variants that diverge from each other by 1-5% of their nucleotide sequence. Viral genomic variants are grouped in phylogenetic branches, according with the human ethnic groups they have been generally associated with. The HPV18 variants are classified in the European (E), Asian-Amerindian (AsAi) and African (Af) branches.

Several publications have demonstrated functional differences among HPV variants, and suggest that such differences may have repercussions in their oncogenic potential. Lizano et al (1997) analyzed HPV18 genomic variants distribution among different histological types of cervical cancer biopsies¹¹⁹. The Af variant was found only in squamous carcinoma of the cervix, which has a better clinical prognosis than other histological types of cervical cancer, like adenosquamous carcinoma and adenocarcinoma, where the other variants, AsAi and E, were found. In another study, the Af variant was also found in normal cytology and premalignant lesions¹³¹. The HPV18 variants harbor several nucleotide differences in genomic regions like the Long Control Region (LCR) and the E2 gen, both of them important in the regulation of the viral transcriptional activity. All of these data led us study differences in the transcriptional activity among HPV18 genomic variants, that could correlate with their association with distinct histological types of cervical cancer, and with those nucleotide differences within the LCR and E2 genomic regions, among them. Here in this report, we demonstrate that the nucleotide differences in the LCR among variants rebound in differences in their transcriptional activity. However, the histological type of the cell lines, where these activities were analyzed, also accounts for the observed differences. By the contrary, the nucleotide differences in the sequence of E2 were not apparently involved in the observed differences in the transcriptional activity, no matter the histological type of the cell lines. Despite this result, we ignore how these nucleotide variations within the genomic region of E2 could affect other biological functions of this protein.

In addition, we also demonstrate that the Af variant had the lowest transcriptional activity. Its LCR harbors the highest number of nucleotide changes among the HPV18 variants, some of them embedded in transcription factor binding sites. This result suggests that the

Af variant has a less aggressive biological activity, that may be involved in a slower progression of the cervical lesion.

Our results provide a better understanding and prognosis of those premalignant cervical lesions infected with distinct viral genomic variants of HPV18.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología y etiología del cáncer cérvico uterino

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer cérvico uterino (CaCu) es la segunda mayor causa de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo, con unas 300 000 muertes al año. El 80% de los casos, cerca de 500 000 cada año, ocurren en los países en vías de desarrollo ¹. Tan solo en el año 2002 se presentaron 493 243 y de estos, 273 505 fueron decesos ².

En México en el año 2002, de los 12 512 nuevos casos de cáncer cérvico uterino, 5 777 fueron decesos ². Esta enfermedad fue la primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer, ocupando un 16.6 % de otros cánceres (figura 1.1).

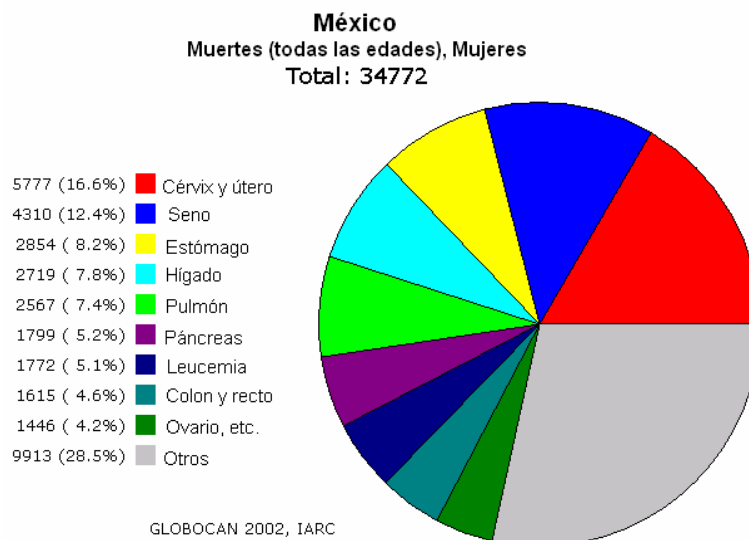


Figura 1.1 Mortalidad en mujeres con cáncer en México para el año 2002. El 16.6 % de los decesos por cáncer corresponden al cáncer cérvico uterino ². Esta enfermedad fue la primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer. **Fuente:** GLOBOCAN 2002. <http://www-dep.iarc.fr/>

1.1.1 El virus del papiloma humano

Casi todos los casos de cáncer cérvico uterino (99,8%) se deben a tipos específicos de un virus ADN tumoral transmitido por vía sexual, que se denomina virus del papiloma humano (VPH). La infección es un requisito necesario para el desarrollo de esta enfermedad ³. La infección por VPH puede ser causa de otros carcinomas ano genitales incluyendo de pene ²⁵, vagina ²⁶, vulva ²⁷ y ano ²⁸.

1.1.2 Historia del VPH con el CaCu

Por mucho tiempo se sospechó una etiología infecciosa para las verrugas, esto se demostró al fin en el siglo XIX. Uno de los primeros reportes de transmisión de verrugas en humanos fue por un accidente ocurrido en 1845 a un fabricante de velas de cera, que mientras estaba removiendo un condiloma acicular con su instrumento se lastimó debajo de la uña. Tiempo después apareció en el lugar de la lesión una verruga, que luego de destruirla repetidamente reaparecía, hasta que la uña fue finalmente removida. En otro experimento, Ullmann inoculó extractos de papilomas laríngeos en heridas hechas por el mismo en su brazo, 9 meses después una verruga brotó en el sitio de inoculación ⁴.

Las verrugas genitales y el CaCu siempre fueron referidos como manifestaciones de enfermedades venéreas comunes, tales como sífilis y gonorrea. Esta teoría fue rebatida por una escandalosa publicación en 1917. Se usó un extracto de condiloma de pene, obtenido de un joven estudiante de medicina que no presentaba síntomas de enfermedad venérea alguna. El extracto fue inoculado en el antebrazo del autor y el de su asistente, así como en la mucosa genital de una "*virgo intacta*". Después de 2.5 meses la desafortunada mujer desarrolló condiloma genital y en los brazos de los varones aparecieron verrugas ⁵. Estos y otros experimentos concluyeron que las verrugas genitales representaban enfermedades distintas, causadas por un agente transmisible.

El concepto de que algunas verrugas pueden progresar a la malignidad fue establecido por los estudios de Shope, Rous y otros, que estudiaron la transmisión de verrugas que aparecen de manera natural en los conejos llamados de cola de algodón. Al inocular conejos domésticos con extracto de verrugas de los primeros, ellos descubrieron que las lesiones formadas eran sensibles a progresión maligna ⁶. También se demostró que tales extractos causaban verrugas solo en conejos y no en otros animales, lo que ilustra la especificidad del virus por su hospedero. El primer virus del papiloma fue aislado de conejos por Richard Shope en 1933. El Dr. Harald zur Hausen fue el primero en demostrar, por medio de experimentos de hibridación, que las verrugas genitales y los tejidos de cáncer de cérvix, contienen genomas del virus del papiloma humano ^{7, 8, 9, 10}.

1.1.3 Factores de riesgo para la infección

El riesgo de contraer un VPH genital está influenciado por la actividad sexual, por lo que el CaCu sigue un patrón típico de enfermedades transmitidas sexualmente.

- ④ Promiscuidad. Hay una fuerte asociación entre el número de parejas que han tenido tanto la mujer como su compañero a lo largo de su vida y la adquisición del VPH ¹¹.
- ④ Actividad sexual a temprana edad.
- ④ Tener historial de otras enfermedades transmitidas sexualmente.
- ④ Verrugas genitales, test de papanicolaou con resultados anormales.
- ④ Pareja sexual con cáncer de cérvix o de pene.
- ④ Edad. La infección es más común en mujeres jóvenes, de 18 a 30 años de edad, después decrece la prevalencia. El CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer ^{12, 13}.
- ④ Persistencia viral. Común entre los tipos virales de alto riesgo y factor determinante en el desarrollo a cáncer.
- ④ Uso prolongado de anticonceptivos orales. La región reguladora viral (LCR) contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducibles por hormonas esteroidales como la progesterona (en los anticonceptivos orales) y la dexametasona. Se ha reportado el uso de anticonceptivos orales y la alta positividad al ADN viral ¹⁴.
- ④ Coinfección con otros virus, como el del herpes simple (HSV) tipo 2, citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano tipos 6 y 7, detectados todos en el cérvix.
- ④ Carga viral. Correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad. El VPH16 puede alcanzar una carga viral más alta que otros tipos virales
- ④ Predisposición genética. Representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor. La herencia afecta la susceptibilidad a la infección por VPH, la capacidad para resolverla y el tiempo de desarrollo de la enfermedad ¹⁵.
- ④ Variantes virales intratipo.

1.1.4 Prevalencia, regresión y persistencia

La prevalencia de infección por VPH alrededor del mundo en mujeres va de un 2 % a un 44 % ¹⁶, más alta entre mujeres jóvenes, decayendo conforme la edad aumenta ¹⁷. Además, la incidencia de infección con tipos virales oncogénicos parece ser más alta que aquella con tipos virales no oncogénicos ^{18, 19}.

La mayoría de las lesiones leves o moderadas revierten espontáneamente en individuos inmunocompetentes ²⁰. Se sabe que más del 70 % de las adolescentes sexualmente activas y mujeres jóvenes adquieren una infección por VPH. Sin embargo, la mayoría

son transitorias y solo cerca del 25 % desarrollan una lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL). Después, solo del 20 al 40 % de estas LSIL progresarán a lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL). Esto significa que de aquellas mujeres que en alguna ocasión adquieren un VPH, solo el 5 o 10 % desarrollarán una HSIL, mientras que cerca del 90 % de las mujeres infectadas no mostrarán evidencia alguna del tipo viral adquirido después de 12 a 36 meses ^{21, 22}. Sin embargo, en aquellos con una deficiencia inmune, heredada o inducida farmacológicamente, hay una fuerte tendencia para que la infección persista y malignice en caso de infección con VPH de alto riesgo oncogénico. Si el virus persiste en forma latente, una mujer que parece haber tenido una regresión de su infección entre sus visitas de seguimiento estaría aún en riesgo de desarrollar alguna lesión asociada al VPH.

Se ha encontrado que la infección con múltiples tipos virales de VPH está asociada con persistencia ²³. Los estudios de Bachtary y van der Graaf sugieren que la infección múltiple está asociada con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad ²⁴. No está claro si esto es debido a la susceptibilidad del hospedero, la interacción entre los virus o la probabilidad de progresión independiente en cada tipo viral.

1.2 Patología

1.2.1 Desarrollo de lesiones y cáncer

El resultado usual de la infección por VPH es una verruga o papiloma. Las verrugas de la piel pueden ser verrugas planas (superficiales) o verrugas plantares (mas profundas). El 90 % de las verrugas genitales, o condilomas, son causadas por los tipos virales 6 y 11 ²³.

Los virus genitales, tanto oncogénicos como no oncogénicos, pueden causar LSIL en la zona de transformación del cuello uterino. LSIL, también conocido como NIC 1 (neoplasia intraepitelial cervical, grado 1), son manifestaciones transitorias de la infección viral productiva; presenta mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en el tercio inferior del epitelio, este se diferencia y madura, mostrando anormalidades menores de la célula. La zona de transformación del cuello uterino es la unión entre el epitelio columnar del endocervix y el epitelio escamoso del ectocervix. Es un sitio de continuos cambios metaplásicos, más activos en la pubertad y durante el primer embarazo y declinan después de la menopausia. Una metaplasia escamosa atípica, inducida por algún virus y que se desarrolle en esta región, puede progresar a una HSIL, que también se conoce como NIC 2 o NIC 3, las verdaderas precursoras del

CaCu y que se caracterizan por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en los tercios central y superior la lesión. HSIL es comúnmente positivo a los tipos virales oncogénicos que evitan la maduración y diferenciación, produciendo una replicación continua de células inmaduras y eventualmente la acumulación de anomalías genéticas que favorecen la malignidad. LSIL puede establecerse al inicio, al mismo tiempo o en ausencia de HSIL.

El CaCu de células escamosas es el más común, mientras que el 10 % de los casos son de origen glandular, es decir adenocarcinoma. Este también contiene VPH pero la correlación es menos pronunciada y es dependiente de la edad. Cerca del 50% de las mujeres con adenocarcinoma in situ (AIS) tienen también NIC y es a menudo encontrado en pacientes que han sido operados por carcinoma escamoso. El adenocarcinoma invasor puede ser puro o mezclado con carcinoma de células escamosas, con lo que se denomina carcinoma adenoescamoso. La incidencia de estos cánceres aumenta en los países desarrollados sobre todo en mujeres jóvenes, se cree que esto puede deberse al incremento en el consumo de anticonceptivos orales.

1.2.2 Diagnóstico y tratamiento

La detección temprana y el tratamiento oportuno del VPH en lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión a cáncer. Los métodos principales de diagnóstico han sido la histopatología y métodos citológicos como el papanicolaou, que busca cambios en las células de la zona de transformación. Recientemente se han introducido los métodos moleculares para detectar VPH en muestras clínicas. El sistema actual de reporte para clasificar la citología cervical es el de Bethesda. Las pacientes con resultados de papanicolaou anormales que no tienen una lesión cervical seria son evaluadas por colposcopia y por toma de biopsia o cono.

La escisión por medio del asa electro quirúrgica es buen tratamiento para las lesiones escamosas no invasivas. El cáncer que comienza a invadir se trata con histerectomía o con radioterapia de alta energía (18 MV). El objetivo es destruir células malignas en el cérvix, tejidos paracervicales y nodos linfáticos regionales. El cáncer localmente avanzado es tratado con radioterapia dirigida al tumor y sitios de esparcimiento.

1.2.3 Prevención

Vacunas

Zhou y colaboradores (1991) desarrollaron las partículas tipo virus (VLP) expresando los genes L1 y L2 de VPH16 en células eucariontes³⁰. Posteriormente otros científicos demostraron que solo L1 era suficiente para el ensamble de las VLP's³¹. Recientemente se reportaron resultados exitosos de la aplicación de la vacuna profiláctica VLP de L1 en 2 pruebas fase 2B multicéntricas, y mostraron protección al 100 % contra infección persistente de VPH16 y VPH18³². Existen evaluaciones internacionales en fase 3 de una vacuna profiláctica bivalente, VPH16 y 18 y otra tetravalente VPH16, 18, 6, 11, que han mostrado resultados satisfactorios y muy prometedores. La Organización Panamericana de la Salud (OPS), que es la Oficina Regional para las Américas de la Organización Mundial de la Salud, inició el pasado mes de agosto un proceso interno de preparación para la introducción de dicha vacuna, la cual fue prevista para mediados de este año 2006 en los mercados de los países miembros. También se mencionó el muy probable alto costo, por lo que se tendrá primero que hacer análisis y perfiles de precios¹²⁰.

1.3 Biología molecular del virus del papiloma humano

1.3.1 Características generales

El virus del papiloma, VP, pertenece a la familia Papillomaviridae, una familia recientemente reconocida como distinta de los polyomavirus por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus, (ICTV)³³. Estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Infechan específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies

diferentes de mamíferos, así como aves y reptiles^{34, 35}. La cápside viral tiene 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) y un diámetro de 55 nm (Figura 1.2). Los capsómeros están hechos de dos proteínas estructurales: L1 en mayor proporción y L2. El VPH es relativamente estable y debido a que no tiene una envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses.

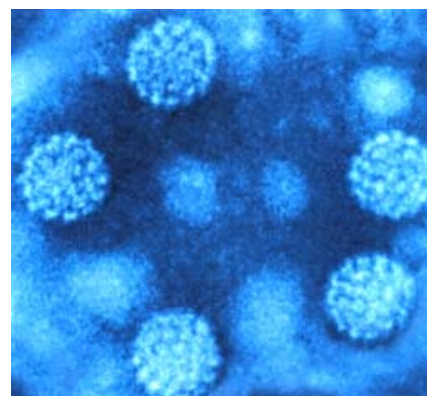


Figura 1.2 Los viriones de VPH, de 55 nm y 72 capsómeros, hechos de dos proteínas estructurales: L1 y L2.

Fuente: http://www.medizin.uni-tuebingen.de/med_virologie/exp_viro/Exp_Viro_de/Forschung/Projekte/target.html

1.3.2 El genoma del virus del papiloma humano

El genoma del VPH consiste de una molécula de ADN circular de doble cadena, aproximadamente de 8 Kb. Se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2). Figura 1.3.

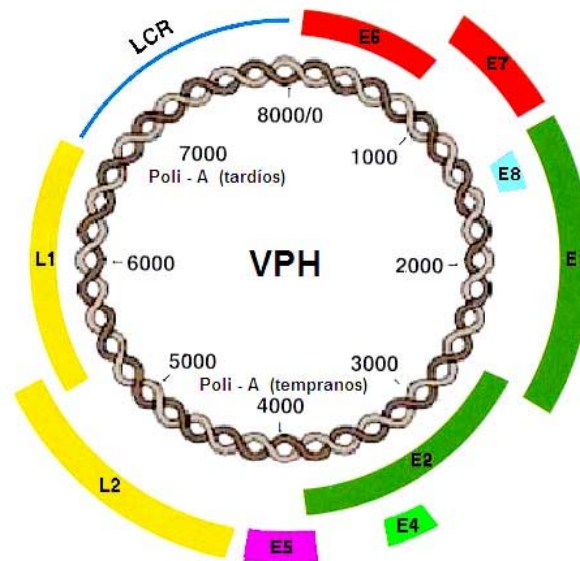


Figura 1.3 El genoma del VPH se divide en la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región temprana, que contiene a los genes E1 a E8; y la región tardía que contiene a los genes L1 y L2, los cuales constituyen la cápside viral.

Fuente: HPV HANDBOOK, 1: Human papillomavirus and cervical cancer. The European Consortium for Cervical Cancer education.

1.3.3 Las proteínas del virus del papiloma

La proteína E6

De casi 150 aminoácidos y con un peso molecular de 16 a 18 kDa, la proteína E6, codificada por el gen de aproximadamente 450 a 500 pb, tiene un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares y coopera con E7 para la plena capacidad transformante e inmortalizante. Se expresa muy 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, e incremento de la vida celular por la sobre activación de la telomerasa.

La acción clave de E6 de los VPH de alto riesgo es inhibir la función de P53, una proteína supresora de tumores, mediante su degradación por la vía de la ubiquitina^{36, 37}. Para ello E6 requiere a la proteína celular asociada a E6 (E6-AP). Esta proteína reemplaza a MDM2, que en células normales no infectadas degrada a P53 (figura 1.4). Este cambio reduce dramáticamente la vida media de P53 (desde 3 horas hasta 20 minutos) y el nivel de proteína en las células de CaCu a menos de la mitad del nivel presente en las células normales. La mayoría de las proteínas E6 de los VPH de bajo riesgo no se unen a P53 o lo hacen débilmente y no lo degradan. E6 puede también retener a P53 en el citoplasma, bloqueando su translocación al núcleo y así inhibiendo su función independientemente de su degradación³⁸. Por tanto E6 inhibe la activación o represión de la transcripción de los genes blanco de P53. E6 supera la apoptosis dependiente e independiente de p53, pues se ha visto que E6 interactúa con BAK, una proteína proapoptótica que se expresa en altos niveles en las capas superiores del epitelio en diferenciación³⁹. El incremento de P53, que se daría por la proliferación inducida por VPH, así como la consecuente inducción de apoptosis, mataría a una célula infectada por VPH antes de que la replicación de este ocurriera. Por tanto la modulación de los niveles de P53 por parte de E6 es importante para una infección productiva.

En la tabla 1.1 se resume la interacción de E6 con otras proteínas celulares, así como las posibles consecuencias funcionales que le puede acarrear a la célula.

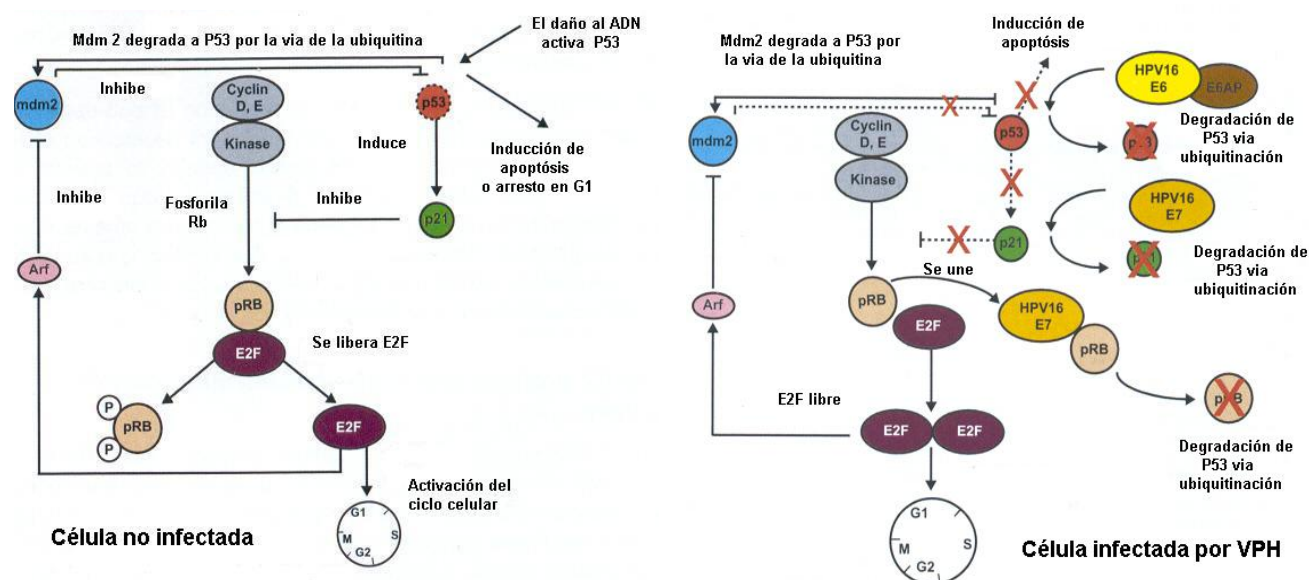


Figura 1.4 Interacción entre E6, E7 y proteínas celulares involucradas en el ciclo celular. Las proteínas virales promueven la proliferación e impiden la apoptosis.

Fuente: HPV HANDBOOK, 1: Human papillomavirus and cervical cancer. The European Consortium for Cervical Cancer education.

Tabla 1.1 Proteínas celulares que se unen a E6 ³⁴

Proteína celular blanco	Función celular de la proteína blanco	Degradación (+/-)	Posibles consecuencias de la interacción para la célula
AMF-1/Gps2	Incrementa la actividad de P300.	+	Supresión de Gps2. Activación de la transcripción Efecto antiapoptótico
BAK	Miembro de la familia Bcl2; proteína proapoptótica.	+	
CBP/P300	Coactivador de P53. Activación de genes de control del ciclo celular, diferenciación y respuesta inmune.	-	Regulación negativa de la transcripción dependiente de P53
c-Myc	Factor de transcripción; inducción de apoptosis.	+	Impedir la apoptosis dependiente de c-Myc
E6AP	Regula la transducción de señales en células en proliferación por degradación de la cinasa Blk de la familia src.	+	Desregulación de estas señales de transducción. Factor esencial para la actividad degradativa de E6
E6TP1	Proteína activadora de la GTPasa (GAP) – Regulador negativo de Rab.	+	Inhibición de la señal mitogénica mediada por Rab.
ERC55 (E6BP)	Proteína de unión a calcio, participa en la diferenciación de las células epiteliales y en la inhibición de la apoptosis.	-	Inhibición de la diferenciación terminal de células epiteliales. Inhibición de la apoptosis independiente de P53
hDLG/Sap97	Proteína supresora de tumores, importante en la formación de polaridad en células epiteliales en diferenciación. Formación y mantenimiento de las uniones intercelulares.	+	Afecta la adhesión celular, polaridad y proliferación, lo que contribuye a la actividad invasora de las células transformadas.
hScrib	Controla la formación de las uniones intercelulares epiteliales e inhibe el crecimiento celular.	+	Pérdida de la adhesión celular y de la polaridad.
Factor regulatorio 3 del interferón	Inducción del ARNm del interferón β . Transactivador de los interferones.	-	Respuesta celular inadecuada a la infección viral (no hay interferencia con la replicación viral, ni incremento de MHC-1 o activación de las células NK)
MAGI – 1/2/3	Proteínas de la unión estrecha; formación de complejo con β -catenina. Regulador del supresor de tumores PTEN	+	Afecta la señalización Akt. Inhibición de la apoptosis independiente de P53
MCM7	Iniciación de la replicación del ADN	+	Omisión del punto de arresto en G1. Posible modulación de la abundancia de MCM7
MUPP1	Proteína de andamio con múltiples sitios PDZ. Posible papel en la transducción de señales.	+	Rompimiento del ensamblaje de los complejos de señalamiento en las membranas de las células epiteliales.
Paxilina	Proteína de adhesión focal; participa en la adhesión celular y en la regulación del citoesqueleto de actina.	-	Rompimiento del citoesqueleto de actina y de las interacciones de la matriz celular.
P53	Proteína supresora de tumores. Regulación de la respuesta celular a los eventos mitogénicos.	+	Pérdida del control del ciclo celular. Efectos antiapoptóticos.
XRCC1	Proteína de reparación del ADN	-	Interferencia con la eficiencia de reparación.

La proteína E7

De casi 100 aminoácidos, con un peso molecular de 10 kDa y codificada por el gen de 300 a 320 pb. E7 posee la mayor capacidad transformante mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB, que controlan la replicación celular ⁴⁰. A su vez, pRB interactúa con factores de transcripción de la familia E2F. La unión de E7 a la forma activa de pRB conduce a la liberación de los factores E2F, independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos, lo que promueve la expresión de ciclina E, importante para el progreso de la fase S y por tanto la replicación (figura 1.4) ⁴¹.

E7 también se asocia con otras proteínas tales como desacetilasas de histonas, AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como P21 y P27. Estas interacciones inducen múltiples respuestas celulares, incluyendo la estabilización de P53, quien contrarrestaría esta replicación celular anormalmente estimulada, mediante el incremento de la apoptosis. Sin embargo, la proteína E6 degrada a P53 y por tanto bloquea esta respuesta celular. En la tabla 1.2 se resume la interacción de E7 con otras proteínas celulares y las posibles consecuencias funcionales que le puede acarrear a la célula.

La proteína E5

La proteína de 90 aminoácidos y 14 kDa, es codificada por el gen E5 de 230 a 250 pb. E5 es una proteína de membrana, hidrofóbica y hallada principalmente en el retículo endoplásmico y Golgi, pero también en la membrana citoplasmática ^{42, 43, 44}.

E5 se acompleja y sobre regula la actividad de los receptores de factores de crecimiento, como el del factor de crecimiento epidermal (EGFR) o el del crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR) ^{45, 46, 47}. E5 de VPH-16 y de VPB-1 se une también a la subunidad de 16 kDa de la ATPasa vacuolar ⁴⁸. La ATPasa es un complejo proteico, de unión a membrana, cuya subunidad de 16 kDa forma el poro por lo que pasan los iones H⁺ que acidifican el contenido de los endosomas. Esta acidificación es inhibida por E5 de VPH-16, lo que resulta en la retención del receptor, en la prolongación de su señal activa y en el reciclaje del 40 % de los receptores para anclarse de nuevo en la superficie en ausencia del ligando. Esto quizás explique el incremento en el número de EGFR observado en los queratinocitos que expresan E5 ^{44,}

⁵¹.

Tabla 1.2. Proteínas celulares que se unen a E7³⁴

Proteína celular blanco	Función celular de la proteína blanco	Posibles consecuencias de la interacción para la célula
Miembros de la familia AP1	Factores de transcripción	Abolición de la actividad de IRF-1
α-glucosidasa	Enzima del control glucolítico	Activación alostérica que sobreconsume las reservas de glucógeno. Promoción de hiperproliferación celular
Ciclina A, Ciclina E	Actividad de cinasa	Activación de ciclina A y E
Cinasa de la histona H1	Actividad de cinasa	Interferencia con la transición G2/M del ciclo celular
hTid-1	Homólogo al supresor de tumores de Drosophila Tid56 dnaj, modulador de la apoptosis	Activación de los promotores que responden a E2F
IGFBP-3 (proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina)	Blanco transcripcional de P53 que limita la disponibilidad de IGF	Decremento en la cantidad de IGFBP
IRF-1 Factor transcripcional inducido por el interferón-γ	Regula la expresión del IFN-β	Inhibición de la activación del promotor del IFN-β mediada por el IRF-1, a través de una desacetilasa de histonas
Mi2β	Desacetilasa de histonas	Abolición de la actividad transcripcional de IRF-1
MPP2	Factor de transcripción	Abolición de la actividad transcripcional de IRF-1
M2 piruvato-cinasa (M2-PK)	Modulación de la actividad de la enzima glucolítica M2	Cambio del balance desde la forma tetramérica de alta afinidad por su sustrato hacia el estado dimerico de baja afinidad de la M2-PK
pRB	Regulación del ciclo celular mediante la acomplejación con los factores de transcripción E2F	Fosforilación de pRB y subsecuente liberación de E2F, ubiquitinación y subsecuente degradación
Proteínas pocket asociadas a pRB	Regulación del control del ciclo celular	Pérdida del control del ciclo celular y activación de genes específicos para la progresión del ciclo celular
P21 ^{CIP-1}	Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas	Estimulación del crecimiento mediante la pérdida del control del ciclo celular
P27 ^{KIP-1}	Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas	Estimulación del crecimiento mediante la pérdida del control del ciclo celular
P48	Proteína reguladora del interferón (componente de unión al ADN de ISGF3). Proteína mensajera	Inhibición de las vías de señalización del interferón por medio de la translocación de P48 a núcleo dada la estimulación del IFN-α
ATPasa subunidad 4	Subunidad S4 del proteosoma 26S	Degradación de pRB mediante la unión directa la proteosoma
TAF110 (Factor asociado a la proteína de unión a la caja TATA)	Involucrada en el inicio de la transcripción; coactivador en la regulación de la transcripción	Modulación de la transcripción
TBP (Proteína de unión a la caja TATA)	Involucrada en el inicio de la transcripción	Interferencia con la activación de los promotores que responden a P53

Se ha visto sobre expresión de c-FOS y c-JUN en células de roedores que expresan E5, como NIH3T3, en presencia de EGF^{49, 50}. La LCR de los VPHs tiene sitios de unión a AP-1 y en presencia de E5 aumenta la actividad transcripcional en tales células, influyendo en la producción de los mensajeros tempranos. EGF es necesario en la fase G1 del ciclo celular, por lo que se sugiere que E5 estimula a las células a través de esta fase y en S.

Si E5 inhibe la acidificación de los endosomas tardíos en los HFK, podría también afectar la interacción de los péptidos antigénicos con el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II)⁵². Este es una proteína heterodimérica compuesta de las subunidades α y β . Entrega péptidos antigénicos desde los endosomas hasta la superficie celular para ser reconocidos por las células T CD4⁺. Los antígenos del MHC-II son sintetizados en el RE donde las subunidades α y β se asocian a una chaperona llamada *cadena invariante* (Ii). En los compartimentos endocíticos, Ii del trímero $\alpha\beta Ii$ es secuencialmente degradado por medio de cisteín y no cisteín-proteinasas que funcionan a pH ácido, hasta convertirse en el *péptido inducido por leupeptina* (LIP), de 21-22 kDa, en el *pequeño péptido inducido por leupeptina* (SLIP), de 12-14 kDa y en el *péptido Ii asociado a la clase II* (CLIP). CLIP es finalmente intercambiado por un péptido antigénico, esto catalizado por HLA-DM. Luego el dímero $\alpha\beta$ -péptido antigénico es expresado en la superficie celular como una molécula MHC-II madura. Si E5 inhibe la acidificación de los endosomas, se disminuye entonces el reconocimiento inmune de los queratinocitos infectados.

En la epidermis los queratinocitos humanos normalmente no expresan moléculas MHC-II, pero sí las de Langerhans. Se ha documentado que los queratinocitos pueden expresar moléculas MHC-II, tales como HLA-DR, -DP y -DQ en muchos desórdenes de la piel, lo que les permite funcionar como células presentadoras de antígenos e inducir una respuesta inmune. Los queratinocitos de prepucio también muestran actividad inmune (expresando HLA-DR, -DM y Ii) cuando son estimulados por interferón γ .

La proteína E1

Esta proteína nuclear de 593 (VPH 48) a 681 aminoácidos (VPH 10); y de 67.5 (VPH 47) a 76.2 kDa (VPH 10), es producto del gen más grande y conservado de los VP, casi 2 Kb de secuencia. La proteína se divide en un dominio amino terminal, que parece regular las actividades residentes en el C-terminal, pues es blanco de fosforilaciones que influyen positiva o negativamente en la función; una región espaciadora de longitud variable y una región carboxilo terminal, relacionada en función a las ATPasas y helicasas.

E1 es una 3' - 5' helicasa hexamérica dependiente de ATP, que participa en la replicación del ADN viral. Estas funciones de ATPasa y de helicasa hacen de esta proteína viral la única con actividad enzimática y se hallan codificadas en el dominio carboxilo terminal.

E1 se une al origen de replicación en la LCR, en una secuencia palindrómica de 18 pb rica en A y T, formando hexámeros y dobles hexámeros que rodean al ADN^{53, 54}. La unión causa una curvatura, crítica para el correcto ensamblaje del complejo de iniciación y para el desenrollamiento de la doble hélice (figura 1.5)^{55, 56}. E1 interactúa directamente con la ADN polimerasa α , mientras que esta necesita las proteínas RPA, que estabilizan la cadena sencilla del duplex abierto, topoisomerasas I y II y los cofactores PCNA y RFC (factor de replicación C), realizándose así la replicación.

La unión de E1 a su sitio depende de su acomplejamiento con la proteína viral E2, la cual aumenta la especificidad de E1 por su secuencia, así como su capacidad para desenrollar la doble hélice. Las interacciones E2-E1 hacen que E2 atraiga otras moléculas de E1 a un complejo inicial E2-E1-ADN. Conforme se ensamblan oligómeros más grandes de E1, E2 es finalmente desplazado por una reacción dependiente de ATP. El dominio de unión al ADN de E1 (E1DBD) estimula la actividad transcripcional de E2 dependiente de E1, lo que sugiere que la interacción E1DBD - E2TAD funciona más en la regulación de la actividad transcripcional que en la replicación del ADN viral (figura 1.5). Algunas de las interacciones de E1 con otras proteínas celulares se resumen en la tabla 1.3.

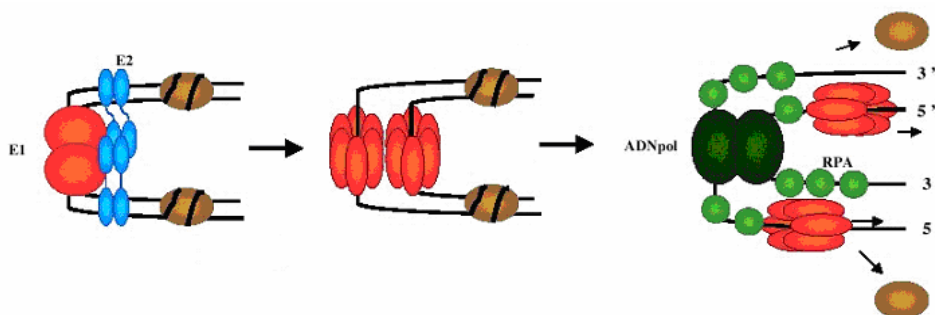


Figura 1.5 E1 y la replicación. E1 es una 3' - 5' helicasa hexamérica dependiente de ATP. Se une a su sitio en la LCR formando hexámeros. E1 interactúa con la ADN polimerasa α , mientras que esta necesita las proteínas RPA, que estabilizan la cadena sencilla del duplex abierto, topoisomerasas I y II y los cofactores PCNA y RFC para que se realice la replicación. Sin embargo, la afinidad de E1 por su sitio de unión depende de su acomplejamiento con el dominio N-terminal de E2.

Fuente: <http://www.123bio.net/revues/ibouallaga/index.html>

Tabla 1.3 Proteínas celulares que se unen a E1

Proteína celular blanco	Función celular de la proteína blanco	Posibles consecuencias de la interacción para la célula
ADN Polimerasa α subunidades p70 y p180	Replicación	Atracción hacia el complejo de iniciación, una vez liberado E2
RPA	Replicación	Estabilización de la cadena sencilla, una vez abierto el dúplex
Histona H1 ⁵⁸	Empaquetamiento de la cromatina	Descondensación de la cromatina por delante de la horquilla de replicación
Ini1/hSNF5 ⁵⁹	Regulación de la transcripción al remodelar la cromatina	Contribución de SWI / SNF en la replicación al remodelar la cromatina
Chaperona Hsp40 y Hsp70 ⁵⁴	Maduración de proteínas	Promoción de la unión de E1 hacia el ADN y de la formación de los dihexámeros en el sitio Ori.

La proteína E2

El producto del gen E2 de casi 1100 pb, es una proteína nuclear de 45 kDa. Se divide en tres dominios funcionales. El primero, en el extremo amino terminal, es el dominio de activación (E2TAD), de casi 200 aminoácidos. Este se divide en dos sub-dominios. El primero (nt 1 a 92) es el dominio helicoidal formado por tres hélices antiparalelas, mientras que el segundo (nt 110 a 201) por una lámina beta plegada antiparalela (Figura 1.6). Este es responsable de regular la transcripción y la replicación del ADN viral. Promueve la oligomerización e interacción entre moléculas de E2 unidas al ADN en sitios distantes, provocando una curvatura en el ADN y otros cambios conformacionales (figura 1.7) ^{60, 61}. El segundo dominio es el de bisagra o dominio central, de longitud y secuencia variables entre los VPs. En VPH 11 es importante para regular la función de E2 en la transcripción del ARNm y la replicación viral, además que le da estabilidad al complejo E2 - ADN. El tercer dominio, en el extremo carboxilo terminal, es de dimerización y de unión al ADN, de casi 100 aminoácidos. El dímero forma una estructura de barril- β . La hélice α 1 contiene a los aminoácidos que directamente interactúan con el ADN. Durante la dimerización, las cadenas β 2 y β 4 de cada subunidad participan en una red de puentes de hidrógeno, lo que resulta en una estructura barril β de 8 láminas (Figura 1.6).

El sitio de unión a E2 (E2BS) consiste de un palíndromo de 12 pb, ACCgNNNNcGGT que sufre un cambio conformacional al unirse la proteína. Las letras en minúsculas son las bases preferenciales pero no requeridas para la unión al ADN. La región espaciadora NNNN es de longitud conservada entre los VPs pero la secuencia varía con el tipo viral. Existen 4 sitios E2BS en la LCR de los VP-AR, ubicados hacia el 5' del promotor viral que

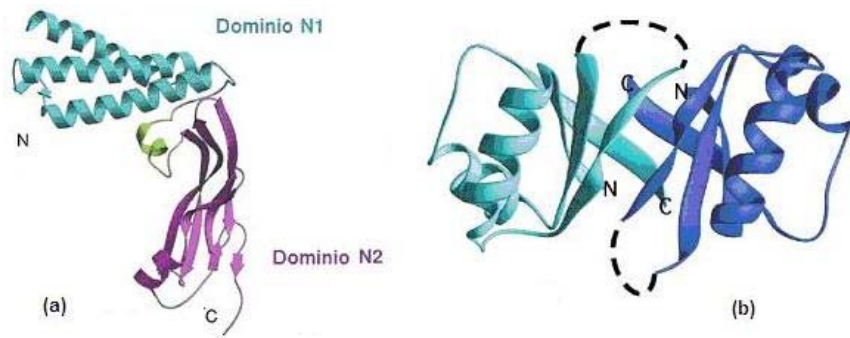


Figura 1.6 Estructura de E2. Estructuras del dominio amino terminal (a) o dominio de activación, responsable de regular la transcripción y la replicación del ADN viral. Promueve la oligomerización e interacción entre moléculas de E2 unidas al ADN en sitios distantes. El dominio carboxilo terminal (b) es de dimerización y de unión al ADN. Ambos dominios están separados por una región de longitud y secuencia más variables entre los VPs, el dominio de visagra.

Fuente: Rashmi S. Hegde (2002). *The papillomavirus E2 proteins: Structure, Function and Biology*. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 31: 343-60

regula la expresión de los genes tempranos (figura 1.7). La unión de E2 al ADN provoca la represión o activación de dicho promotor, así como la replicación del ADN viral. A su vez, estas funciones dependen de la concentración intracelular de E2, así como del sitio al cual se haya unido. La unión al sitio más próximo del promotor, BS1, no solo interfiere con la unión de TBP a la caja TATA, sino también afecta la estabilidad del complejo de preinicio de la transcripción una vez unido TBP a su sitio. La unión a los sitios BS2 y BS3 también contribuye a la represión del promotor compitiendo con factores de transcripción como SP1. La unión a BS3 es necesaria para la replicación viral. E2 es más afín a BS4 y la unión a este sitio regula positivamente la expresión génica, aunque los mecanismos no son del todo claros. E2 puede también invocar al complejo de preinicio de la transcripción (PIC) e influye en el remodelaje de la cromatina⁶², interactuando con el coactivador CBP/p300, el cual tiene una actividad de acetilación de histonas (HAT) (Figura 1.8). La interacción es débil pero se sabe que E2 también se une a la proteína celular AMF-1/Gps2, quien igualmente interactúa con el coactivador p300. Por tanto la unión de E2 a AMF-1 atrae a p300 y el resultado es la sobre expresión génica por un efecto aditivo⁶³.

E2 también tiene una función anti- proliferativa al reprimir el crecimiento e inducir apoptosis, en parte mediante la represión de la transcripción de E6 y E7, así como por el consecuente aumento de P53^{64, 65, 66}. E2 induce arresto en G1 activando el complejo p21/WAF, inhibidor del complejo ciclina E/CDK2. Este arresto lleva a la célula transformada por VPH a senescencia. La reintroducción de E2 en células HeLa provoca muerte por apoptosis⁶⁵. A diferencia del arresto en G1, esta apoptosis inducida puede ser tanto independiente de P53⁶⁶, como de secuencias virales.

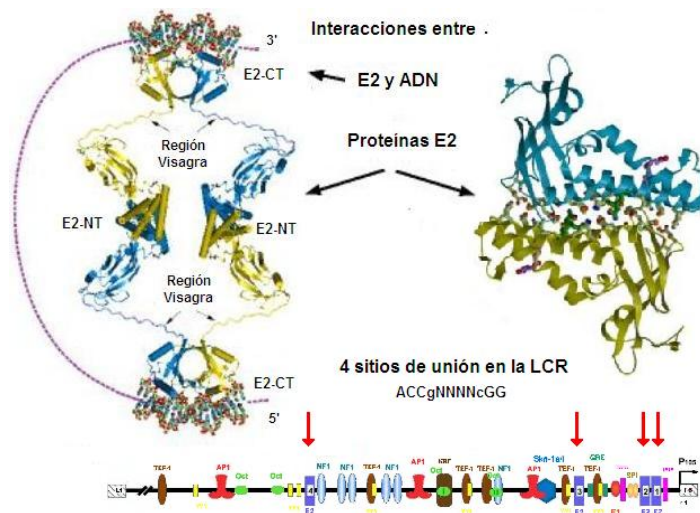


Figura 1.7 Interacción entre E2 y la LCR. El genoma de los VP-AR contiene 4 sitios de unión a E2, E2BS, en la LCR. Consisten de un palíndromo de 12 pb ACCgNNNNcGGT y se hallan hacia el 5' del promotor viral. La unión de E2 promueve la oligomerización e interacción entre moléculas de E2 unidas al ADN en sitios distantes, provocando una curvatura en la molécula de ADN y otros cambios conformacionales.

Fuente: <http://images.search.yahoo.com/search/images?p=papillomavirus&ei=UTF-8&fr=FP-tab-img-t&b=21>

La proteína E4

La secuencia codificante de E4, de casi 260 pb, está contenida dentro de aquella de E2. La proteína E4, de 10 a 44 kDa, se expresa a partir de un ARNm procesado (E1^ΔE4) de manera abundante durante las etapas tardías del ciclo viral y la replicación vegetativa del ADN viral^{67, 68, 69}. La expresión precede la síntesis de las proteínas estructurales del virus y el ensamblaje de las partículas virales. La proteína E4 se localiza en parte en los filamentos intermedios de queratina (IF) durante las LSIL, pero también se halla de manera difusa en regiones perinucleares y citoplasmáticas. E4 causa el colapso de dichas queratinas y esto se ha relacionado con la liberación de los viriones.

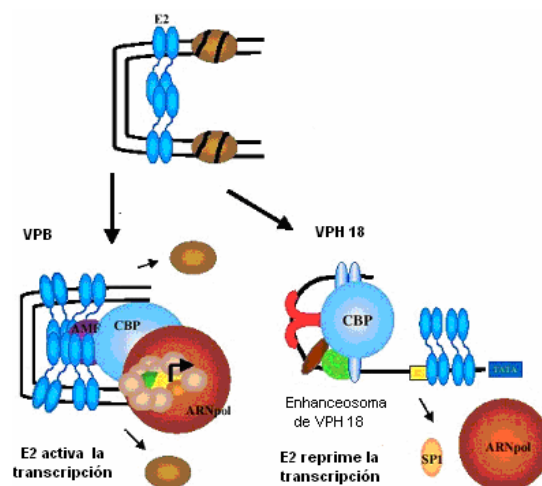


Figura 1.8 E2 y la transcripción. E2 puede también invocar al complejo de preiniciación de la transcripción (PIC) e influye en el remodelaje de la cromatina, interactuando con el coactivador CBP/p300. **Fuente:**

<http://www.123bio.net/revues/ibouallaga/index.html>

E1^ΔE4 de VPH16 causa arresto en la fase G2 del ciclo celular cuando se expresa en células HeLa y SiHa. Esto sugiere un papel antagónico con la proliferación celular inducida por E7 durante la etapa productiva de la infección, así como el requerimiento de E1^ΔE4 y E2 para inhibir la división celular durante el ciclo viral⁷⁰.

E4 puede expresarse junto con E1 y E2 durante la infección. El hecho de que ambas proteínas, E2 y E4, pueden inhibir el ciclo celular, sugiere que cooperan durante el ciclo

viral. La expresión elevada de E2 y E4 en células epiteliales en cultivo provoca la acumulación de E2 en el citoplasma y colocalización de esta con E4. La adición de E4 incrementa o disminuye la transcripción mediada por E2, dependiendo de las concentraciones relativas de ambas proteínas. A las concentraciones fisiológicas hay un incremento de la actividad transcripcional del promotor P97. Esta evidencia sugiere que durante la infección productiva, E4 regula los niveles de la proteína nuclear E2 para facilitar la amplificación del genoma viral y la expresión de proteínas tempranas ⁷¹.

La proteína E2 ^ E8

Recientemente se ha descrito una nueva proteína E2, resultado de una fusión del producto del pequeño marco de lectura E8 con el C-terminal de E2. Esta proteína de 20 kDa reprime la replicación viral, así como la transcripción y por tanto se creó que es importante para el mantenimiento del estado latente observado en las células basales del epitelio infectado ^{72,73}.

Las proteínas L1 y L2

L1 de 57 kDa, conforma el 80 % de la cápside y se expresa después de L2, de 43 a 53 kDa. Ambas se producen en células que expresan E4 ⁷⁴. La cápside contiene 360 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros de una partícula icosaedral. L2 se acumula en estructuras nucleares, conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia promonocítica (PML), durante el ensamble del virus y atrae a L1 hacia estos dominios. Se ha sugerido que en estos PML ocurre la replicación viral ⁷⁵ y que las proteínas de la cápside se acumulan en este sitio para facilitar el empaquetamiento.

La región larga de control (LCR)

La región larga de control (LCR) es un segmento genómico, que no contiene marco de lectura alguno y que sí tiene numerosos elementos de respuesta en cis que gobiernan la expresión génica y la replicación viral. El tamaño varía según el tipo viral, extendiéndose de un 7 a 11 % del genoma y de casi 850 pb en el caso de los VPH genitales.

La LCR contiene el promotor temprano; el amplificador o enhancer, de casi 230 pb y la región 5' que comprende el sitio de poliadenilación de los genes tardíos. Numerosos factores, celulares y virales, interactúan con la LCR: por citar algunos, las proteínas virales E1 y E2, que modulan la actividad transcripcional y la replicación; componentes de la maquinaria basal de transcripción como SP1 y TBP; receptores de

glucocorticoides que modulan positivamente la transcripción, así como otros factores que parecen intervenir en la especificidad por el tejido como KRF, Skn – 1a/i, TEF, AP1, etc. (Figura 1.9)⁷⁶.

Los VP infectan solo a los tejidos epiteliales de la piel y mucosas, fijándose primero a proteínas como integrina α -6 y heparán-sulfato^{77, 78, 79}. El promotor temprano, responsable de la transcripción de los oncogenes virales, es activo en células de tejido de cáncer cervical o en los queratinocitos de la piel. Sin embargo, no es activo en las células epiteliales del hígado (HepG2) o del seno (MCF7). Esta especificidad por el tejido, no muy común en muchos virus, es determinada por el amplificador transcripcional o enhancer. Se conocen familias de proteínas en las células epiteliales, asociadas a la actividad transcripcional del promotor, y cuyos miembros se hallan en diferentes cantidades y combinaciones en los diferentes tipos celulares⁸⁰⁻⁸⁹, esto podría contribuir a dicha especificidad. El complejo proteico que se ensambla en el enhancer, conocido como el enhanceosoma, interactúa con las proteínas del aparato basal de transcripción, que se

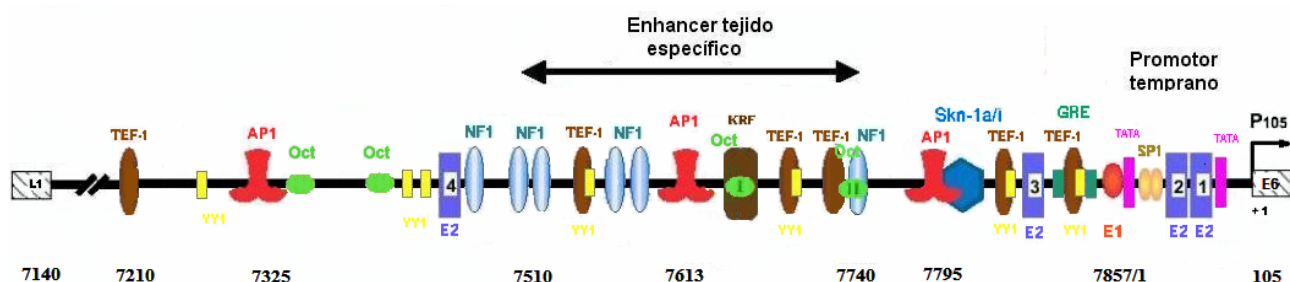


Figura 1.9 La región larga de control, LCR. La LCR contiene numerosos elementos de respuesta en cis que gobiernan la expresión génica y la replicación viral. Factores celulares y virales interactúan con esta región, como las proteínas virales E1 y E2, que modulan la actividad transcripcional y la replicación del virus; componentes de la maquinaria basal de transcripción como SP1 y TBP; receptores de glucocorticoides que modulan positivamente la transcripción, así como otros factores que parecen intervenir en la especificidad por el tejido como KRF, Skn – 1a/i, TEF, AP1, etc.

Fuente: <http://www.123bio.net/revues/ibouallaga/index.html>

unen en la región promotora hacia el extremo 3' del LCR, aumentando de esta manera la actividad transcripcional del promotor y por ende la expresión de los genes tempranos⁸¹.

De los factores celulares de transcripción que se unen a la LCR se describen algunos a continuación:

AP1

La familia AP1 comprende 7 miembros: 3 proteínas Jun (JUN B, c-JUN y JUN D); 4 proteínas FOS (c-FOS, FOS B, FRA 1 y FRA 2). La familia comparte una región básica

de unión al ADN, adyacente a un dominio de dimerización de tipo cierre de leucinas. Los dímeros JUN / FOS son los más estables, los dímeros JUN / JUN son menos estables y los dímeros FOS / FOS son muy inestables que jamás son detectados in vivo. Los dímeros de AP1 se unen al surco mayor del ADN sobre una secuencia consenso llamada TRE (TAP responsive element), 5' TGAACA 3'. El dominio activador de AP1 interactúa con coactivadores tales como CBP, SRC-1, pero también con la maquinaria transcripcional por medio de TBP, TFIIB, TAFII250, TFIIE, TFIIH. La capacidad combinatoria de AP1 es amplificada debido a que es regulada postraduccionalmente, principalmente por fosforilación. Los factores AP1 regulan de manera muy fina la transcripción de genes, sobre todo aquellos de ciclo celular. La expresión de los diferentes miembros de AP1 varía con la diferenciación celular. En las células HeLa o en los queratinocitos primarios, Jun B es el miembro Jun predominante⁸⁰. El sitio AP1 del enhancer de VPH18, de secuencia 5' TGAACA 3', une de manera preferencial al heterodímero JUNB / FRA 2⁸¹.

Proteínas del dominio POU

El nombre POU proviene de la familia de proteínas que comparten el sitio de unión al ADN: *Pit-1*, específico de la glándula pituitaria, *Oct -1* que se une a un octámero y *Unc -86* en *Caenorhabditis elegans*. Hay dos sitios de unión para Oct - 1 en el enhancer de VPH18, pero su actividad no es del todo clara. El sitio más próximo al sitio AP1 (sitio I) no está presente en VPH16. El sitio II es esencial para la actividad transcripcional de VPH16, no así para VPH18⁸². Oct reprime el amplificador de VPH18 independientemente de su sitio de unión⁸⁴, pero por otro lado, una mutación puntual en este sitio inhibe fuertemente la actividad del enhancer en células HeLa. La mutación del sitio en VPH16 reduce la actividad transcripcional en células del cérvix, mientras que en otro tipo de células se incrementa esta actividad⁸³. Un factor de la familia POU, presente solo en las células de cáncer cervical, como Brn3a, participa en la especificidad por el tejido¹²¹ de VPH18.

NF 1

NF1 (Nuclear factor 1), conocido también como CTF (CAAT box transcription factor), regula muchos genes de señalización celular. Se une como dímero al ADN en el sitio consenso TTGGC(N)₅ GCCAA. NF1 interactúa directamente con los componentes de PIC, tales como TFIIB, TBP y TAFII55. También con coactivadores tales como CBP/p300 y SRC-1, afectando la conformación de la cromatina y desplazando por competencia a las histonas H1, que se unen con poca afinidad sobre los sitios NF1. También puede ser un represor transcripcional, por competencia directa con los activadores tales como SP1, HFN4 y HFN1. En VPH16 se hallan 7 sitios NF1 e

intervienen en la especificidad por el tejido, ya que cuando se expresa de manera exógena en las células SL-2 que no expresan ese gen, puede activar la transcripción de VPH16⁸⁵. NF1 y Oct se pueden unir al ADN de manera concomitante, Oct puede servir de anclaje para NF1.

TEF

La proteína TEF-1 de 426 aminoácidos y de 53 kDa, contiene varios dominios distintos. El dominio de unión al ADN se halla en el extremo amino terminal, rico en residuos de serina. Un dominio hidrófobo constituye el dominio de dimerización, rico en residuos de prolina. El dominio de activación se halla en el extremo carboxilo terminal, rico en residuos hidróxilo (Ser, Tre y Tir). La proteína se une a su sitio consenso GGAATG, pero con mayor afinidad a un sitio doble fijándose en forma dimérica. TEF-1 no está presente en todas las formas celulares. La especificidad por el tejido se debe a su propia expresión (regulación de promotor o la estabilidad del ARNm), pero también a la necesidad por un coactivador, TIF (Transcriptional Intermediary Factor), también específico por el tejido.

YY1

A esta proteína con dedos de zinc se le llamó inicialmente “ying and yang1” por su capacidad de tanto reprimir como activar el promotor P5 de un virus adenoasociado (AAV). Su actividad represora se ha asociado con su capacidad para desplazar a los activadores transcripcionales y para doblar el ADN. Esta proteína mostró ser represora para VPH18 y mutaciones que evitaban la unión a la LCR liberaban al promotor de la represión⁸⁶. Otros estudios sugirieron que la unión de YY1 al elemento silenciador podía en realidad activar el promotor de VPH18 en el contexto de la LCR completa⁸⁷. En VPH16 se ha visto que la unión de YY1 a la LCR puede reprimir la expresión génica^{88, 89}. Es posible que YY1 pueda servir para mantener bajos niveles de transcripción viral que podría facilitar la infección a intervalos largos de tiempo.

Otros sitios potenciales

Se han propuesto otros sitios que pueden regular la especificidad por el tejido, como el que une al factor KRF-1 (Keratinocyte Restricted Factor - 1), que está hacia el 3' del sitio AP1 en VPH18. Sin embargo, este sitio no es conservado, por lo que es poco probable que esté implicado en la especificidad tisular de los virus genitales. Además la identidad del factor proteico no está determinada.

Los factores de transcripción AP2 constituyen una familia de proteínas que regulan numerosos genes implicados en procesos tales como desarrollo, diferenciación celular y apoptosis. Participa en la diferenciación del epitelio regulando la transcripción de diferentes queratinas. Estos factores se unen en forma de dímeros (homo y heterodímeros) sobre sitios consenso GCCNNNGGC. Un sitio de unión por el factor AP2, de secuencia AGGCACATATT se ha propuesto para VPH18. Sin embargo, hasta ahora ningún miembro de esta familia parece tener efecto sobre VPH18 y 16.

1.3.4 El ciclo viral

En la figura 1.10 se resume el ciclo viral y a continuación se describen brevemente cada una de las etapas de dicho ciclo.

Infección y desensamble del virión

Las viriones entran a las células basales a través de una abertura en el epitelio estratificado. Tal abertura puede ocurrir por una lesión o microtrauma en la piel. Para los VPH de alto riesgo, la formación de lesiones cervicales se facilita por la infección de células columnares que después formarán la capa basal del epitelio estratificado de la zona de transformación. No se ha identificado un receptor de membrana definido para la entrada del virus, aunque el complejo integrina $\alpha 6$ - $\beta 4$ se ha propuesto como candidato. Además se ha visto que la entrada depende de la presencia de los proteoglicanos de sulfato de heparina presentes en la membrana plasmática, que podrían ser el lugar de unión inicial previo a la unión con el receptor^{77, 78, 79}. La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina⁹⁰. El desensamble del virión puede ser a través del rompimiento de enlaces disulfuro internos de la cápside, dado el ambiente reductor de la célula, lo que permitiría el transporte del ADN viral al núcleo de esta⁹¹.

Mantenimiento del genoma

Después de la infección y desensamble en las células basales y para mantener su genoma episomal en bajo número de copias, 10 a 200 por célula, se expresan las proteínas E1 y E2⁹², que además facilitan la segregación correcta de los genomas durante la división celular. En VPH 31 se ha visto que si hay una falla para expresar E1, se pierde el estado episomal y el genoma viral se integra al de la célula⁹³. La infección inicial es seguida por una fase proliferativa que conduce al incremento del número de

células basales que contienen el genoma viral, lo que puede requerir la expresión de las proteínas E6 y E7 que estimulan el progreso de la fase de ciclo celular G1 a S.

Fase proliferativa

La expresión de E6 y E7 evita que la célula basal interrumpa el ciclo celular una vez que esta migra al estrato suprabasal del epitelio. Estas proteínas retardan la diferenciación celular y promueven la proliferación mediante interacciones con proteínas celulares responsables del control del ciclo celular ⁹⁴.

Amplificación del genoma y síntesis de los viriones

La amplificación del genoma y su empaquetamiento en la partícula proteica ocurren en las capas superiores del epitelio, donde aumenta la actividad transcripcional del promotor tardío dependiente de la diferenciación y que se halla en el marco de lectura del gen E7. Este promueve la transcripción de genes involucrados en la replicación del ADN viral, tales como E1, E2, E4 y E5, así como los de la cápside, L1 y L2. Para la replicación viral se necesita que E2 se una a la LCR y que promueva la unión de E1 en el sitio de origen de la replicación viral. El ensamble de las partículas virales ocurre en el estrato granuloso del epitelio y eventualmente las células infectadas se descaman de la capa superior de este. El virus es estable extracelularmente ya que es resistente a la desecación y puede ser transmitido directamente a otros individuos. Alternativamente las células infectadas permanecen en el ambiente antes de que el virus sea transmitido a una nueva superficie epitelial, como ocurre en virus que infectan superficies cutáneas. El VP no es lítico y se ha sugerido que la proteína E4 contribuye al egreso del virus de las capas superiores del epitelio mediante el rompimiento de los complejos de citoqueratina ⁹⁵ (figura 1.10).

1.3.5 Nomenclatura y clasificación de los virus del papiloma

El gen L1 es el más conservado del genoma viral y se ha usado para identificar nuevos tipos virales, que son reconocidos solo si la secuencia nucleotídica del gen difiere por poco más del 10 % de aquella del tipo viral conocido más cercano. Diferencias de 2 a 10 % definen a un subtipo viral, mientras que la diferencia menor a 2 % define a una variante viral. Hasta la fecha se han descrito y secuenciado completamente 118 tipos virales y se ha identificado un número mayor mediante la amplificación de regiones subgenómicas.

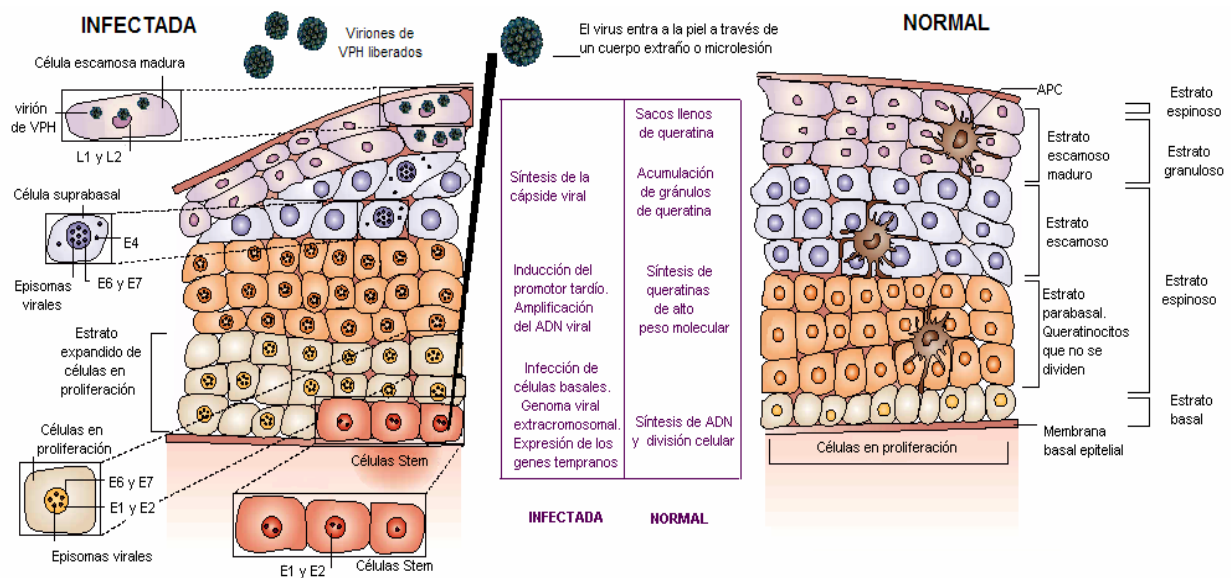


Figura 1.10 El ciclo viral en el epitelio estratificado. Arquitectura de la célula epitelial estratificada del cérvix y expresión de las proteínas virales después de la infección. Las células germinales normales se dividen a lo largo de la membrana basal y maduran verticalmente a través del epitelio sin división posterior (derecha). Después de que el VPH infecta estas células en la membrana basal (izquierda), se expresan las proteínas tempranas. Bajo la influencia de estas proteínas, las células que están en división se expanden verticalmente y la diferenciación celular es retrasada e incompleta. Las proteínas virales se expresan secuencialmente con la diferenciación y los viriones se producen en las capas superiores del epitelio. Las células presentadoras de antígenos intraepiteliales (APC) son abatidas en una célula infectada por VPH.

Fuente: Ian H. Frazer (2004). *Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. Nature Reviews Immunology. Vol 4. pg 46 – 54 (modificado).*

Los VP se clasifican en 3 niveles taxonómicos: Género, Especie y Tipo⁹⁶. Los géneros comparten menos del 60 % de identidad en la secuencia de L1; las especies de un género comparten una identidad de 60 a 70 % y los tipos virales dentro de una especie comparten de 71 a 89 % de identidad. Los VP conocidos que infectan tanto a humanos como a animales forman 16 géneros que se identifican por letras griegas. Cinco de estos géneros se componen de VPH's y VP's identificados en algunos primates, todos los otros géneros contienen tipos virales encontrados en varios mamíferos y aves.

El género clínicamente más importante es el referido como virus del papiloma-Alfa. Contiene a todos los tipos de VPH asociados a lesiones en mucosas o genitales. Los VP-Beta incluyen a los tipos de VPH asociados con epidermodisplasia verruciformis (EV), una enfermedad genética de neoplasia cutánea. En los portadores no genéticamente predispuestos a la enfermedad, los VP-Beta y VP-Gama establecen infecciones asintomáticas o lesiones cutáneas neoplásicas benignas. Algunos de los virus de estos dos géneros también se han asociado a cáncer de piel en individuos inmuno-suprimidos. La tabla 1.4 resume la relación entre la taxonomía y patología de algunos VP's.

Tabla 1.4. Los tipos virales de papiloma más estudiados y sus propiedades clínicas

<i>Familia: Papillomaviridae</i>				
Género	Especie	Tipo (s)	Propiedades	
Alfa	4	VPH -2, -27, -57	Verrugas comunes de la piel, frecuentemente en verrugas genitales en niños	
	5	VPH -26, -51, -69, -82	Lesiones benignas en mucosas, así como malignas de alto riesgo	
	6	VPH -53, -30, -56, -66	Lesiones benignas en mucosas, así como malignas de alto riesgo	
	7	VPH -18, -39, -45, -59, -68, -70	Lesiones malignas de alto riesgo en mucosas. VPH -18 más frecuente en adenocarcinomas que en carcinomas escamosos del cérvix	
	8	VPH -7, -40, 43	Lesiones cutáneas y mucosas de bajo riesgo	
	9	VPH -16, -31, -33, -35, -52, -58, -67	Lesiones malignas de alto riesgo en mucosas. VPH -16 mas frecuente en carcinoma de cérvix que en adenocarcinoma, y es el tipo viral más frecuente en las lesiones del cérvix	
	10	VPH -6, -11, -13, -44, -74	Lesiones benignas en mucosa. VPH -6 y -11 en verrugas genitales de hombres y mujeres, condiloma acuminata del cérvix, papilomas laríngeos. Algunas pueden progresar a la malignidad.	
	Beta	1	VPH -5, -8	Lesiones cutáneas benignas y malignas en pacientes EV e inmunosuprimidos.
			(por citar solo dos tipos de un género más amplio)	
	Gama	1	VPH -4, -65 (por citar solo dos)	Lesiones cutáneas benignas
Delta	4	Virus del papiloma bovino -1 (VPB -1) (por citar solo dos)	Papilomas fibrosos en el ganado vacuno, papilomas sarcoides en caballos	
Kappa	1	Virus del papiloma del conejo de cola de algodón (CRPV)	Lesiones cutáneas.	
		Virus del papiloma oral en conejo (ROPV)	Lesiones en la cavidad bucal	
Mu	1, 2	VPH -1, -63	Lesiones cutáneas como verrugas de los pies	
		VPH -41 (no relacionado con ningún otro tipo de VPH)	Lesiones cutáneas	
Un	1	VPB -3, -4	Papilomas en el canal alimentario en ganado vacuno.	
Xi	1			

1.4 Las variantes intratipo del virus del papiloma humano

Se especula que hace varios miles de años, cuando las especies humanas evolucionaron, los tipos de VPH ya existían con genomas muy parecidos a los de hoy en día. Las distancias genéticas entre los aislados virales evolucionaron en paralelo con los grupos étnicos humanos y con la dispersión de estos alrededor del mundo. En consecuencia, ciertas variantes virales predominaron en grupos étnicos humanos

definidos y aislados, como aquellos que colonizaron el continente americano hace unos 12 000 años. En México los inmigrantes europeos se mezclaron con los nativos y hoy la población contiene las variantes virales de cada grupo étnico. Todos los tipos virales tienen variantes genómicas y estas difieren entre sí por 1-5 % en su secuencia del ADN ¹⁰⁶⁻¹⁰⁹.

Además de los factores de riesgo para la progresión a CaCu ya mencionados, las variantes virales intratipo podrían ser otro factor de riesgo importante, pues diversos estudios sugieren que estas difieren biológicamente en su potencial oncogénico ⁹⁷⁻¹²⁵. De ahí se dice que los países en vías de desarrollo tienen incidencias más altas de cáncer cérvico uterino que los países desarrollados. Esta diferencia puede deberse a que estos últimos tienen acceso a mejores sistemas de salud pública. Sin embargo otra posibilidad es que las poblaciones están expuestas a cepas o variantes virales con diferentes propiedades patogénicas ¹⁰⁶.

Las variantes intratipo de VPH16 son las más estudiadas. Forman 5 ramas filogenéticas y por su distribución geográfica se clasifican como Europeas (E), Asiáticas (As), Asiático-Americanas (AA), Africana-1 (Af1) y Africana-2 (Af2)^{110, 111}. También se han identificado ramas filogenéticas menores como la norteamericana-1 (NA1) y AA-G183/AA-c. En el caso de VPH18, por el análisis de secuencia de su LCR, se han identificado tres ramas filogenéticas principales: Europea (E), Africana (Af) y Asiático-Amerindia (AsAi), siendo esta última la clona de referencia o prototipo de VPH18, que es de origen brasileño y que probablemente representa a las variantes de VPH18 de los indígenas americanos ¹⁰⁸.

Se ha sugerido que las variantes no europeas de VPH16 y 18 se asocian a un riesgo mayor de progresión ¹⁰³. Las variantes AA de VPH16 tienen una actividad transcripcional más elevada que aquella de otras ramas filogenéticas ¹⁰². Mientras las variantes no Europeas de VPH18 tienen actividad transcripcional más alta que aquella de las Europeas ¹¹². Estas diferencias en la actividad transcripcional del promotor temprano o en la actividad biológica de proteínas virales, como se menciona mas adelante, podrían repercutir a su vez, en diferencias de la actividad patogénica para cada variante viral.

1.4.1 Significancia funcional de la variación intratípica

Dado que la LCR contiene sitios de unión a E2 y sitios de unión a factores de transcripción, las diferencias en la secuencia nucleotídica de la LCR y de los genes E2, entre las variantes virales, podrían repercutir de distinta manera en funciones tales como la modulación de la expresión de genes virales y la replicación. La variación en la

secuencia de genes como E6 y E7 podría ser también de importancia funcional al modificar la estructura de estas proteínas y por ende su función.

1.4.2 Variantes de E6 y E7

Diversas publicaciones han determinado diferencias funcionales en regiones genómicas específicas y se ha especulado que estas podrían repercutir en el potencial oncogénico de las variantes virales. En el caso de E6, Conrad-Stöppler (1996) identificaron una variante E6 de VPH16 AA, clasificada como 512, que tuvo mayor capacidad que E6 prototipo (la variante Europea) para suprimir la diferenciación de los queratinocitos en respuesta al suero y calcio. Sin embargo otra variante Af-2-z84 tuvo aún menor capacidad para esta actividad, además de que degradaba P53 con menor eficiencia que la variante AA y que la E prototipo. Por tanto se pensó que la variante AA 512 podría ser de mayor potencial oncogénico, tanto por degradar mejor a P53, como por evitar la diferenciación de las células. Sin embargo, tal potencial podría ser menor para la variante Af 2 – z84 ^{97, 100}.

Otros estudios se han enfocado en las diferencias de persistencia viral y progresión de las lesiones hacia estados más avanzados que presentan las variantes virales. Por ejemplo, Londesborough P. y col (1996), así como Zehbe I. y col (1998), identificaron una variante de VPH16 asociada con persistencia viral y progresión de NIC 2 a NIC 3, que tenía un cambio en el nucleótido 350 del marco de lectura de E6, 350T-G, lo que resulta en un cambio del aminoácido leucina a valina (L83V). Este cambio estuvo presente en variantes tanto de la rama Europea como Asiática-Americana ¹¹⁴ y estuvo más asociado con carcinoma invasor que con NIC en una población de mujeres suecas ¹¹⁵. Sin embargo, se vio la misma distribución de variantes de E6 de VPH16 en un grupo de pacientes alemanas con NIC y cáncer invasor, lo que sugiere que la variación en la secuencia de E6 no es un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad en esa población ¹¹⁶. En otro estudio realizado por M. Grodzki y col, un grupo de pacientes francesas con la variante de E6-350G de VPH16 mostraron riesgo de progresión a lesiones de alto grado 4 veces mayor que aquellas con la variante prototipo, E6-350T ¹¹⁷.

Se han encontrado también diferencias en los mecanismos de splicing entre variantes virales. En un trabajo realizado por E. De la Cruz-Hernández y col. (2005), se observaron tales diferencias para el producto transcrito del gen E6 de variantes virales de VPH18 pertenecientes a las familias E, Af y AsAi. La variante Af presentó en mayor proporción el transcrito de E6 que corresponde a una proteína pequeña llamada E6*1, que mediante la formación de dímeros E6*1/E6 impide que E6 degrade eficientemente

a P53. El transcrito de E6 de tamaño completo se halló en mayor proporción para la variante AsAi. Esto indica que las variantes AsAi y Af podrían diferir en su potencial oncogénico al poseer proteínas E6 con propiedades biológicas diferentes ¹¹⁸.

Por su parte, Fujinaga Y y col.(1994) halló una variante de E7 para VPH16, E7 N29S, que fue más capaz que la prototipo para asociarse con Ras para la transformación de fibroblastos de embriones de ratón¹²³. En otro estudio realizado con pacientes coreanas, la misma variante fue la más común en el 70 % de los carcinomas invasores cuando se comparaba la distribución de variantes de E7 en tejido sano, tejidos con NIC 3 y carcinomas invasores. Este estudio sugirió que la variación de E7 podría ser otro factor de riesgo para la progresión de las neoplasias cervicales en la población coreana¹²⁴.

1.4.3 Variantes de la LCR

Diversos estudios han correlacionado variaciones en la secuencia de la LCR con diferencias en la actividad transcripcional del promotor temprano que podrían repercutir en el potencial oncogénico de las variantes virales. A continuación se citan solo algunos:

Dong XP y col. (1994) identificaron variantes E de VPH16 que tenían mutaciones puntuales o deleciones en el sitio de unión a YY1 y que mostraban mayor actividad transcripcional que la E prototipo ⁸⁸. El mismo grupo también identificó un sitio de unión para Sp1 que sobrelapa un sitio YY1 en las posiciones 7840-7848. Una mutación puntual en este sitio YY1 incrementaba la unión de Sp1 y la actividad transcripcional 4.7 veces. Por otro lado una mutación que impedía la unión de Sp1 mostraba solo un incremento en la actividad transcripcional de 1 a 1.6 veces. De aquí se concluye que la competencia entre YY1 y Sp1 por la unión al ADN es importante para la represión mediada por YY1 ⁸⁸.

En otras publicaciones se ha sugerido una capacidad oncogénica mayor para aquellas variantes de VPH16 no E. Por ejemplo, Veress G y col. (1999), mediante la evaluación de genes reporteros, observó una actividad transcripcional muy similar entre las variantes E de la LCR de VPH16 y solo un aislado de la AA mostró un incremento en la actividad transcripcional de 1.7 veces, comparado con la clona de referencia. De ahí que se ha sugerido que las variantes AA podrían tener una actividad oncogénica mayor que las variantes E ¹²⁸. Lo mismo ocurrió en otro estudio similar, llevado a cabo por Kämmer C y col. (2000), donde se probó que las variantes AA de VPH16 para la LCR

mostraban una mayor actividad transcripcional que la E prototipo y que las Africanas. Estas dos últimas variantes mostraban actividades transcripcionales muy similares¹⁰².

En VPH18, Rose B y col. (1998) observó dos mutaciones en los nucleótidos 40 (G-T) y 41 (G-A) del sitio Sp1 próximo al promotor. Sp1 se unía con mayor afinidad a los sitios mutantes que al prototipo y la actividad transcripcional era también mayor¹²⁶. Más recientemente, Slichero y col. (2005) demostró que las variantes no E tenían una mayor actividad transcripcional que las E en una población de mujeres atendidas en el instituto Ludwig-McGill en São Paulo, Brasil¹¹².

1.4.4 Variantes de E2

Por su importancia en la regulación de la transcripción y de la replicación viral, se piensa que los cambios en la secuencia nucleotídica de E2 podrían afectar la estructura de la proteína y por ende sus funciones: Un estudio con VPH16 no mostró diferencias significativas en el potencial de activación de la transcripción por parte de las variantes de E2. La actividad del promotor incrementó por solo 1.5 veces con las variantes de E2, en contraste con la prototipo, que entonces no se consideró un incremento significativo¹²⁸.

Otros estudios han correlacionado las variantes de E2 con el grado de progresión de las lesiones cervicales; Hecht y col. (1995) describió una variante de E2 de VPH18 asociada preferentemente a lesiones precursoras, por lo que se sugirió que esta podría ser de un potencial oncogénico menor¹²⁵. En contraste, Ferry G y col. (1997) no halló correlación entre las variantes de VPH16 y 18 con el grado de la lesión, pero las variantes de E2 de VPH16 frecuentemente co-segregaban con la variante L83V, por lo que se sugirió que esta co-segregación actuaba como un factor de riesgo adicional para el desarrollo de cáncer cervical¹²⁹. Aunado a esto, en una población de Inglaterra se detectó una variante en el dominio de unión al ADN en E2 de VPH16 (3684 C-A, T310K) que segregaba con NIC 3, pero que no segregaba con la variante L83V¹⁰¹. Se sugirió que la variante T310K puede ser importante en la progresión de NIC1 a NIC3, pero que se requieren factores adicionales. Sin embargo, Graham y col. (2000) han sugerido que no hay correlación entre las variaciones de secuencia de E2 y la invasión, sino que esta se halla influida más bien por la pérdida del gen cuando el virus se integra al genoma celular¹³⁰.

1.5 Justificación

Las variantes de VPH18 que se analizaron en este estudio fueron previamente caracterizadas por Lizano M y col. (1997). Se observó que diferían en el tipo histológico de las lesiones cervicales en las que se encontraron. La variante Af se halló solo en carcinomas escamosos, mientras que las variantes AsAi y E se hallaron en tipos histológicos de pronóstico clínico menos favorable, tales como carcinoma adenoescamoso y adenocarcinomas ¹¹⁹. Nos preguntamos entonces si la asociación entre variantes virales y tipos histológicos de cáncer podría deberse a diferencias funcionales entre ellas. Por lo que se consideró importante evaluar sus actividades transcripcionales en líneas celulares de cáncer cérvicouterino con orígenes histológicos diferentes, mediante la construcción de vectores reporteros que contuvieran las LCR's de cada variante, de modo que las diferencias observadas en dicha actividad pudieran explicar la asociación entre variante viral y tipo histológico de cáncer.

También se estudiaron las posibles diferencias en la actividad regulatoria que las variantes de E2 pudieran tener sobre las LCR's homólogas, al cotransectar vectores de expresión de E2 con los vectores reporteros de las LCR's. La justificación de esta última estrategia es que la secuencia nucleotídica de nuestra E2 variante Africana tiene cierta similitud con aquella reportada por Hecht y col. (1995), donde identificaron una variante viral que podría tener un bajo potencial oncogénico por hallarse solo en lesiones precursoras de CaCu ¹²⁵.

Más allá del interés filogenético y del conocimiento de la distribución geográfica de las variantes intratipo, el gran objetivo de este y otros estudios de variantes del VPH, es establecer una base de datos sobre la diversidad y patogenicidad de distintas especies, tipos y variantes de VPH, que ayude al diseño y optimización de protocolos de tratamiento y vacunación. Las investigaciones que se lleven a cabo para tener un conocimiento más profundo sobre las diferencias funcionales y patogénicas entre las variantes virales, son trascendentes para lograr ese gran objetivo. Por ello es que el trabajo que se presenta a continuación se une a ese esfuerzo mediante el análisis de las diferencias en la actividad transcripcional entre variantes de VPH18 de las familias Europea (E), Africana (Af) y Asiático-Amerindia (AsAi). La información generada, tanto en este trabajo, como en aquellos realizados por nuestro grupo de trabajo en el mismo campo de investigación, nos ayudará a entender el pronóstico de aquellas lesiones premalignas infectadas con distintas variantes virales de VPH18.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a las evidencias mencionadas anteriormente, que conciernen a las diferencias funcionales que se han observado en las variantes de distintos tipos virales de VPH, nuestra hipótesis es que los cambios en la Región Larga de Control, LCR, así como en el gen E2 de las variantes virales E, Af y AsAi de VPH18, repercuten en diferencias de su actividad transcripcional.

Para probar esta hipótesis, se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

Determinar si existen diferencias en la actividad transcripcional entre las distintas variantes virales del VPH tipo 18, que pudieran ser debidas a los cambios nucleotídicos presentes en la LCR.

De manera adicional, determinar si los cambios en la secuencia del gen E2 entre las variantes afectan de manera diferencial la actividad transcripcional de las LCR's de variantes homólogas.

Para cumplir con este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

Objetivos específicos:

- ④ Construcción de vectores reporteros que contengan la LCR de cada variante viral de VPH18, clonada hacia el 5' de la secuencia codificante del gen reportero luciferasa.
- ④ Transfección de líneas celulares, de diferentes tipos histológicos de cáncer cérvicouterino, con las construcciones mencionadas anteriormente para analizar la actividad transcripcional de las diferentes LCR's por medio de la expresión y cuantificación de luciferasa.
- ④ Cotransfección de las mismas líneas celulares, tanto con los vectores de expresión para las variantes de E2, como con el vector reportero que contiene la LCR de la variante homóloga. Este experimento permitirá conocer si los cambios nucleotídicos del gen E2 pudieran afectar la función regulatoria de la proteína sobre la actividad transcripcional de cada variante viral.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ADN de biopsias de cáncer cérvicouterino

El ADN genómico fue extraído de biopsias de tumores de cérvix previamente caracterizados. Este ADN genómico contiene el ADN viral de las variantes de VPH18, Europea (E), Africana (Af) y Asiático - Amerindia (AsAi).

3.2 Bacterias

La cepa bacteriana utilizada para clonar los vectores construidos fue la DH5 α Rec A-, esta cepa bacteriana de *Escherichia coli* es deficiente en su sistema de recombinación. La cepa fue transformada con estas construcciones por medio del método de CaCl₂.

3.3 Líneas celulares

La actividad transcripcional de las LCRs de las variantes de VPH18, clonadas en el vector reportero pGL2-basic, fue analizada en las líneas celulares derivadas de tumores de cérvix, que contienen secuencias integradas de VPH: HeLa, SiHa, CaLo y en la línea celular C33, que no contiene secuencias de VPH. Las líneas celulares fueron transfectadas con los vectores por medio de lipofección.

HeLa

Línea celular derivada de una muestra de cáncer proveniente de una mujer de 30 años de edad, de raza negra y diagnosticada con adenocarcinoma de cérvix. La mujer se llamaba Henrietta Lacks, vivía en New Pittsburg Avenue, en Baltimore. Falleció 6 meses después del diagnóstico, luego de que la radioterapia no funcionó. La línea celular fue aislada por primera vez en 1951 por George Gey. HeLa tiene secuencias de VPH18 integradas a su genoma ¹³¹

CaLo

Línea celular derivada de pacientes mexicanas diagnosticadas con cáncer cérvicouterino epidermoide, grado II, no metastático, compuesto de células grandes no queratinizadas, y que fueron atendidas en la clínica 8 del Seguro Social y en el Instituto Nacional de Cancerología, México ¹³². Esta línea celular demostró ser positiva a VPH18

y depende de factores de crecimiento y de la densidad celular para sobrevivencia y proliferación.

④ SiHa

Línea celular derivada de una muestra de cáncer cervicouterino epidermoide o escamoso grado II, aislada de una mujer asiática de 55 años de edad. La línea celular demostró contener 1 o 2 copias del genoma de VPH16 integradas al genoma celular

133

④ C-33 A

Línea celular derivada de carcinoma de cérvix, proveniente de una mujer caucásica de 66 años de edad. La línea celular está libre de secuencias víricas de VPH¹³⁴.

3.4 Plásmidos

- ④ Las LCRs de VPH18 fueron clonadas en el vector reportero pGL2-Basic (Promega Corp., Madison, WI) que contiene al gen lucifereasa de la luciérnaga americana *Photinus pyralis*, F - Luc (Figura 3.1).
- ④ Las distintas variantes del gen E2 de VPH18 fueron clonadas en el vector de expresión pCG E2 y donadas por el Doctor Alejandro García Carrancá (División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, México D.F.) (Figura 3.3).
- ④ El plásmido pRL-CMV (Promega Corp., Madison, WI) es un vector de expresión para el gen de luciferasa, R-Luc, del celenterado *Renilla reniformis*, bajo el control del promotor de citomegalovirus. Este vector fue utilizado como control interno de la transfección para comprobar la eficiencia de esta y normalizar la actividad de luciferasa del vector experimental, esto es, de aquel que porta la LCR de las variantes virales.
- ④ Se usó un vector de expresión para el gen de la proteína verde fluorescente, GFP, para comprobar la eficiencia de transfección de manera cualitativa.
- ④ El vector pCDNA sirve para completar las cantidades de ADN que estamos fijando para cada experimento, de tal suerte que sean 2 µg de ADN total que se

introduzca a la célula. Dicho plásmido no contiene secuencia génica alguna que pueda repercutir en los resultados.

- El plásmido pSEK 455, donado por el doctor Alejandro García Carrancá, contiene el promotor intensificador de SV40, que consiste de una secuencia de 72 pb que se repite dos veces, además de 4 sitios de unión para la proteína viral E2, todas estas regiones están posicionadas hacia el 5' de la secuencia que codifica para el gen reportero CAT (cloramfenicol acetil transferasa). Posteriormente se cambió este gen reportero por luciferasa, como se verá mas adelante, para facilitar la medición de actividad del reportero. Una vez construido, el vector se usó para verificar la unión de las proteínas E2 variantes a los sitios respectivos.

3.5 Construcción de vectores

3.5.1 Amplificación de la LCR por medio de PCR

Se amplificó la LCR a partir del ADN aislado de biopsias de cáncer cérvicouterino, previamente sometidas a tipificación e identificación de las variantes Europea, Africana y Asiatico-Amerindia de VPH18, (Tablas 3.1 y 3.2). Los oligonucleótidos usados contienen sitios de restricción adjuntos hacia el 5', correspondientes a las enzimas de restricción *Sma I* y *Hind III*, de modo que una vez amplificada una región de 781 pb desde la posición 7201 a 124, pudiera ligarse al plásmido pGL2-Basic (Promega), el cual contiene el gen reportero luciferasa. Este gen reportero fue aislado por primera vez de la luciérnaga norteamericana *Photinus pyralis* y cataliza la producción de luz en organismos biolumincentes (Figura 3.1).

El producto de PCR, para los tres aislados virales, fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio. Posterior a ello se purificaron dichos productos mediante el *High Pure PCR Product kit* (Roche).

Oligonucleótido sentido: S – LCR 18-7201

5' - TCC CCC GGG TGT ATG ATT GCA TTG TAT GG - 3'
Sma I

Oligonucleótido antisentido: H – LCR 18-124

5' - CCC AAG CTT GGA TCC TCA AAG CGC GCC AT - 3'
Hind III

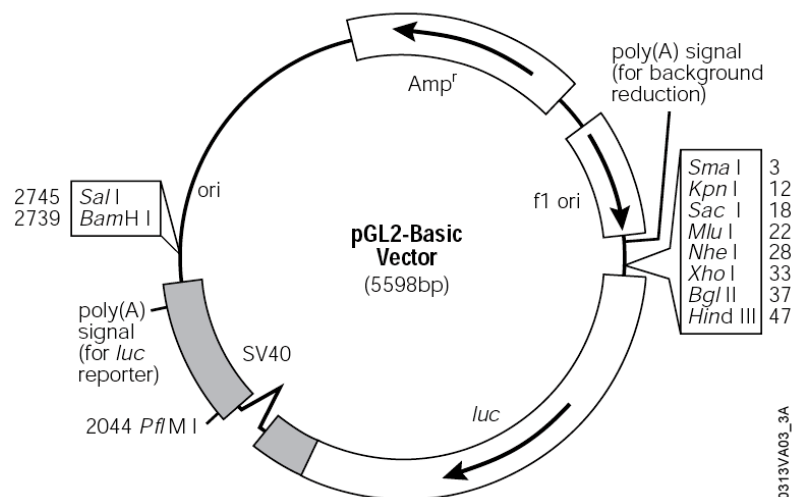


Figura 3.1 Plásmido pGL2-Basic (Promega), que contiene al gen reportero luciferasa. En este vector se ligó la LCR de cada variante viral hacia el 5' del gen reportero.

Tabla 3.1 Reacción de amplificación por PCR de las distintas LCR's

Reactivo	Volúmen
Buffer 10 x	5 µl
Mezcla de dNTPs (2 mM c/u)	5 µl (200 µM)
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl (1 mM)
Oligonucleótido S-LCR18-7201 (2 µM)	5 µl (0.2 µM)
Oligonucleótido H-LCR18-124 (2 µM)	5 µl (0.2 µM)
Enzima Taq Gold polimerasa (5 U/ µl)	0.3 µl
H ₂ O	c.b.p.
ADN biopsia positiva a VPH18-variante	200 ng
Total	50 µl

Tabla 3.2 Condiciones de ciclado y temperatura para la amplificación de las LCR's

Temperatura (° C)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
95	5:00	1
95	1:00	
60	1:00	38
72	0:50	
72	5:00	1
4	∞	

3.5.2 Construcción de los vectores reporteros

Para ligar el inserto LCR, producto del PCR de los tres aislados virales, en el vector reportero pGL2-Basic, se cortaron los productos de PCR en los sitios de restricción *Sma I* y *Hind III*, que se encontraban en los extremos 5' y 3' respectivamente de las LCR's y que fueron incluidos gracias a los oligonucleótidos. La primera digestión se hizo con *Hind III* (Invitrogen) a 37° C por 1 hora. Se purificó el producto de digestión mediante el *High Pure PCR Product kit*, se eluyó con 50 µl de agua bidestilada y se sometió el producto a la segunda digestión con *Sma I* (Invitrogen) a 30° C por 1 hora. Nuevamente se purificó el producto con el kit ya mencionado, de manera que pudiera usarse para la reacción de ligación. De la misma manera se procedió a digerir el plásmido al que habrían de ligarse los productos. Véanse tablas 3.3 y 3.4. Ya purificados los productos de la digestión se procedió a ligar el vector con el inserto mediante la enzima *Ligasa T4* (Invitrogen) (Tabla 3.5 y Figura 3.2), usando 400 ng de ADN total, 300 ng de inserto y 100 ng de plásmido. Una vez establecida la reacción, se dejó esta a 16° C por 16 hrs en un termociclador.

Tabla 3.3 Digestión del plásmido y de la LCR de cada variante viral con *Hind III*

Reactivo	Plásmido pGL2 – Basic	LCR's productos de PCR
H ₂ O	32 µl	9 µl
Buffer R2	5 µl	5 µl
ADN	8 µg	3 µg
<i>Hind III</i>	3 µl	3 µl
Total	50 µl	50 µl

Tabla 3.4 Restricción con *Sma I* de los productos digeridos con *Hind III* y purificados por *High Pure PCR Product Kit*

Reactivo	Volúmen (µl)
H ₂ O	1
Buffer R4	6
ADN plásmido / Inserto LCR	50
<i>Sma I</i>	3
Total	60

Tabla 3.5 Reacción de ligación entre las distintas LCR y el vector pGL2 - Basic

Ligación	ADN Inserto (300 ng)	ADN plásmido (100 ng)	Buffer 5x de la enzima	Enzima ligasa T4 (3.5 U)	H ₂ O	Volúmen final	Tiempo / Temperatura
pLCR-Luc	7.2 µl	1.3 µl	6 µl	3.5 µl	12 µl	30 µl	16 h / 16°C
Control (-)	0 µl	1.3 µl	6 µl	3.5 µl	19.2 µl	30 µl	16 h / 16°C

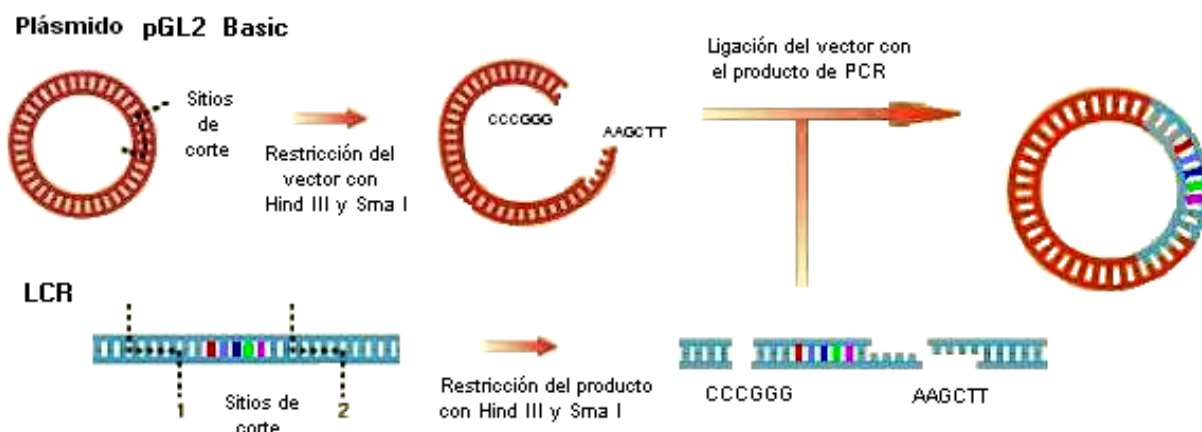


Figura 3.2 Construcción de vectores reporteros mediante ligación entre las LCR's, productos de PCR, de las distintas variantes virales y el vector pGL 2 – Basic.

3.5.3 Vectores pCG E2

La construcción de estos vectores de expresión ha sido ya previamente descrita¹³⁵. Un fragmento de ADN viral que contenía todo el gen de E2 de VPH18, nucleótidos 2817 a 3971, fue clonado en el vector pCG hacia el 3' del promotor de citomegalovirus, CMV (Figura 3.3). Posteriormente el Doctor Alejandro García Carrancá reemplazó este inserto por aquel de las variantes virales de VPH18, Europea, Asiático Amerindia (Referencia o Prototipo) y Africana.

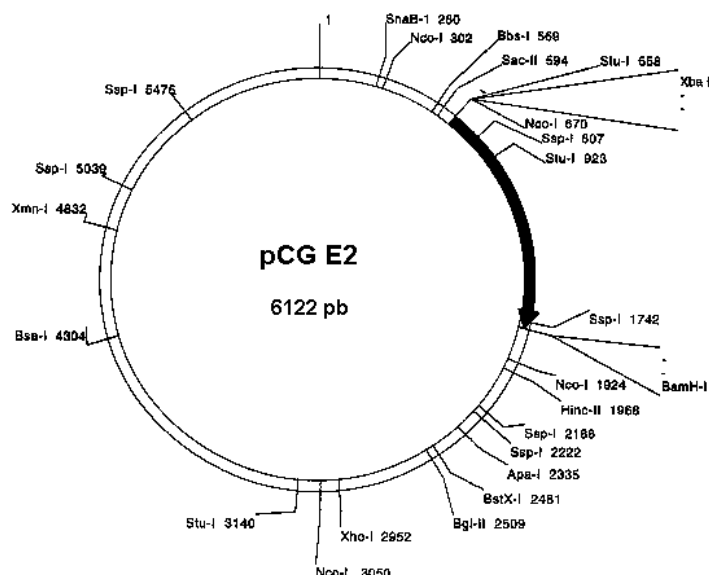


Figura 3.3 Vector de expresión de E2, pCG E2

Se hizo digestión con las enzimas *Xba I* y *Bam HI* para comprobar que tenían el gen E2, de tamaño cercano a 1112 pb. La primera reacción con *Xba I* se muestra en la tabla 3.6, incubándose a 37° C por 1 hora. Se purificó luego el producto de esta digestión mediante el *High Pure PCR Product kit*, se eluyó con 50 µl de agua bidestilada y se sometió el producto a la segunda digestión con *Bam HI* (Invitrogen) a 37° C por 1 hora (Tabla 3.7).

Tabla 3.6 Digestión de pCG E2 con *Xba I* para cada variante viral

Reactivo	Volúmen (µl)
H ₂ O	17
Buffer R2	5
ADN plásmido pCG E2	2 µg
<i>Xba I</i>	3
Total	50

Tabla 3.7 Restricción con *Bam HI* del producto digerido con *Xba I* y purificado con el High Pure PCR Product Kit

Reactivo	Volúmen (µl)
H ₂ O	1
Buffer R3	6
ADN purificado de primera digestión	50
<i>Bam HI</i>	3
Total	60

3.5.4 Construcción del vector reportero pSEK 455

Este vector originalmente contenía el gen reportero CAT. Para cambiar este por luciferasa, se cortó con las enzimas de restricción *Hind III* y *Kpn I* y se liberó una región que comprende el enhancer doble repetido de 72 pb y los sitios de unión a E2 (Figura 3.4). La digestión procedió primero con *Hind III* (Invitrogen) a 37° C por una hora. Se purificó el producto de esta digestión con *High Pure PCR Product kit*, se eluyó con 50 µl de agua bidestilada y se procedió a la segunda digestión con *Kpn I* (New England Biolabs) a 37° C por 1 hora. El inserto resultante se recuperó del gel de agarosa con *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN). Igualmente se cortó el plásmido pGL2-Basic con las mismas enzimas de restricción (Tablas 3.8 y 3.9).

Tabla 3.8 Digestión de plásmidos pSEK - 455 y pGL2 - Basic con Hind III

Reactivo	Plásmido pSEK 455 – CAT	Plásmido pGL2 – Basic
H ₂ O	7 µl	2 µl
Buffer R2	8 µl	1 µl
ADN	2 µg	4 µg
<i>Hind III</i>	5 µl	2 µl
Total	80 µl	10 µl

Tabla 3.9 Segunda digestión con *Kpn I* de plásmidos pSEK – 455 linealizados con *Hind III* y purificados con *High Pure PCR Product Kit*

Reactivo	Volúmen (µl)
H ₂ O	7.3
Buffer	7
Plásmidos pSEK-455 y pGL2-Basic linealizados	50
<i>Kpn I</i>	5
BSA 10 mg/ml	0.7
Total	70

Ya purificados los productos de la digestión, se ligó el vector pGL2-Basic linealizado al inserto correspondiente a la región regulatoria de pSEK-455, mediante la enzima *Ligasa T4* (Invitrogen) (Tabla 3.10). La construcción resultante se denominó pSEK – Luc.

Tabla 3.10 Reacción de ligación para la construcción de pSEK - Luc

Ligación	ADN Inserto (300 ng)	ADN plásmido (100 ng)	Buffer 5x de la enzima	Enzima ligasa T4 (3.5 U)	H ₂ O	Volúmen final	Tiempo / Temperatura
pSEK-Luc	30 µl	2 µl	4 µl	3.5 µl	0.5 µl	40 µl	16 h / 16°C
Control (-)	0 µl	2 µl	4 µl	3.5 µl	30.5 µl	40 µl	16 h / 16°C

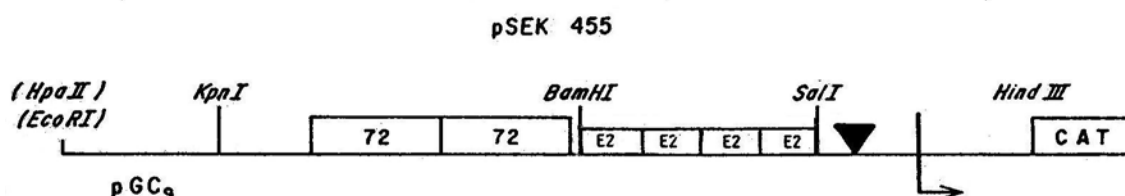


Figura 3.4. pSEK - 455 – CAT en donde se muestra el enhancer de repetido doble de 72 pb y los 4 sitios de unión para E2

3.6 Transformación de células competentes con los productos de ligación

Para la transformación de células bacterianas con todos los vectores anteriores, se procedió primero a hacerlas competentes. Para ello se usó el método de cloruro de calcio que se describe a continuación:

3.6.1 Preparación de células químicamente competentes por el método de cloruro de calcio

De la cepa congelada de DH5α se tomó una pequeña muestra con un asa bacteriológica y se incubó en 5 ml de medio LB a 37° C, 200 rpm, por una noche. Luego se tomó 500 µl de este preinóculo y se diluyó 1:10 (500 µl del cultivo + 50 ml de medio LB). Se dejó incubar a 37° C, 200 rpm, hasta que las bacterias alcanzaran una absorbancia OD₆₀₀ de 0.4 (aproximadamente 2.45 hrs). Luego se incubó el cultivo en hielo por 15 minutos. Se recuperaron las bacterias por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos a 4° C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron suavemente en 25 ml de una solución fría de CaCl₂ 100 mM/ Tris 10 mM, pH 7.5 (50 ml por cada 100 ml de cultivo). Posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos a 4° C. se descartó el sobrenadante y nuevamente se resuspendió la pastilla en 3.3 ml de la solución CaCl₂ / Tris. De esta forma las bacterias están competentes para transformarse.

3.6.2 Transformación

Se agregaron 100 ng del plásmido ligado a 200 µl de las bacterias competentes DH5α. Se incubó la mezcla en hielo por 30 minutos y luego se sometió a choque térmico de 42° C por 2 minutos. Se incubaron las células en hielo por 5 minutos para luego agregar 800 µl de medio LB. Se incubaron las bacterias transformantes a 37° C, 300 rpm por una hora, se centrifugaron y resuspendieron con parte del sobrenadante. Se tomó una alícuota para luego sembrarla en cajas de Petri con medio LB – agar suplementado con 80 µg / ml de ampicilina. Las cajas se incubaron a 37° C por toda la noche.

3.6.3 Selección, amplificación y purificación del ADN de plásmido

De las cajas de Petri se seleccionaron y cosecharon 2 colonias al azar, para cada variante viral, y se inocularon en 2 ml de medio LB suplementado con ampicilina (80 µg / ml). Las bacterias se incubaron a 37° C por toda la noche en agitación constante. Se colectaron por centrifugación y se purificó el plásmido a partir de ellas por una minipreparación rápida, utilizando el *QIAprep Spin Miniprep kit* (QIAGEN), el plásmido se eluyó de las columnas con 100 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8.5. Se verificó la presencia del inserto mediante digestión con las enzimas *Sma I* y *Hind III*, además de PCR (Tablas 3.11 a 3.14). A estos plásmidos se les denominó pLCR-Luc-AsAi para el aislado viral prototipo, pLCR-Luc-E para la variante Europea y pLCR-Luc-Af para la variante Africana.

Tabla 3.11 Amplificación de LCR de cada variante para comprobar presencia de inserto en las construcciones

Reactivo		Volúmen	
Buffer 10 x		2 µl	
Mezcla de dNTPs	(10 mM)	0.4 µl	(200 µM)
MgCl ₂	(50 mM)	0.4 µl	(1 mM)
Oligonucleótido S-LCR 18 -7201	(2 µM)	1 µl	(0.1 µM)
Oligonucleótido H-LCR 18 - 124	(2 µM)	1 µl	(0.1 µM)
Enzima Taq Gold polimerasa	(5 U/ µl)	0.1 µl	(0.5 U)
H ₂ O		c.b.p.	
ADN de plásmido para cada variante viral		1 ng	
Total		20 µl	

Tabla 3.12 Condiciones de ciclado y temperatura para amplificación de las LCR's a partir de plásmidos purificados

Temperatura (° C)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
95	5:00	1

95	0:30	
66	0:30	15
72	0:30	
72	5:00	1
4	∞	

Tabla 3.13 Linealización con *Hind III* de plásmidos pLCR - Luc purificados, para comprobar presencia de inserto

Reactivo	Volúmen (μl)
H ₂ O	c.b.p
Buffer R2	2
ADN plásmido pLCR – Luc (para cada variante)	1 μg
<i>Hind III</i>	2
Total	20

Tabla 3.14 Digestión con segunda enzima *Sma I* para liberar inserto de vectores pLCR-Luc

Reactivo	Volúmen (μl)
H ₂ O	1
Buffer R4	6
ADN plásmido cortado con <i>Hind III</i>	50
<i>Sma I</i>	3
Total	60

3.6.4 Secuenciación del ADN de plásmido

Para confirmar la identidad de los insertos ligados al plásmido se realizó una secuenciación automatizada en el secuenciador ABI PRISM 3100 (PE Biosystems). Se usó el *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. La reacción se muestra en la tabla 3.15 y las condiciones de ciclado en la tabla 3.16. A continuación de terminada la amplificación se procede a purificar los productos para meterlos posteriormente al secuenciador. La purificación es como sigue:

Tabla 3.15 Reacción de secuenciación automatizada para comprobar identidad de las LCR's ligadas al vector reportero

Reactivo	Volúmen (μl)
Buffer 5 x	0.75
Oligo H-LCR18-124 (10 pmol / μl)	1

H ₂ O miliQ	c.b.p
Big dye	0.5
ADN de plásmido	100 ng
Total	10

Tabla 3.16 Condiciones de ciclado y temperatura para la reacción de secuenciación

Temperatura (° C)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
96	5:00	1
96	0:10	
55	0:10	25
60	4:00	
60	7:00	1
4	∞	

A los 10 µl de la reacción anterior se agrega 30 µl de H₂O miliQ y 60 µl de isopropanol. Se incuba a temperatura ambiente por 15 minutos en obscuridad y se centrifuga por 30 minutos a 14 000 rpm a temperatura ambiente. Suavemente se elimina el sobrenadante con pipeta. Se lava la pastilla con 250 µl de etanol al 70 % y vortexeando. Se centrifuga a 14 000 rpm por 10 minutos y se elimina el sobrenadante. La pastilla se seca en Speed Vac por 5 a 10 minutos y se resuspende en 20 µl de formamida, para luego desnaturalizarse a 96° C por 5 minutos. Se colocan las muestras en hielo y luego a la placa de lectura, cuidando de que no se formen burbujas. Al final esta placa se coloca en el secuenciador.

Comprobada la identidad de los vectores, se purificaron en mayor escala mediante una maxipreparación de plásmido usando el *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN), con 500 ml de inóculo para las bacterias transformantes positivas a cada una de las variantes virales. La figura 3.5 resume de manera gráfica los procesos descritos anteriormente.

El siguiente paso es la introducción de estas construcciones en líneas celulares por medio de la transfección, con el fin de evaluar la actividad del gen reportero luciferasa y con ello la actividad transcripcional del promotor de las distintas variantes.

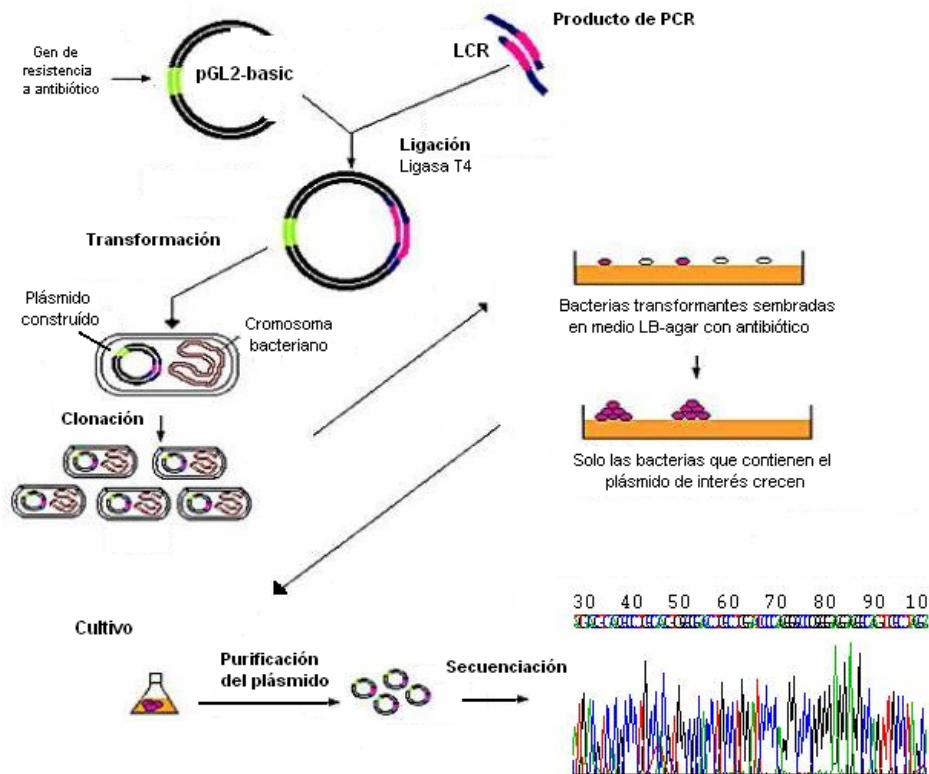


Figura 3.5 Construcción, clonación y secuenciación del vector con las distintas LCR's de las variantes

La introducción de un vector que contiene un gen reportero, cuya transcripción está regulada por una secuencia promotora que se desea estudiar, permite medir tasas de expresión génica en diferentes situaciones experimentales. Dado que la actividad de un promotor depende de factores proteicos de transcripción y de factores epigenéticos, típicos de la célula, dicho promotor exógeno debe introducirse a esta para medir su actividad transcripcional mediante la cuantificación del producto proteico del gen reportero. El valor numérico es proporcional a la actividad transcripcional del promotor. Los genes reporteros comúnmente usados son el Cloramfenicol acetil transferasa (CAT), Luciferasa (LUC), β – galactosidasa (β – gal o lac Z), Proteína verde fluorescente (GFP), entre otros.

3.7 La Transfección

Las técnicas por las que se introducen ácidos nucleicos exógenos a las células eucariontes se clasifican en: transfección por métodos físicos, bioquímicos y transducción por virus. Los métodos físicos comprenden la biobalística; microinyección directa y electroporación. En los métodos bioquímicos, el ADN es acomplejado con un agente químico, como puede ser fosfato de calcio, dietilaminoetil (DEAE) – dextrano y liposomas.

Con la mezcla de un lípido policatiónico y uno neutral se forma una vesícula membranosa unilaminar o liposoma, de carga positiva neta debida a los grupos aminos positivos del grupo hidrofílico de la molécula. La lipofección se basa en la formación de un complejo catiónico entre estos liposomas y ADN. Este se adhiere y fusiona con la membrana celular, entrando luego el ADN al citosol. El lípido neutral más usado en lipofección es el dioleilfosfatidil-etanolamina, DOPE. Este método es el más elegido en las transfecciones de rutina, por ser un método fácil, reproducible y eficiente.

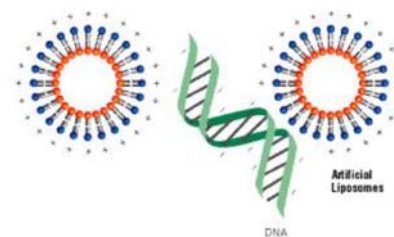


Figura 3.6
ADN acomplejado con liposomas catiónico

3.8 La transfección en líneas celulares de cáncer cervicouterino

La técnica de transfección usada en este proyecto fue la lipofección, usando el sistema lipofectAMINE-PLUS reagent (Invitrogen). En la figura 3.7 se ilustra de manera general el procedimiento y a continuación se describe con detalle:

1. Un día previo a la transfección se sembraron $1 - 2 \times 10^5$ células en cajas de cultivo de 6 pozos, en 2 ml de medio DMEM (GIBCO, USA) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (HyClone). Se incubaron por 18 horas a 37°C y 5 % de CO_2 . Las líneas celulares usadas fueron aquellas de cáncer cervicouterino: HeLa, SiHa, C-33 y CaLo.
2. Se agregaron 2 μg de una mezcla de ADN plasmídico (tabla 3.17) en 100 μl de DMEM sin suero, al que previamente se agregó 4 μl de reactivo PLUS (Invitrogen). En un tubo aparte se mezcló 4 μl de LipofectAMINE (Invitrogen) con 100 μl de DMEM sin suero.
3. Se mezclaron suavemente la solución de ADN con la lipofectamina diluida y se dejaron incubar a temperatura ambiente por no más de 30 minutos.
4. En tanto, se reemplaza el medio en las células por 800 μl de DMEM con 0.3 % de SBF.
5. Pasado el tiempo se agrega a cada pozo la mezcla del paso 3, poco más de 200 μl .
6. Se deja incubar a 37°C y 5 % de CO_2 por 5 horas.

7. Después se reemplaza el medio de transfección por 2 ml de DMEM con 10 % de SBF.
8. Se realiza el ensayo de luciferasa pasadas 48 horas después de la transfección.

Tabla 3.17 Mezcla de reactivos para la transfección

Mezcla de transfección	
1	μg de pGL2 – basic / pLCR – AA / pLCR – E / pLCR – Af / pSEK – 455 - Luc
100	ng de pRL
80	ng de pCG E2 – AA / pCG E2 – E / pCG E2 – Af
c.b.p.	ng de pCDNA
100	μl de medio DMEM sin suero
4	μl de reactivo PLUS
4	μl de lipofectAMINE

Los experimentos de transfección en cada línea celular se hacen por triplicado. Los experimentos B a D de la figura 3.8 prueban la actividad basal del promotor de una variante viral específica. En el experimento A se descarta alguna actividad residual que posea el vector pGL2-basic, el cual no contiene secuencias promotoras o de enhancer.

Para analizar el efecto represor de E2 sobre la actividad basal, se cotransfecta el vector reportero que contiene la LCR de una variante particular con el vector de expresión para E2, pCG E2, de la misma variante. Como se ve en los experimentos E a G de la figura 3.8.

La cantidad de ADN a transfectar debe ser la misma para cada experimento, de manera que los resultados, una vez cuantificados, sean comparables entre las variantes. Para mantener una cantidad constante de 2 μg de ADN total, se agrega otro plásmido que no tenga secuencias promotoras o de enhancer que pudieran intervenir en la expresión de luciferasa. Los plásmidos que generalmente se usan para este propósito son pBR322 o pCDNA. En los presentes experimentos se utilizó el plásmido pCDNA.

Para el control de eficiencia de transfección se usó un plásmido que expresa la luciferasa de *Renilla reniformis*, pRL, que normaliza los valores de luciferasa del gen problema. Se cuenta también con un control de funcionamiento y eficacia de la transfección, transfectando un plásmido de expresión para la proteína verde fluorescente (GFP).

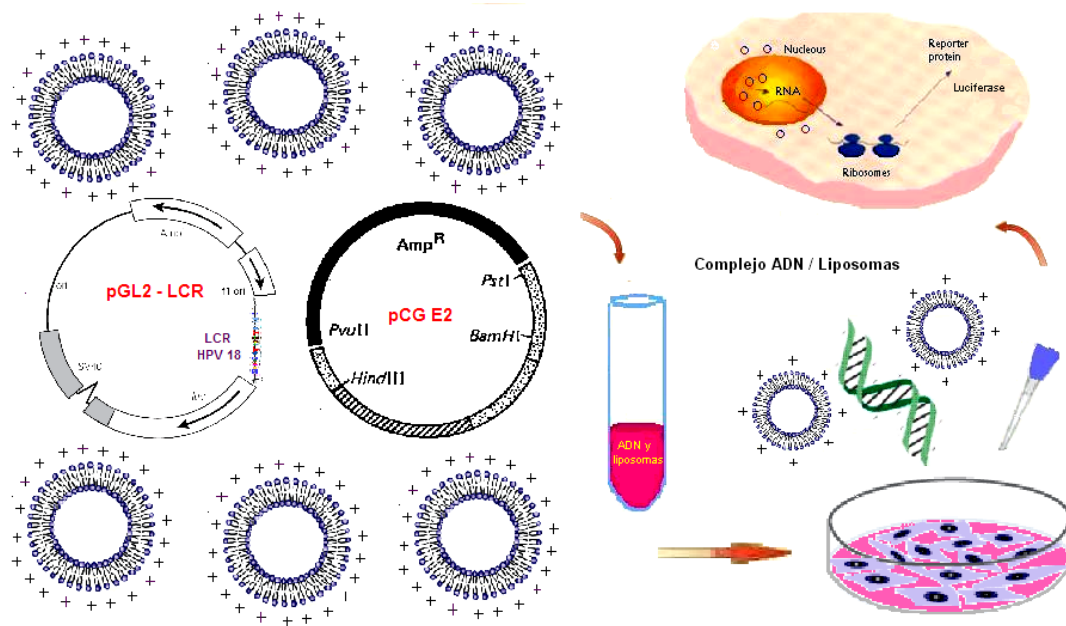


Figura 3.7 Proceso de transfección por medio de lipofección

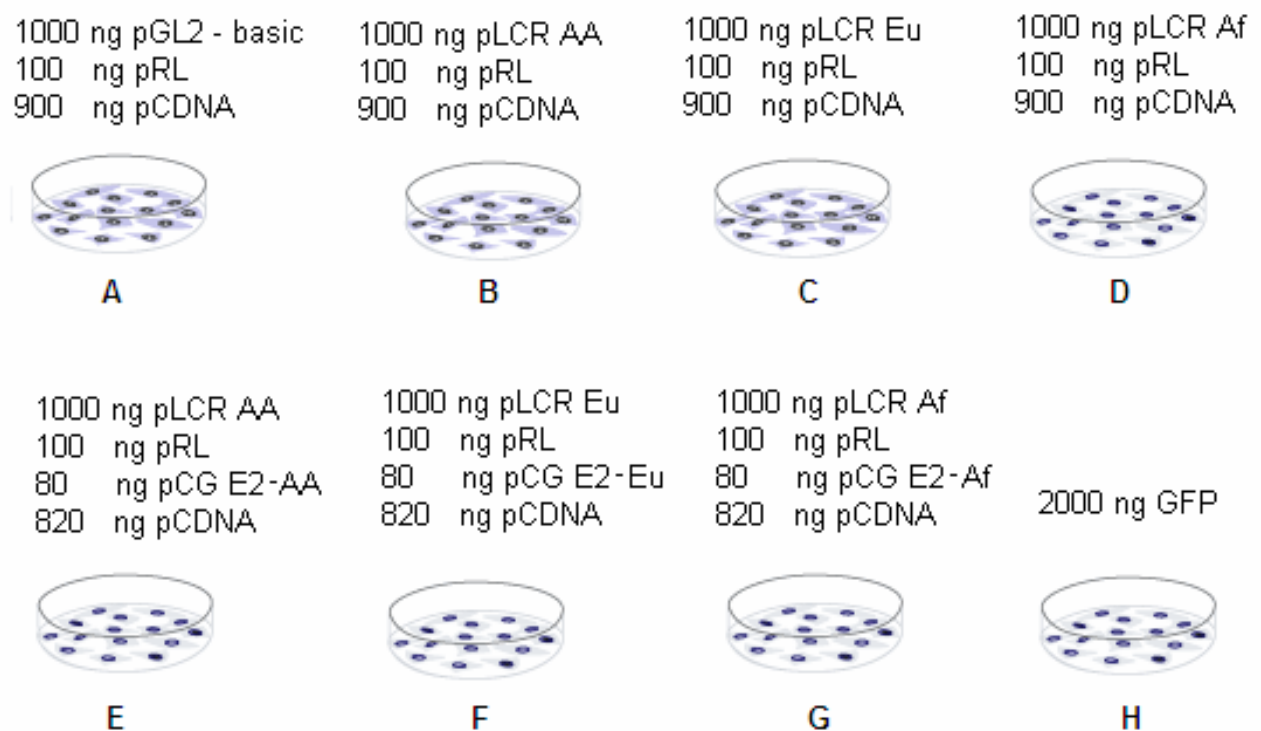


Figura 3.8 Mezcla de transfección para cada pozo. Los ensayos se hacen por triplicado.

3.9 Ensayo de luciferasa

El gen luciferasa codifica para una enzima que cataliza la producción de luz en varios organismos bioluminocentes, como la luciérnaga americana *Photinus pyralis*. La enzima de este organismo, F-Luc, requiere ATP, como fuente de energía, oxígeno y su sustrato luciferina (figura 3.9). La primera reacción es la formación de un complejo adenilato de luciferilo unido a la enzima. En la segunda reacción hay una descarboxilación oxidativa, que produce CO₂, oxiluciferina, AMP y luz. Si el sustrato es agregado en exceso a la luciferasa, la cantidad de luz generada es proporcional a la cantidad de enzima. Por esta razón la reacción es muy útil para medir la actividad transcripcional de un promotor in vitro, pues de esta depende la cantidad de enzima producida en una célula que porta dicho promotor. Los ensayos con luciferasa no son costosos y son muy sensibles.

La luciferasa del celenterado *Renilla reniformis*, R-luc, de la clase de los Antozoos, es una proteína de 36 kDa, que al catalizar la degradación de luciferina de celenterado, llamada celenteracina, para producir celenteramida por medio de O₂, también produce luz. (Figura 3.9). En consecuencia, las propiedades de R-Luc, como también de F-Luc, hacen de estas enzimas herramientas útiles para funcionar como proteínas reporteras.

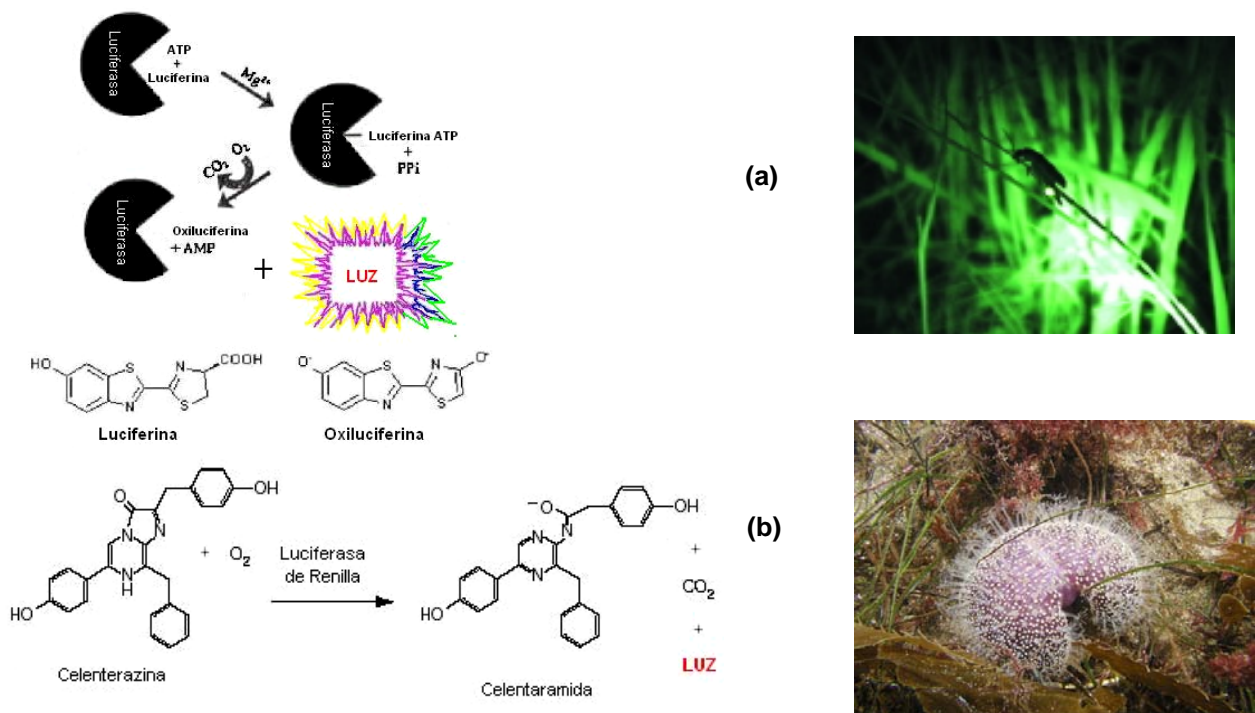


Figura 3.9 Reacción de bioluminiscencia para (a) luciferasa de luciérnaga, F – Luc y (b) luciferasa de Renilla, R-Luc.

El término “sistema reportero dual” se refiere a la expresión y medición simultánea de dos enzimas reporteras individuales en un solo y mismo sistema. Mientras una funciona como reportera experimental, la otra funciona como reportera de control interno. Al normalizar la actividad de la reportera experimental con la del control, se reduce la variabilidad experimental debida a diferencias en la viabilidad celular, la

eficiencia de transfección, los volúmenes tomados por pipeta, o en la eficiencia de lisis celular o del ensayo en general.

En el sistema Dual-Luciferase[®] Reporter (DLR[™]) (PROMEGA), usado en el presente trabajo, se mide primero la actividad de F-luc, mezclando el reactivo LAR II (Luciferase Assay Reagent II) que contiene el sustrato luciferina, con el extracto celular que contiene luciferasa. La intensidad de la señal luminiscente es medida cuantitativamente por un luminómetro. La reacción es luego suprimida en el mismo tubo por el reactivo Stop & Glo[®], que contiene el sustrato celenteracina. Esta actúa con la enzima R-Luc para producir otra señal luminiscente que también es medida en el luminómetro. Debido a los distintos orígenes evolutivos de ambas enzimas, las diferencias tanto en estructuras moleculares, como en requerimientos por el sustrato, posibilitan la discriminación selectiva entre sus reacciones bioluminiscentes. Por tanto este sistema mide la luminiscencia de la reacción de F-Luc (reportero experimental) y luego de suprimirse esta, se mide la luminiscencia de la reacción de R-Luc (reportero control) para así, normalizar la actividad de la primera. El protocolo para medir la actividad de ambas enzimas se describe de manera general en la figura 3.10 y de manera detallada a continuación:

1. Pasado las 48 horas postransfección, se lisan las células para recuperar ambas enzimas: F-Luc, cuya expresión es regulada por la LCR de las variantes de VPH18, así como R-Luc, cuya expresión es regulada por el promotor T7 y el enhancer de citomegalovirus, CMV, los cuales hacen que la expresión de R-Luc sea constitutiva en todos los experimentos. Para la lisis se retira el medio de cultivo de los pozos en los que se hallan las células transfectadas. Se lavan estas con buffer de fosfatos, PBS para eliminar células no adheridas y restos de medio de cultivo, se retira el PBS y se agregan 500 µl de buffer de lisis, PLB[™], a cada pozo.
2. La lisis procede por 15 minutos a temperatura ambiente, colocándo las cajas de cultivo sobre un agitador rotatorio.
3. Se transfiere el lisado celular de cada pozo a viales de 1.5 ml. Las enzimas que nos interesan son estables en este buffer por 16 horas si se conservan en hielo, o bien un mes a – 20° C si la medición de actividad de luciferasa no se hace de inmediato.
4. En un tubo de 1.5 ml se agregan 50 µl de reactivo LAR II y luego 10 µl del lisado celular, el cual contiene F-Luc y R-Luc. Se mezclan ambos productos.
5. Se introduce el tubo en un luminómetro, programado con 10 segundos para cada lectura. Se cuantifica la señal luminosa provocada por la interacción entre F-Luc del

extracto celular y luciferina del reactivo LAR II. Se registra el valor de unidades de luz.

6. Se retira el tubo del luminómetro y se agregan 50 μl del reactivo Stop & Glo[®]. Se mezcla por vortex y se coloca de nuevo el tubo en el luminómetro para leer la segunda intensidad luminosa provocada por la interacción, esta vez entre R-Luc y el sustrato celenteracina, que se halla en el buffer Stop & Glo[®]. Se registra este segundo valor.
7. Se retira el tubo del luminómetro y se mide otro ensayo, repitiendo los pasos 5 a 7.
8. Al final se tienen registrados todos los valores arrojados por el luminómetro para cada ensayo y se procede a tabularlos. Los valores correspondientes a la actividad de F-Luc se normalizan con los valores correspondientes a la actividad de R-Luc.

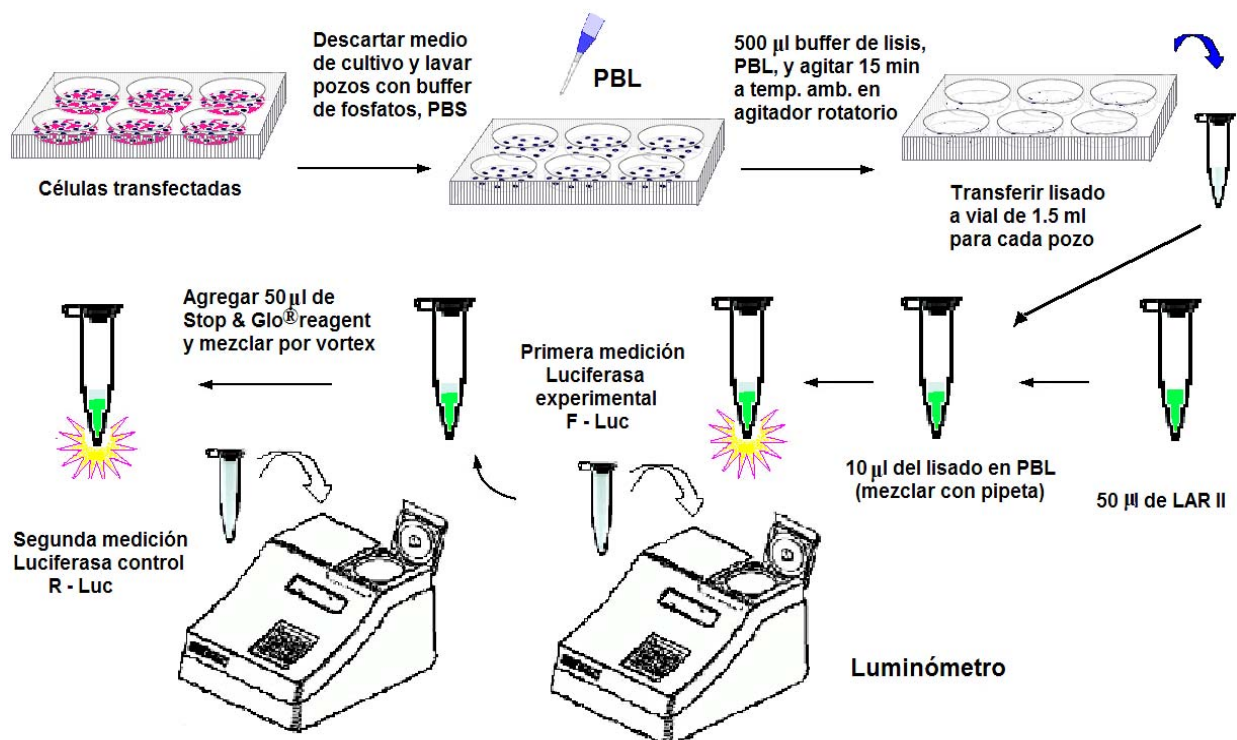


Figura 3.10 Ensayo para medir luciferasa F-Luc y R-Luc a partir del lisado celular

4. RESULTADOS

4.1 Construcción de vectores reporteros que contiene las diferentes LCR's de las variantes virales de VPH18

La variación en la secuencia de nucleótidos de la LCR de las variantes de VPH18, se presenta en la tabla 4.1 y en la figura 4.1.

Tabla 4.1 Cambios en la secuencia nucleotídica de la LCR de variantes de VPH18

Nucleótido	Referencia	Africana	Europea
7130	G	A	-
7152	A	G	-
7156	A	G	-
7161	C	T	-
7164	C	G	-
7185	C	T	-
7245	G	Del	-
7246	T	Del	-
7247	A	Del	-
7248	T	Del	-
7249	G	Del	-
7250	T	Del	-
7251	T	Del	-
7258	T	A	A
7323	A	G	-
7486	C	-	T
7496	C	G	-
7512	G	A	-
7529	C	-	A
7530	T	C	-
7563	G	A	A
7567	A	C	C
7592	T	C	C
7643	T	G	-
7651	T	C	-
7658	A	C	-
7670	A	T	T
7704	T	C	-
7726	C	T	-
7730	C	A	-
7777	A	-	G
41	A	-	-
92	A	G	-
104	T	-	C

Como podemos ver, muchos de los cambios están muy cercanos o bien se ubican dentro de secuencias de reconocimiento de factores de transcripción celulares. Por ejemplo, las variantes E y Af comparten el cambio G/A en el nt 7563, el cual hace parte de los sitios TEF-1 y YY1, el primero involucrado en la especificidad por el tejido y el segundo en la represión o activación del promotor. También comparten el cambio A/C en el nt 7567, que hace parte de un sitio NF1, involucrado en la especificidad por el tejido y en la remodelación de la cromatina. También comparten el cambio A/T en el nt 7670 que corresponde al sitio KRF-1, del cual se ha descrito su importancia para la actividad transcripcional dependiente del tejido solo en VPH18¹³⁶. La variante Af tiene aún mas cambios en este sitio, incluyendo en el sitio Oct, el cual sobrelapa con el de KRF-1. Se sabe que el factor Oct-1 puede competir con KRF-1 por su unión al enhancer¹³⁶. La variante Af en general presenta más cambios que los otros aislados virales, incluyendo deleciones hacia el 5' de la LCR, desde el nt 7245 hasta el 7251. Además, especialmente en la variante Africana, vemos que la mayoría de los cambios se ubican en la región enhancer, por lo que esto debe tener importantes repercusiones en la actividad transcripcional.

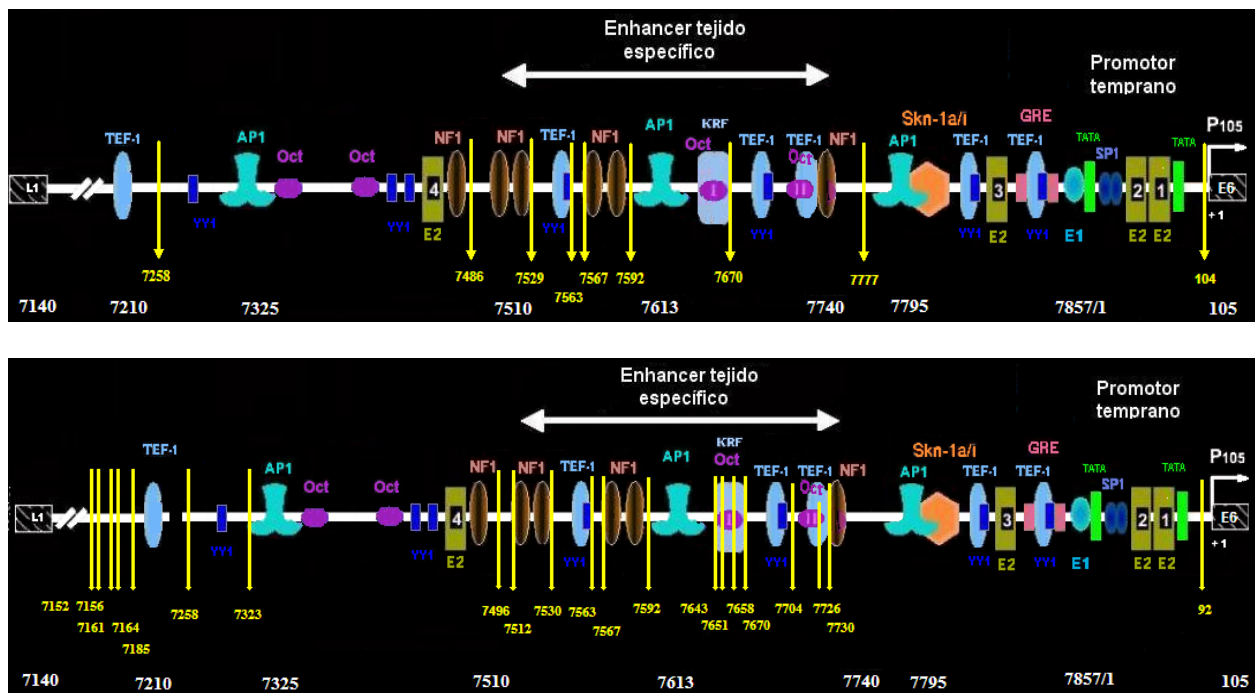


Figura 4.1. Cambios nucleotídicos en la LCR de variantes E (arriba) y Af (abajo) de VPH18. Muchos de los cambios ocurren cerca o dentro de sitios de unión a factores de transcripción. En la variante Af gran parte de los cambios ocurren en la zona de enhancer.

Nos preguntamos si los cambios en estas variantes podrían influir en la actividad transcripcional del promotor, quizás por afectar la unión de los factores a sus sitios, o bien al participar en la topología de la molécula. Para evaluar tal efecto, las distintas LCRs fueron amplificadas por PCR a partir de biopsias tumorales de cérvix previamente caracterizadas ¹¹⁹. Los productos de PCR puede verse en la figura A1 del apéndice A; en dicha figura, los 2 primeros carriles son controles positivos que corresponden a las LCR's amplificadas de líneas celulares positivas a VPH18: HeLa y CaLo. Los carriles 3, 4, 5 y 6 representan las LCR's amplificadas a partir de las biosias y que serán el inserto a ligar en el vector reportero. El carril 7 es un control negativo donde no hay ADN templado y el carril 8 contiene el marcador de peso molecular de 100 pb; en nuestro caso esperábamos un producto de 781 pb. En cada carril se colocó 5 µl del producto obtenido de la reacción PCR.

Para ligar estas LCR's al vector reportero pGL2-Basic, se cortaron, tanto vector como inserto, con enzimas de restricción, tal como se indica en la tablas 3.3 y 3.4. Los productos digeridos se muestran en la figura A2. En los tres primeros carriles de dicha figura se hallan el vector reportero, sin cortar y linealizado, cortado en ambos sitios de restricción. En los carriles 4 al 7 se hallan las LCR's cortadas con ambas enzimas de restricción. En el carril 8 está el marcador de peso molecular de 1 kb.

Posteriormente, la ligación se procedió como se indica en la tabla 3.5 y figura 3.2 en la sección de Materiales y Métodos. Estas construcciones se introdujeron en la cepa competente DH5α y se seleccionaron algunas transformantes para purificación y análisis de plásmido. Primero Se verificó la presencia del inserto mediante digestión con las enzimas *Sma I* y *Hind III*, además de PCR, como se indica en las tablas 3.11 a 3.14 de la sección de materiales y métodos. Los plásmidos purificados se muestran en la figura A3, la digestión de estos se muestra en la figura A4. La amplificación de la LCR a partir de los mismos plásmidos se muestra en la figura A5.

Comprobada la presencia del inserto, se procedió a la secuenciación automatizada de estos vectores con el objeto de comprobar la identidad de las variantes virales. El procedimiento de secuenciación se ilustra en las tablas 3.15 y 3.16, así como en la figura 3.5. En el apéndice B se muestra solo como ejemplo, el electroferograma de la variante AsAi, que tomamos como la Referencia. La secuencia que se muestra en la parte superior de cada figura es la antisentido pues se usó el oligonucleótido que hibrida en el extremo 3' de la LCR.

4.2 Transfección de células de cáncer cérvicouterino

Después de la construcción y secuenciación, el siguiente paso es la transfección en líneas celulares para estudiar la actividad transcripcional de las variantes virales. Se usan líneas de cáncer cervicouterino dado que la actividad transcripcional de VPH es tejido específica, de modo que una línea celular epitelial de cérvix es el modelo idóneo para esta tarea.

Para evaluar la actividad de luciferasa se requiere que las células se hayan transfectado eficientemente. Nosotros transfectamos tanto los vectores problema, como vectores control para evaluar la eficiencia de transfección, como es el caso del vector reportero que expresa la proteína verde fluorescente, GFP, tal y como se indica en la sección 3.8 de Materiales y Métodos. En la figura 4.2 se muestra la transfección del plásmido de GFP, donde vemos que la eficiencia de transfección fue alrededor del 70 a 80 %. Con esta eficiencia podemos ahora medir la actividad de los vectores reporteros problema.

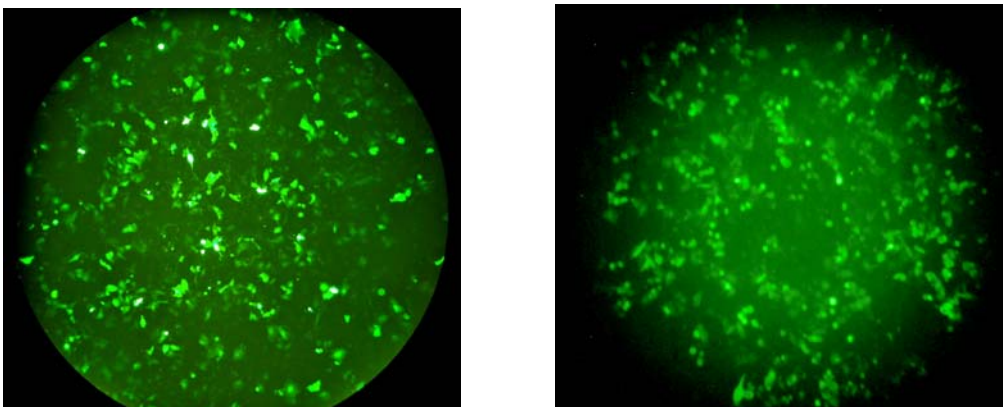


Figura 4.2. Expresión de GFP en las líneas de CaCu como control de eficiencia de transfección

El procedimiento de transfección y el ensayo de luciferasa para cuantificar la actividad de esta en luminómetro se describen con detalle en la sección de Materiales y Métodos. Veanse las figuras 3.7, 3.8 y 3.10 de las secciones 3.8 y 3.9 en Materiales y Métodos.

Los datos de actividad enzimática de luciferasa se tabulan y grafican para cada experimento; en la tabla 4.2 se ejemplifica la organización de los datos. Se tiene una columna con los valores de luciferasa problema, aquella que está regulada por la LCR, y otra con los valores de luciferasa control, en este caso de *Renilla*. El cociente de ambas actividades provoca un ajuste de los valores de luciferasa problema con respecto a los de luciferasa control, eliminando el factor de variabilidad. Recuérdese que estos últimos resultan de la transfección de cantidades siempre iguales del

plásmido pRL-CMV, por lo que teóricamente los valores que resulten de la cuantificación deben ser muy similares. La divergencia que sin embargo exista en ellos, se debe a la variabilidad de la técnica que afecta la eficiencia de transfección y que afecta de manera proporcional a los valores de luciferasa problema. Dado el cociente entre ambas actividades, la actividad transcripcional se expresa en actividad relativa de luciferasa problema con respecto a luciferasa control. Se obtiene luego un promedio de los cocientes para cada categoría, es decir de la variante viral en cuestión y su respectiva desviación estándar. La actividad transcripcional de la variante AsAi, la referencia, se ajusta a valor de 1 dividiéndose entre sí misma, como actividad básica. El ajuste se hace luego para los demás valores de actividad y de desviación estándar, dividiendo estos entre el valor de actividad transcripcional de la AsAi (tabla 4.2).

Tabla 4.2. Ejemplo de ajuste de datos obtenidos de la transfección de HeLa con los vectores reporteros. Se procedió igual para cada línea celular y para ensayos con E2.

Reacción	Luc	RL	Luc / RL	Promedio	Desv.Est.	Promedio / 8.23E-04	Desv.Est / 8.23E-04
1a pGL2	0.057	1775					
1b	0.021	700.3					
2a	1.28	2143	0.00059729				
2b	1.228	1984	0.00061895				
2c LCR - Ref	1.599	2505	0.00063832	0.0008237	0.00041879	1	0.508425137
2d	1.71	2363	0.00072366				
2e	1.352	1957	0.00069085				
2f	1.23	735.1	0.00167324				
3a	1.492	2469	0.00060429				
3b	1.202	2092	0.00057457				
3c LCR - E	2.544	2222	0.00114491	0.0010042	0.00043916	1.219111237	0.53315934
3d	1.779	1683	0.00105704				
3e	0.864	526.8	0.00164009				
4a	0.232	2898	8.0055E-05				
4b	0.235	2220	0.00010586				
4c	0.19	1909	9.9529E-05	0.0001472	7.6804E-05	0.17869718	0.093242101
4d LCR - Af	0.345	1304	0.00026457				
4e	0.209	935.2	0.00022348				
4f	0.295	2690	0.00010967				

Los promedios y desviación estándar de cada grupo se representaron luego por una gráfica de barras. Con la prueba de Fisher LSD se compararon la actividad transcripcional entre grupos pareados de variantes virales y se consideraron valores de $P < 0.05$ como diferencias estadísticamente significativas. Los análisis se hicieron con el software *SigmaStat*, versión 2.03. En seguida se muestran estos análisis para cada línea celular.

4.2.1 Análisis de la actividad transcripcional basal en cada línea celular

Al transfectar los vectores reporteros de las variantes de LCR en la línea celular HeLa, observamos que la LCR de la variante Af tuvo una actividad transcripcional basal aproximadamente 5 veces menor que aquella de las otras variantes. La diferencia resultó ser estadísticamente significativa ($P < 0.05$) (Figura 4.3). Mientras que entre las variantes E y AsAi (Ref) no hay diferencia significativa entre la actividad transcripcional de sus LCR's.

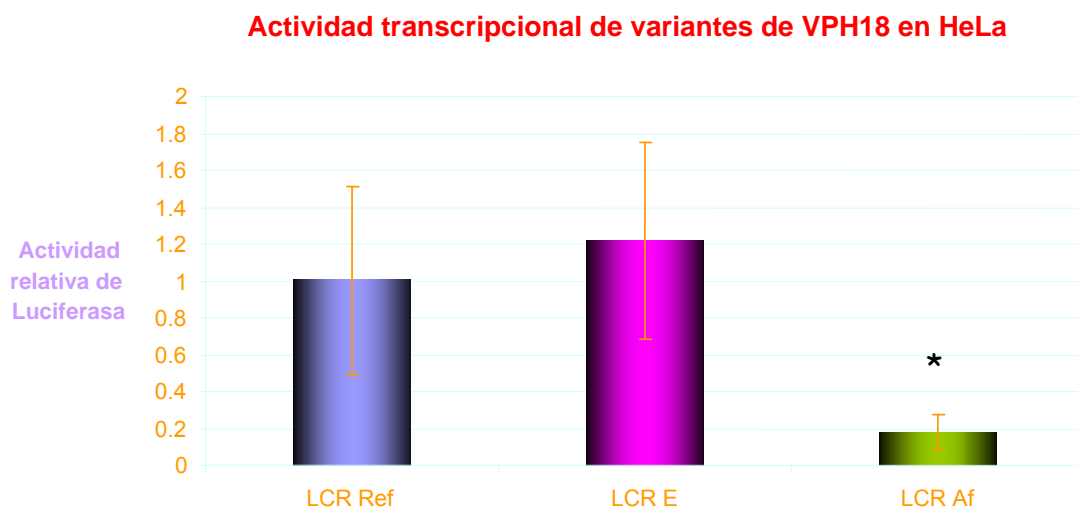


Figura 4.3. Transfección de HeLa con los distintos vectores pLCR-Luc para comparar la actividad transcripcional basal entre las variantes virales. La actividad transcripcional de las variantes AsAi y E son similares en magnitud, mientras que aquella de la variante Af es significativamente 5 veces menor que las variantes AsAi y E ($P < 0.05$ con la prueba de Fisher LSD de comparaciones múltiples). La actividad de la variante AsAi se ajustó al valor de 1.

En la línea celular CaLo, también positiva a VPH18 como HeLa, pero de origen escamoso, se observan patrones de actividad transcripcional muy similares que aquellos en HeLa. Nuevamente no hay diferencia estadística entre las variantes E y AsAi, mientras que hay disminución importante de la actividad, de casi 5 veces en la variante Af ($P < 0.05$) (Figura 4.4).

Actividad transcripcional de variantes de VPH 18 en CaLo

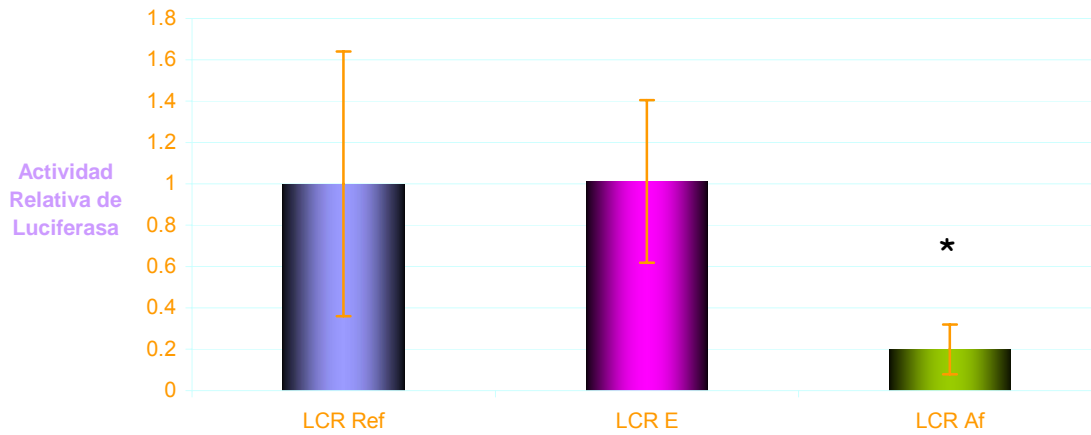


Figura 4.4. Transfección de CaLo con los distintos vectores pLCR-Luc para comparar la actividad transcripcional basal entre las variantes virales. La actividad transcripcional de las variantes AsAi y E son similares en magnitud, mientras que aquella de la variante Af es, de nueva cuenta, significativamente 5 veces menor que las variantes AsAi y E ($P < 0.05$ con la prueba de Fisher LSD de comparaciones múltiples). La actividad de la variante AsAi se ajustó al valor de 1.

Cuando se transfectó la línea celular SiHa, el patrón de actividades basales difiere de aquel en las líneas celulares anteriores. La actividad transcripcional de la variante AsAi es significante mayor que aquella de la variante E por 1.6 veces. La actividad de la variante Af es 7 veces menor que aquella de la AsAi, pero solo 4 veces menor que aquella de la variante E. SiHa es una línea de CaCU de origen escamoso al igual que CaLo, pero esta contiene secuencias virales de VPH16 (Figura 4.5).

Actividad transcripcional de variantes de VPH 18 en SiHa

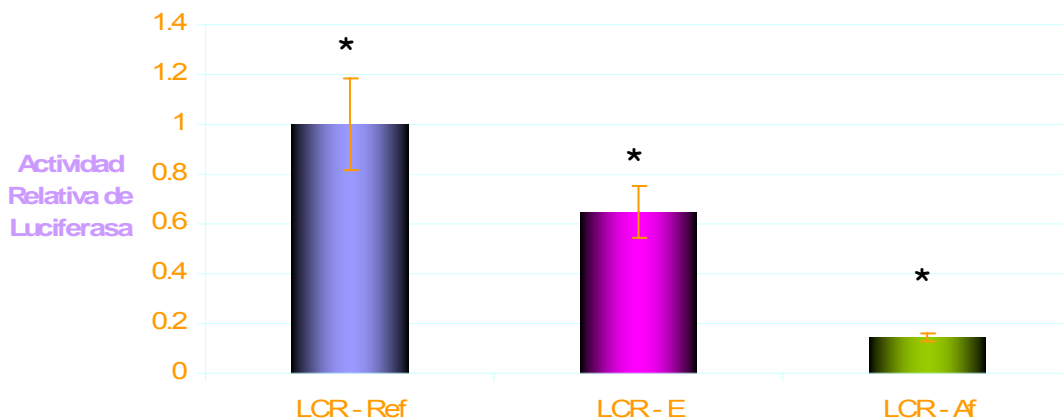


Figura 4.5. Transfección de SiHa con los distintos vectores pLCR-Luc para comparar la actividad transcripcional basal entre las variantes virales. La actividad transcripcional de la variante AsAi es significativamente mayor que aquella de la variante E, por 1.6 veces ($P < 0.05$ con la prueba de Fisher LSD de comparaciones múltiples); mientras que la actividad transcripcional de la variante Af es la menor de todas. SiHa contiene secuencias virales de VPH16 integradas al genoma celular. La actividad de la variante AsAi se ajustó al valor de 1.

Por otro lado en C-33 A, línea de CaCU que no contiene secuencia viral alguna, la actividad transcripcional de la variante AsAi es significativamente 2 veces mayor que aquella en la variante E. La actividad de la variante Af es 5 veces menor que la AsAi y 2.5 veces menor que aquella de la E (Figura 4.6).

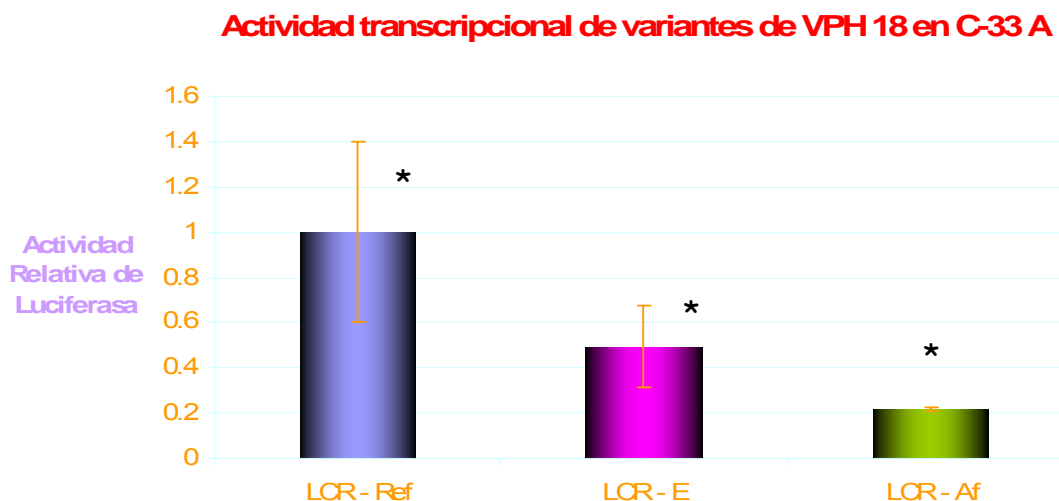


Figura 4.6. Transfección de C-33 A con los distintos vectores pLCR-Luc para comparar la actividad transcripcional basal entre las variantes virales. La actividad transcripcional de la variante AsAi es significativamente mayor que aquella de la variante E, por 2 veces ($P < 0.05$ con la prueba de Fisher LSD de comparaciones múltiples); mientras que la actividad transcripcional de la variante Af es nuevamente la menor de todas. C-33 A no contiene secuencias virales de VPH. La actividad de la variante AsAi se ajustó al valor de 1.

4.2.2 Comparación de la actividad transcripcional basal entre líneas celulares

Una vez que determinamos las diferencias de actividad transcripcional entre las variantes virales en cada línea celular, a continuación comparamos las actividades transcripcionales de las mismas entre los distintos tipos histológicos de líneas celulares de CaCu con el objetivo de hallar posibles diferencias que pudieran correlacionar con la asociación reportada por Lizano y col (1997)¹¹⁹ entre las variantes virales y los tipos histológicos de cáncer cérvicouterino. Como vemos en la figura 4.7, la actividad transcripcional de las variantes E, AsAi y Af tiende a ser mayor en la línea celular HeLa (adenocarcinoma de cérvix). Esto resulta muy evidente para la LCR E (barras amarillas), donde la actividad en HeLa es significativamente mayor (Fisher LSD, $P = 0.01$), cuando se compara con la actividad en SiHa y CaLo.

Actividad transcripcional de variantes de VPH 18 en líneas celulares de cáncer cérvicouterino

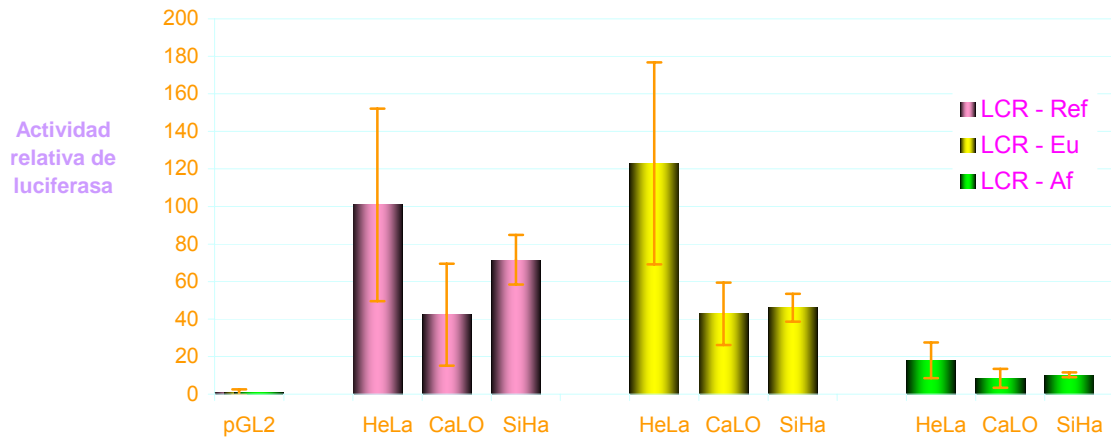


Figura 4.7 Comparación de la actividad transcripcional basal de cada variante viral en las distintas líneas celulares. La actividad transcripcional de cada variante tiende a ser mas alta en la línea celular HeLa, adenocarcinoma de cérvix con secuencias virales de VPH18 integradas al genoma celular, en contraste con las líneas CaLo y SiHa, que son de origen escamoso. La lectura de actividades obtenida del vector pGL2 Basic, que no contiene secuencias promotoras algunas, se ajustó al valor de 1.

4.2.3 Cotransfección del vector LCR – Luc con el de expresión para E2

Determinada la actividad transcripcional basal de las distintas LCR's, se estudió el efecto que las variantes de E2, produce sobre dicha actividad en sus LCR's homólogas. En la tabla 4.3 se presentan los cambios en la secuencia del gen para las variantes virales; también se predicen los cambios en la secuencia de aminoácidos. Anexa a la tabla se presenta la estructura de la proteína. El primer segmento de la tabla, que parte de las posiciones nucleotídicas 3155 a 3277, corresponde al dominio conservado amino terminal, cuyas funciones se relacionan con la activación de la transcripción, al formar dímeros con otras proteínas transactivadoras, así como con la replicación viral, al formar dímeros con la proteína viral E1. El segundo segmento que parte de las posiciones 3534 a 3632, corresponde a la región de visagra que une ambos dominios conservados y que tiene secuencia y longitud variable. El tercer segmento, con las posiciones 3749 a 3828, corresponde al dominio carboxilo terminal, que funciona en la formación de dímeros con otras proteínas E2 y en la unión al ADN en los sitios consenso de la LCR (Figura 1.9).

La variante Af presenta más cambios en su secuencia génica de E2 con respecto a la secuencia prototipo, incluyendo algunas deleciones en la región central que corresponde a la de visagra en la proteína. La variante E también presenta cambios,

pero no tan numerosos como los de la variante Af; y estos se concentran sobre todo en la región correspondiente al dominio N-terminal. La variante Af presenta algunos cambios en su secuencia de E2, que ya habían sido identificados en la variante de VPH18 reportada por Hecht y col (1995), donde esta última se halló solo en lesiones precursoras de CaCu y por lo que se propuso que tenía un bajo potencial oncogénico¹²⁵. Nos preguntamos si estos cambios podrían afectar la función reguladora de E2 sobre la LCR. Para ello, se cotransfectaron tanto el vector reportero con la LCR ligada al gen de luciferasa, como el vector de expresión de E2, de tal manera que la proteína E2 de una variante viral específica interaccionara con la LCR de la misma variante (Figura 3.8, experimentos E, F y G). El efecto que las diferentes proteínas E2 tienen sobre la actividad transcripcional del promotor en sus LCRs homólogas se midió analizando la actividad del gen reportero luciferasa. La cotransfección y análisis de la actividad de luciferasa se describe en la sección de Materiales y Métodos (Figuras 3.7 y 3.8). Los resultados de la cuantificación de luciferasa se tabularon y graficaron para analizar la actividad de cada promotor viral.

Tabla 4.3 Cambios en la secuencia del gen E2 y en la secuencia deducida de aminoácidos para cada variante viral. En la figura anexa se ven los dominios de la proteína afectados por tales cambios.

	Referencia		Europea		Africana		
	Posición	Nucleótido	Aminoácido	Nucleótido	Aminoácido	Nucleótido	Aminoácido
Región Amino terminal. • Dimerización • Transactivación	3155	C	Cys 113	G	Trp 113		
	3211	G	Cys 132			C	Ser 132
	3217	C	Thr 134	A	Asn 134	A	Asn 134
	3277	C	Ala 154	G	Gly 154		
Región de Visagra	3534	T	Tyr 240			C	His 240
	3586	A	Lys 257			C	Thr 257
	3593	T	His 259			G	Gln 259
	3627	A	Thr 271				del
	3628	C					del
	3629	A					del
	3630	C	Pro 272	G	Ala 272		del
	3631	C					del
3632	T					del	
Región Carboxilo terminal. • Dimerización • Unión al ADN	3749	C	Asp 311			G	Glu 309
	3757	G	Arg 314			A	Lys 312
	3759	G	Asp 315			A	Asn 313
	3792	G	Gly 326			T	Cys 324
	3828	C	His 338			A	Asn 336



Previo a la transfección, se comprobó la presencia del gen E2 en las construcciones, tal como se indicó en las tablas 3.6 y 3.7 y como puede verse en la figura A6, donde se muestra la digestión doble de los plásmidos pCG E2. Mientras que en la figura 4.8 se muestra el resultado de la cotransfección en la línea celular de adenocarcinoma, HeLa. Vemos un efecto represor en la actividad transcripcional de la LCR de cada variante, cuando los vectores reporteros son cotransfectados con los vectores pCG E2 de la variante homologa. En HeLa no se observan diferencias significativas en las actividades de las E2 variantes: la actividad de la LCR-AsAi se reduce hasta un 74 % de la actividad basal; la actividad de la LCR-E se reduce un 60 %; y la actividad de la LCR-Af se reduce hasta un 74% de la actividad basal.

Actividad transcripcional de variantes de VPH 18 en HeLa

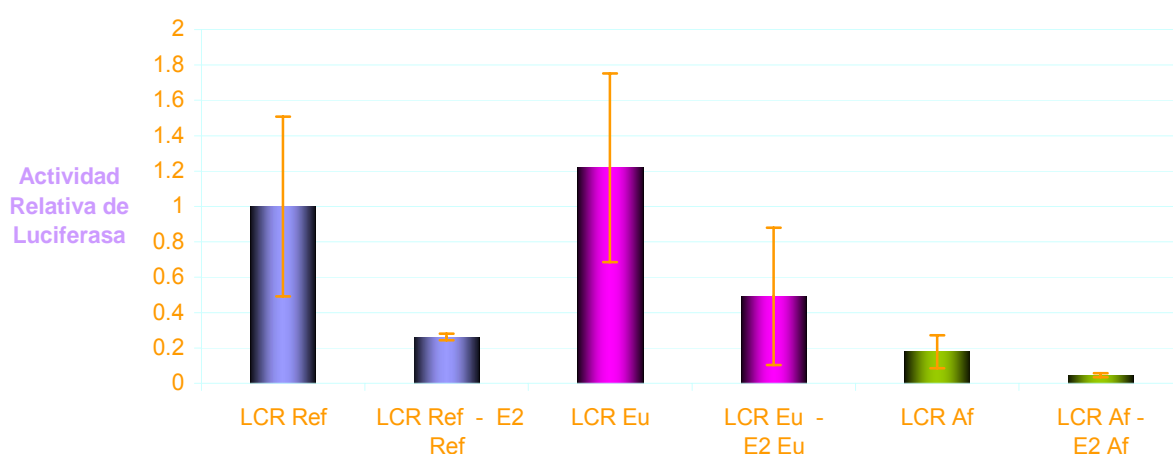


Figura 4.8. Transfección de HeLa con los distintos vectores pLCR-Luc y pCG E2 para comparar la actividad transcripcional basal entre las variantes virales. La actividad de cada LCR es reprimida cuando el vector reportero es cotransfectado con los vectores de expresión para E2. No hay diferencias significativas en el grado de represión de actividad de cada variante. La actividad de la variante AsAi es ajustada a 1.

En la figura 4.9 se observa el resultado del mismo análisis, pero ahora con la línea celular de carcinoma escamoso, CaLo. Nuevamente no se observan diferencias significativas en las actividades de las E2 variantes: la actividad de la LCR-AsAi se reduce hasta un 73 % de la actividad basal; mientras que la actividad de la LCR-E se reduce un 70 %; y finalmente la actividad de la LCR-Af se reduce hasta un 74% de la actividad basal. Ninguno de estos valores representa una diferencia significativa. De estos experimentos se concluye que las variaciones en la secuencia de E2 no repercuten, de manera diferencial entre ellas, en su capacidad de represión de la actividad transcripcional de la LCR.

Actividad transcripcional de variantes de VPH18 en CaLo

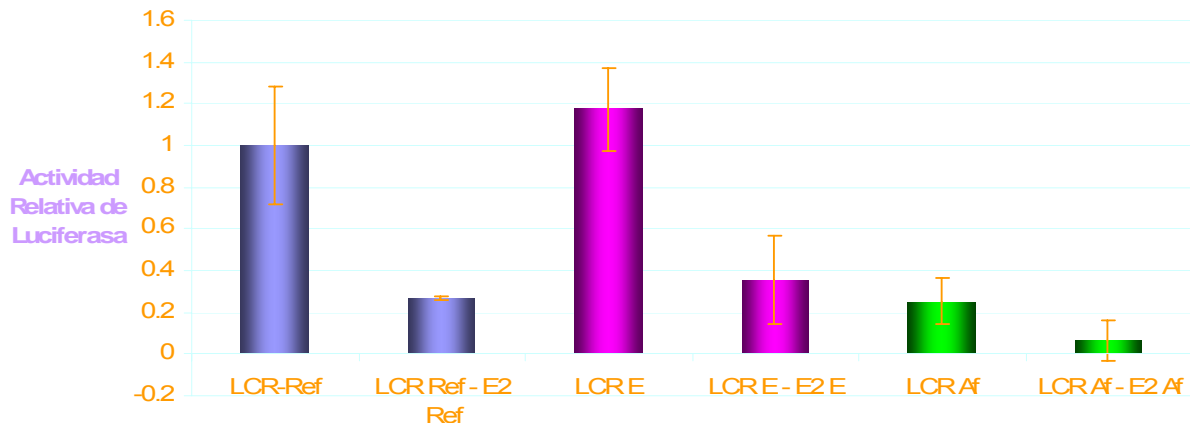


Figura 4.9. Transfección de CaLo con los distintos vectores pLCR-Luc y pCG E2 para comparar la actividad transcripcional basal entre las variantes virales. La actividad de cada LCR es también reprimida cuando el vector reportero es cotransfectado con los vectores de expresión para E2. No hay diferencias significativas en el grado de represión que E2 ejerce sobre las LCRs de variantes homólogas.

4.2.4 Cotransfección del vector reportero pSEK – 455 – Luc con el vector de expresión de E2

La LCR de VPH18 contiene múltiples sitios de unión a diversos factores de transcripción celulares. Ya hemos visto que la cotransfección de los vectores que contienen la LCR de las variantes y aquellos que contienen el marco de lectura para E2 de las mismas, ocasiona una disminución similar en la actividad transcripcional del promotor de las distintas variantes. Sin embargo, consideramos que la ausencia de diferencias en la actividad represora que fueran evidentes, podría deberse a una compensación de la actividad transcripcional, proporcionada por los factores celulares. De este modo, quisimos analizar la posibilidad de diferencias de represión de E2 sobre un vector cuyo promotor solo contara con sitios de unión consenso a esta proteína. Se procedió a cotransfectar los mismos vectores de expresión pCG E2 con el vector reportero pSEK que contiene 4 sitios de unión a E2, justo hacia el extremo 5' de un promotor mínimo de timidín-cinasa, tk (Figura 3.4). Dicho vector contenía al gen reportero Cloramfenicol Acetil-Transferasa, CAT. Sin embargo, dado que nuestras mediciones estaban estandarizadas usando luciferasa como reportero, procedimos a reemplazar CAT por luciferasa. El procedimiento de digestión y clonación se describe en la sección de Materiales y Métodos.

En la figura A7, del apéndice A, se ilustra la primera digestión para liberar la región promotora, de aproximadamente 450 pb que contiene los sitios de unión a E2 (Figura

3.4). Después de haber digerido el vector reportero pGL2-Basic con las mismas enzimas y de haber ligado tanto plásmido linealizado, como fragmento purificado, se transformó la cepa de E. coli competente, DH5 α . A continuación se digirieron nuevamente los plásmidos purificados con el objeto de comprobar que la ligación se había logrado exitosamente. Para ello se usaron las mismas enzimas de restricción que liberaron la región promotora (Figura A8). De esta forma tenemos una región que tiene al promotor tk, que además responde a la unión de la proteína viral E2 para la expresión del gen reportero luciferasa.

El procedimiento de cotransfección de los vectores que expresan las distintas E2 variantes y este vector reportero se describe en la sección de Materiales y Métodos, así como el ensayo de luciferasa para el producto expresado. Los datos que se obtuvieron en el luminómetro se tabularon y graficaron para comparar las actividades, producto de la interacción de E2 con los sitios de unión, ubicados en la región promotora de pSEK – Luc (Figura 4.10).

Como se puede observar, las E2 variantes reprimieron la actividad de pSEK-Luc en distintas proporciones, cuyo efecto es más evidente que en los experimentos con la LCR. E2-AsAi tuvo una mayor capacidad de represión de la actividad transcripcional que las otras variantes de E2. Es decir, mientras que E2-AsAi reprimió la actividad basal en un 74%, E2-E lo hizo solo en un 40% y E2-Af en un 50 %.

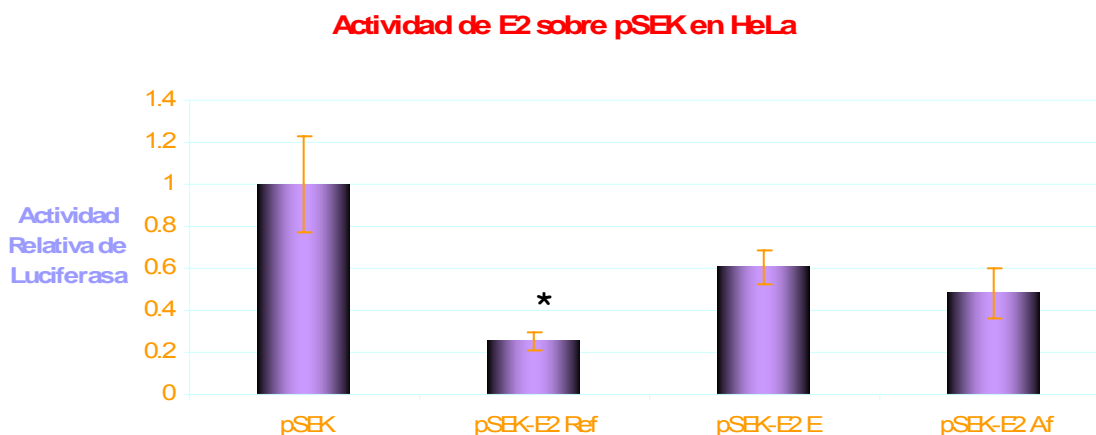


Figura 4.10. Transfección de HeLa con el vector reportero pSEK-Luc y los vectores de expresión pCG E2 de las variantes virales, para comparar la capacidad de unión y represión de E2 sobre el promotor. La proteína E2 de la variante AsAi tiene, de manera significativa ($P < 0.05$ con la prueba de Fisher LSD de comparaciones múltiples), mayor capacidad para reprimir la actividad promotora del vector pSEK-Luc.

5. DISCUSIÓN

La infección por tipos específicos del VPH es requisito necesario para el desarrollo de casi todos (99.8%) los casos de CaCu³ y otros carcinomas anogenitales incluyendo de pene²⁵, vagina²⁶, vulva²⁷ y ano²⁸. Actualmente se conoce la secuencia completa de más de 100 tipos de VPH³³, los que se han clasificado en tipos virales de bajo o alto riesgo oncogénico, de acuerdo a su prevalencia en el CaCu. Los tipos virales más frecuentes son los tipos 16 y 18. El VPH16 se halla en el 50-60 % de los casos, mientras que el VPH18 se halla en el 10 al 20 % de los casos. Sin embargo, VPH18 está asociado con mayor frecuencia a tipos histológicos de adenocarcinoma que a carcinoma escamoso¹²².

Dentro de los factores de riesgo del hospedero para el desarrollo del CaCu están la actividad sexual, la multiparidad, estado inmunológico, tabaquismo, polimorfismos genéticos, etc. Los factores de riesgo virales incluyen la persistencia viral, la relación cuantitativa entre genomas virales episomales e integrados en el genoma de la célula hospedera, niveles de expresión de los oncogenes E6 y E7, así como el rompimiento del marco de lectura de E2. Sin embargo, cada vez hay más evidencia (incluyendo la del presente trabajo) de que la variación viral intratípica puede ser un factor importante que contribuya a la gama de patogénesis asociada al VPH⁹⁷⁻¹²⁵.

La diversidad patogénica entre las variantes virales de VPH puede originarse de diferencias en la secuencia de regiones regulatorias o codificantes dentro del genoma viral. Dado que la LCR contiene sitios de unión a E2 y sitios de unión a factores de transcripción, los cambios en la secuencia génica de la LCR y de E2 entre las variantes virales, podrían repercutir de distinta manera en la modulación de la expresión génica y en la replicación del virus. La variación en la secuencia de genes como E6 y E7 podría ser también de importancia funcional al modificar la estructura de estas proteínas y por ende su función, es decir, la interacción con importantes proteínas reguladoras, tanto de ciclo celular como de reparación del ADN, como son P53 y pRB.

Varios reportes han propuesto la asociación entre variantes de VPH18 con tipos histológicos específicos de cáncer cérvicouterino^{119,123-124}, con un potencial oncogénico menor^{125,126}, con recurrencia tumoral¹²⁹ y persistencia de infección¹⁰³. Estudios previos han descrito la distribución de variantes Europea (E), Africana (Af) y Asiática-Amerindia (AsAi) del VPH18 en biopsias de pacientes con cáncer cérvicouterino atendidas en el Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México¹¹⁹. La variante E se encontró en carcinomas escamosos, carcinomas adenoescamosos y adenocarcinomas. La variante AsAi (Referencia) se encontró en carcinomas

adenoescamosos y adenocarcinomas, pero no en los carcinomas escamosos; mientras que la variante Af se halló exclusivamente en carcinomas escamosos. Dado que estos últimos son considerados de mejor pronóstico relativo que los tipos histológicos anteriores, se pensó que la variante Af tendría un comportamiento menos agresivo que las otras variantes virales de VPH18¹¹⁹. Además en otro estudio, esta misma variante Af fue también encontrada solo en citologías normales y lesiones premalignas¹³¹. Estas asociaciones con los tipos histológicos pueden correlacionar con diferencias funcionales entre las variantes virales del VPH18. En el presente estudio analizamos las diferencias en la actividad transcripcional entre estas variantes virales de VPH18, AsAi, E y Af, en función tanto del tipo histológico de líneas celulares de cáncer cérvicouterino, como de las variaciones génicas de la LCR y de E2. Varios estudios sugieren que la variación en la secuencia de la LCR puede afectar los sitios de unión a factores de transcripción, tales como AP-1, NF1, Oct-1, TEF-1, YY1 y SP1 y con ello la actividad transcripcional^{88, 126, 129}. Ya previamente se han descrito diferencias en la tasa de replicación y en la actividad transcripcional del promotor temprano entre variantes de otros tipos virales, como VPH16^{102, 127, 128}, como también entre variantes E y AsAi de VPH18¹¹².

Para hallar la correlación entre actividad transcripcional de las variantes E, AsAi y Af con el tipo histológico de las líneas celulares, se introdujeron vectores reporteros con la LCR de cada variante viral en las siguientes líneas celulares: HeLa (adenocarcinoma), CaLo (carcinoma escamoso, grado IIB), SiHa (carcinoma escamoso, grado II) y C-33 A. HeLa y CaLo contienen secuencias génicas de VPH18 integradas al genoma celular, mientras que SiHa contiene secuencias génicas integradas de VPH16. C-33 A por el contrario, no contiene secuencia viral alguna. A continuación se comparó la actividad transcripcional entre las variantes virales y entre las líneas celulares.

Como se puede observar en las figuras 4.3 y 4.4, en el caso de HeLa y CaLo, la actividad transcripcional es casi similar entre las variantes E y AsAi. Esto indica que las diferencias en la secuencia de la LCR entre estas dos variantes no son suficientes para influir en una actividad diferencial entre ellas, en estas líneas celulares. Por su parte, la variante Af mostró una actividad transcripcional muy reducida, de hasta 5 veces en comparación con las otras variantes. Esto es interesante porque vemos que la var Af podría estar generando bajos niveles de transcritos tempranos, en contraste con las otras variantes virales, lo que a su vez podría repercutir en su potencial oncogénico, como se sugirió previamente por la asociación de estas con distintos tipos histológicos de CaCu¹¹⁹.

Como se observa en las figuras 4.5 y 4.6, en las líneas SiHa y C-33 A, los cambios en la secuencia génica de las LCR's sí contribuyen en las diferencias de la actividad

transcripcional, ya que la de la variante AsAi es significativamente mayor que aquella de la variante E. Esto llama la atención porque en las líneas HeLa y CaLo no hay diferencia entre estas dos variantes. Resulta interesante notar, tanto por observaciones hechas en el laboratorio, como por otras publicaciones, que los genomas de VPH18 integrados en el genoma celular de HeLa y CaLo, corresponden a variantes E^{108,112,130}. Esto sugiere que posiblemente HeLa y CaLo posean ciertas características que favorezcan la actividad de la variante E, o que no sean tan propicias para la actividad de la variante AsAi, como sí ocurre en las líneas SiHa y C-33 A, con VPH16 y sin VPH respectivamente. Esto correlaciona con la similitud de actividades entre las variantes AsAi y E, en las líneas HeLa y CaLo; y la mayor actividad de la AsAi en las líneas SiHa y C-33 A. Nuestro resultado además, concuerda con el reporte de Sichero L. y col. (2005) donde observan una mayor actividad transcripcional de variantes AsAi de VPH18 en la línea celular C-33 A, en comparación con las variantes Europeas¹¹². Nuevamente observamos que la variante Af posee la menor actividad transcripcional, tanto en SiHa, como en C-33 A.

A continuación buscamos correlacionar diferencias en la actividad transcripcional con el tipo histológico. Esto es muy evidente en la figura 4.7, donde vemos que la actividad transcripcional de las tres variantes virales resultó ser significativamente mayor en la línea celular HeLa, de adenocarcinoma de cérvix, a comparación de lo que sucede en las líneas CaLo y SiHa, ambas de carcinoma escamoso. Interesantemente, los diferentes tipos de VPH que de forma natural, contienen CaLo y SiHa, VPH 18 y 16 respectivamente, no repercuten en diferencias de la actividad entre las variantes virales. Por tanto, este resultado sugiere que solamente tanto el origen histológico de las líneas celulares, como los cambios en la secuencia de la LCR entre las variantes, son lo que determinan las diferencias en la actividad transcripcional de las variantes virales de VPH18.

También vemos en la figura 4.7 que la variante Af tiene definitivamente la menor actividad transcripcional. Sin embargo, el tipo histológico celular influye en la actividad, ya que esta es significativamente mayor en HeLa, de adenocarcinoma, en contraste con las líneas derivadas de carcinoma escamoso, CaLo y SiHa. Esto es importante porque una baja actividad transcripcional de este promotor podría repercutir en bajos niveles de las proteínas tempranas virales y en la interacción de estas con sus blancos celulares. Debido a que la variante Af se ha encontrado con mayor frecuencia, tanto en citologías normales como en lesiones premalignas¹³¹, además de solo haberse hallado en carcinomas escamosos del cérvix¹¹⁹, se ha propuesto que esta variante tiene un potencial oncogénico menor y que la progresión a lesiones de alto grado y a cáncer podría ser mas lenta en aquellas células infectadas con esta variante Af. Esta propuesta está además sustentada por los resultados obtenidos con la evaluación de

otras propiedades funcionales como el procesamiento alternativo de los transcritos tempranos ¹¹⁸. Por otro lado, la secuencia del gen E2 de esta variante Af tiene similitudes con aquella reportada por Hecht y col. (1997) ¹²⁵, quienes describen una variante viral que al ser encontrada solo en lesiones premalignas del cérvix y no en cáncer también podría tener un potencial oncogénico menor, tal y como se sugirió en dicho estudio.

La similitud entre la variante de E2 reportada por Hecht y nuestra variante Af, propuestas ambas como de bajo potencial oncogénico, nos llevó a preguntarnos si las variaciones en la secuencia génica de E2 podrían tener alguna repercusión en la regulación de la actividad transcripcional. Se cotransfectaron las células HeLa y CaLo tanto con los vectores reporteros que contienen la LCR de cada variante viral, como con los vectores de expresión de las variantes E2. A continuación se comparó la actividad transcripcional entre las variantes virales y entre las líneas celulares. Como se puede observar en la figura 4.8 en el caso de HeLa, E2 de cada variante viral ejerce un efecto represor en la actividad transcripcional de la LCR de la variante homóloga. Empero, no se observaron diferencias significativas en la actividad represora de cada E2 variante sobre su respectiva LCR: la actividad de la LCR-AsAi se reduce hasta un 74 % de la actividad basal; mientras que la actividad de la LCR-E se reduce un 60 %; y la actividad de la LCR-Af se reduce hasta un 74% de la actividad basal. Estos resultados indican que los cambios en la secuencia génica de E2 entre las distintas variantes virales, no repercuten en la capacidad de la proteína E2 para regular la transcripción, al menos en el contexto de la LCR de la variante homóloga. Lo mismo se puede observar en el caso de CaLo en la figura 4.9, donde además de cotransfectar esta línea celular con los vectores reporteros de la LCR y los vectores de expresión de E2 de las variantes homólogas, se cotransfectaron también vectores de variantes heterólogas. Por ejemplo, el vector reportero con la LCR-E se cotransfectó con el vector de expresión de E2 de la variante Af. También se cotransfectaron el vector reportero con la LCR-Af y el vector de expresión de E2 de la variante E. La actividad transcripcional de la LCR-Eu se reduce un 98% a causa de E2-Eu y es reducida también un 93% a causa de E2-Af. Por tanto, las diferencias génicas entre E2-E y E2-Af no son suficientes para repercutir en la actividad regulatoria de la proteína E2 sobre la LCR. La actividad de la LCR-Af se reduce hasta un 64%, a causa de E2-Af y es reducida también un 72% a causa de E2-E, las diferencias entre estos dos últimos porcentajes no son significativas tampoco. Vemos nuevamente que las diferencias entre E2-E y E2-Af no repercuten en su actividad regulatoria sobre esta última LCR. El hecho de que no existan diferencias significativas en la actividad regulatoria de E2, entre las variantes virales, ha sido observado previamente en otro estudios realizados con VPH16 por Veress G, y col. (1999), donde no se observan diferencias significativas en los potenciales de transactivación de E2 entre variantes de VPH16 ¹²⁸.

Consideramos que la ausencia de diferencias evidentes en la actividad represora, entre las variantes de E2, podría deberse a una compensación de la actividad transcripcional, proporcionada por las varias interacciones que se dan entre los factores celulares de transcripción y la LCR. De este modo, analizamos la posibilidad de diferencias en la actividad represora de las variantes E2 sobre el vector reportero pSEK que contiene 4 sitios de unión a E2, justo hacia el extremo 5' de un promotor mínimo de timidín-cinasa, tk. Como se ve en la figura 4.10, E2-AsAi tuvo significativamente una mayor capacidad de represión de la actividad transcripcional que las otras variantes de E2, reprimiendo la actividad basal en un 74%, E2-E lo hizo solo en un 40% y E2-Af en un 50 %. Este dato es interesante porque refleja propiedades regulatorias diferentes en estas proteínas E2, sobre todo en la variante AsAi, que no se reflejan sobre las LCR's. Sin embargo, dichas diferencias pueden deberse en primera instancia al arreglo espacial de los sitios de unión a E2, tanto en la región regulatoria de pSEK, como en la LCR; así como a distintas interacciones proteicas que se dan entre los factores de transcripción celulares y las regiones regulatorias de pSEK o LCR. Luego entonces, al juzgar por los resultados anteriores, las variaciones en E2 parecen no ser trascendentes en la actividad regulatoria de esta proteína. Tampoco repercuten las variaciones génicas de la LCR en la actividad regulatoria de E2, aún cuando se sabe que la unión de E2 al ADN depende de la conformación tridimensional de la molécula del ADN ¹³³.

Cabe considerar que desconocemos como estas variaciones influyen en las otras diversas funciones de E2. Esta proteína, asociada con E1, tiene un papel muy importante en las diversas fases de la replicación viral. De este modo, diferencias conformacionales de E2 podrían influir en su unión con las proteínas involucradas en la replicación ⁹². Es por ello que el efecto de las variaciones de E2 en la replicación viral resulta un tema de estudio relevante.

Por otro lado, se sabe que el coactivador CBP/p300 y el factor de transcripción SP1 promueven la actividad transactivadora del dominio amino terminal de E2 de VPH18 ^{134, 135}. Otras proteínas interactúan también con el dominio carboxilo terminal de E2, tales como C/EBP, que promueve la diferenciación celular; PARP, que es otro coactivador de E2 y un estabilizante de su unión con el ADN; y P53, cuya unión a E2 solo se ha examinado en VPH16 ^{136, 137, 138}. Desconocemos si estas interacciones podrían verse afectadas por diferencias estructurales de E2 que pudieran existir entre las variantes virales. También se ha señalado la importancia del dominio amino terminal de la proteína E2 en su actividad proapoptótica y de detención del progreso del ciclo celular ^{139, 140}. En este estudio no se analizaron posibles diferencias en la actividad proapoptótica de las variantes de E2. También se ha visto que el dominio amino terminal de E2 es necesario en el marcaje de la proteína para su degradación por la vía

del proteosoma, lo cual se creó es un mecanismo de regulación de los niveles de E2 durante el ciclo viral ¹⁴¹.

Las variantes E2 de VPH18 no parecen influir significativamente en su actividad reguladora de la transcripción, pero todas las funciones adicionales de E2, descritas arriba, hacen aún mas interesante la investigación del papel que pudieran tener las variantes intratipo del VPH sobre dichas funciones.

6. CONCLUSIONES

En este estudio demostramos que los cambios en la secuencia de la LCR de las variantes virales AsAi (Referencia), E y Af, de VPH18, repercuten en diferencias de la actividad transcripcional entre ellas. Sin embargo, estos cambios no son suficientes, pues tanto el origen histológico de las células en las que se expresa esta actividad transcripcional, como el tipo de VPH que contienen, pueden también contribuir en tales diferencias de actividad.

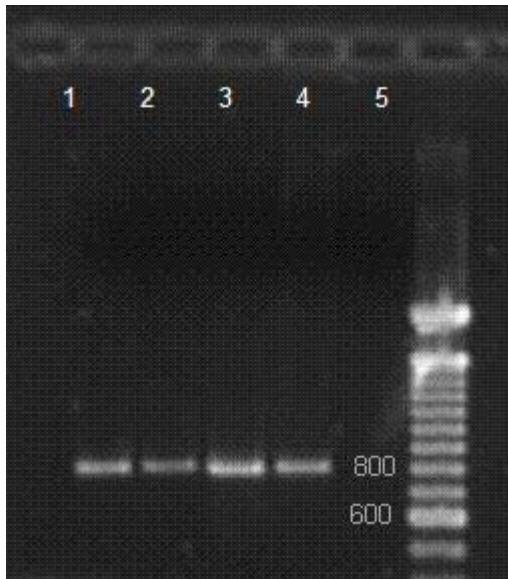
Los cambios en la secuencia génica de la LCR no parecen repercutir en diferencias de la actividad transcripcional entre las variantes E y AsAi, cuando estas se analizaron en HeLa y CaLo, líneas celulares que contienen, de forma natural, la variante E de VPH18 integrada en el genoma celular de ambas. En contraste sí hay diferencias entre la actividad de estas dos variantes virales cuando fue analizada en las líneas celulares SiHa y C-33 A, siendo mayor la actividad de la variante AsAi que la de la variante E; estas líneas no contienen secuencias virales de VPH18 integradas al genoma celular: SiHa contiene secuencias de VPH16, mientras que C-33 A no contiene secuencia viral alguna.

El tipo histológico de las líneas celulares repercute en la actividad transcripcional de las variantes virales, pues esta fue mayor en HeLa, adenocarcinoma de cérvix, en contraste con las líneas CaLo y SiHa, ambas de carcinoma escamoso. Interesantemente, los diferentes tipos de VPH integrados en CaLo y SiHa, VPH18 y 16 respectivamente, no repercuten en diferencias de la actividad entre las variantes virales. Por tanto, estos resultados sugieren que tanto el origen histológico de las líneas celulares, como los cambios en la secuencia de la LCR entre las variantes, son los factores que determinan las diferencias en la actividad transcripcional de las variantes virales de VPH18.

En cada línea celular, la variante Af tuvo la actividad transcripcional mas baja, independientemente del origen histológico. Estos resultados, junto con los hallazgos anteriores de la asociación exclusiva de esta variante viral con carcinomas escamosos¹¹⁹; de la mayor expresión de E6*1, en relación a las otras variantes virales¹¹⁸; y de una mayor prevalencia de esta variante en lesiones premalignas, en contraste con las otras variantes que son más prevalentes en CaCu¹³¹, sugieren que la variante Af puede tener un potencial oncogénico menor.

Los cambios en la secuencia génica de E2 no repercuten significativamente en diferencias en su actividad represora de la actividad transcripcional entre las variantes virales de VPH18, independientemente del origen histológico celular.

6. APÉNDICE A



Carril	Producto
1.	LCR Tumor 34 (Referencia)
2.	LCR Tumor 4 p (Var Africana)
3.	LCR Tumor 93 b (Var Europea)
4.	LCR CaLo
5.	Control (-): Sin ADN templado
6.	Marcador de 100 pb (Invitrogen Cat. No. 10380 - 012)

Agarosa al 1%

Figura A1 Amplificación por PCR de la LCR a partir de ADN de tumores de cérvix.

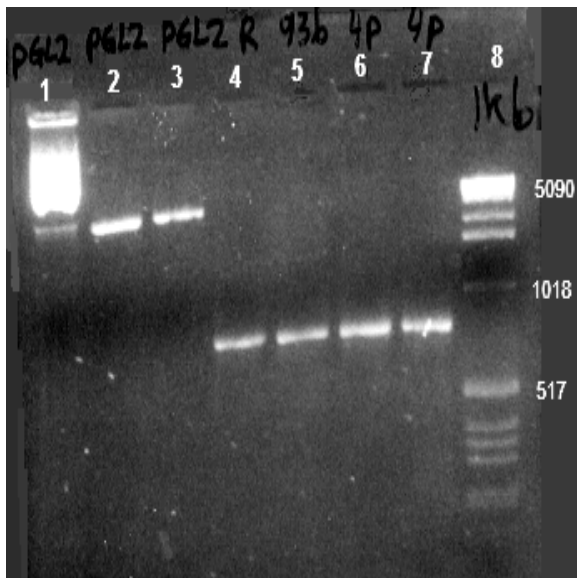


Figura A2 Plásmido pGL2 - Basic y LCR's de variantes, producto de PCR, cortados con *Hind III* y *Sma I* para posteriormente ligarse.

Carril	Producto
1.	pGL2 - Basic
2.	pGL2 - Basic cortado con <i>Hind III</i>
3.	pGL2 - Basic cortado con <i>Hind III</i> y <i>Sma I</i>
4.	LCR de VPH18 Referencia, cortada con las enzimas <i>Hind III</i> y <i>Sma I</i> .
5.	LCR de VPH18, variante Europea, cortada con <i>Hind III</i> y <i>Sma I</i> .
6.	LCR de VPH18, variante Africana, cortada con <i>Hind III</i> y <i>Sma I</i> .
7.	LCR de VPH18, variante Africana, cortada con <i>Hind III</i> y <i>Sma I</i> (repetición del carril 6).
8.	Marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen Cat No. 10511-012).

Agarosa al 1 % y 3 µl de cada muestra.

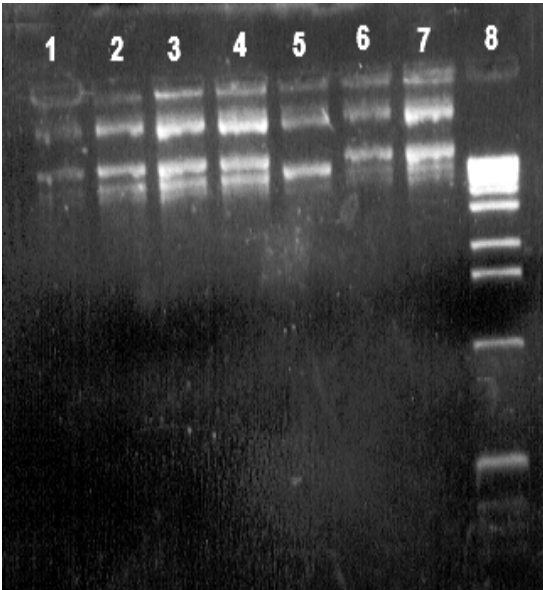
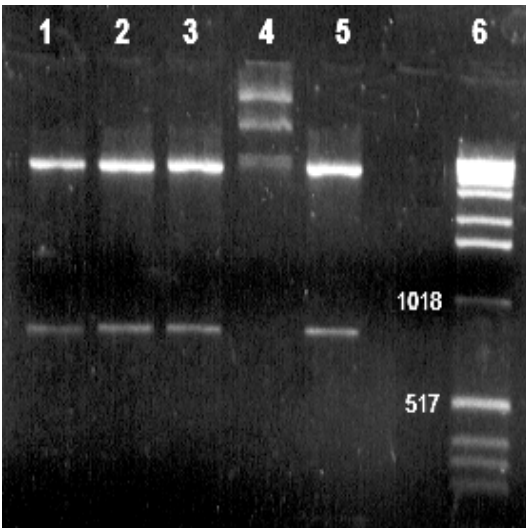


Figura A3 Plásmidos pLCR - Luc purificados por minipreparaciones rápidas

Carril	Producto
1.	Plásmido pLCR – Referencia.
2.	Plásmido pLCR – Referencia.
3.	Plásmido pLCR – Europea.
4.	Plásmido pLCR – Europea.
5.	Plásmido pLCR – Africana.
6.	Plásmido pLCR – Africana.
7.	Plásmido pLCR – Africana.
8.	Marcador de 1 Kb (Invitrogen Cat No. 10511-012)

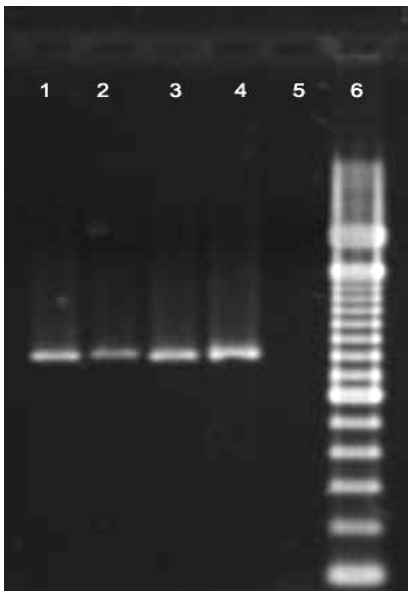
Gel al 0.8 % de agarosa y 3 μ l de muestra en cada pozo.



Carril	Producto
1.	Plásmido pLCR – Referencia.
2.	Plásmido pLCR – Referencia.
3.	Plásmido pLCR – Europea.
4.	Plásmido pLCR–Europea. Nótese como esta clona no contiene el inserto LCR.
5.	Plásmido pLCR – Africana.
6.	Marcador de 1 Kb (Invitrogen Cat No. 10511-012)

Gel al 1 % de agarosa con 3 μ l de cada muestra

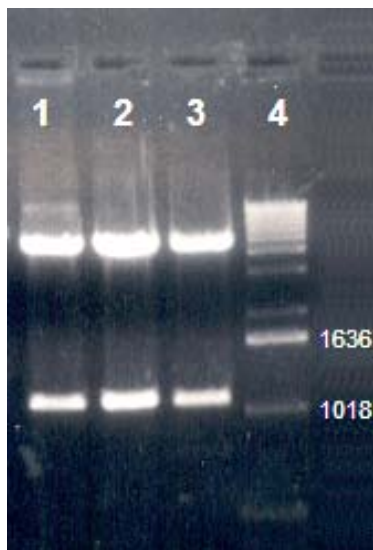
Figura A4 Digestión de construcciones purificadas por minipreparaciones con *Sma I* y *Hind III*



Carril	Producto
1.	Amplificación de LCR a partir de pLCR – Luc – AsAi.
2.	Amplificación de LCR a partir de pLCR – Luc – Eu.
3.	Amplificación de LCR a partir de pLCR – Luc – Af.
4.	Amplificación de LCR a partir de ADN de CaLo
5.	Control negativo
6.	Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Cat No. 10380 - 012)

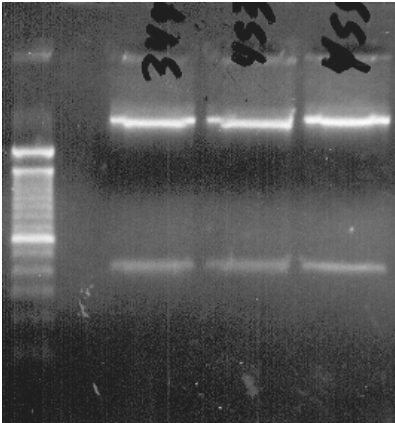
Gel al 1 % de agarosa y con 5 μ l de cada muestra.

Figura A5 Amplificación de LCR a partir de las construcciones pLCR - Luc de variantes, purificadas por minipreparaciones rápidas de transformantes positivas



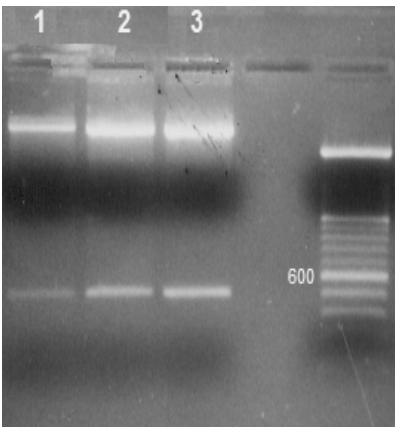
Carril	Muestra
1.	pCG E2 Asiático – Amerindia (Referencia)
2.	pCG E2 Europea
3.	pCG E2 Africana
4.	Marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen Cat No. 10511-012)

Figura A6. Digestión de vectores de expresión pCG E2 para cada variante viral, por medio de las enzimas *Xba I* y *Bam HI*.



Carril	Muestra
1	Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Cat No. 10511-012)
2	pCG E2 Asiático – Amerindia (Referencia)
3	pCG E2 Europea
4	pCG E2 Africana

Figura A7 Digestión de vector pSEK con enzimas *Hind III* y *Kpn I* para liberar la región promotora que responde a la unión de E2. El fragmento liberado se ligó posteriormente al vector reportero pGL2-Basic.



Carril	Producto
1.	pSEK – Luc variante Asiática Amerindia (Referencia)
2.	pSEK – Luc variante Europea
3.	pSEK – Luc variante Africana
4.	Marcador de 100 pb (Invitrogen Cat. No. 10380 - 012)

Figura A8 Digestión de vectores pSEK - Luc de las distintas variantes, usando las mismas enzimas como en la figura 4.17. De esta forma se comprobó la ligación en pGL2 - Basic de la región promotora que responde a la unión de E2.

REFERENCIAS

1. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, (1997). Cancer incidence in five continents, vol VII. International Agency for Research on Cancer, Scientific Publications number 143. Lyon; IARC,.
2. J. Ferlay, F. Bray, P. Pisani, D.M. Parkin. GLOBOCAN (2002): Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, IARC Cancer Base No. 5. Version 2.0, IARCPress, Lyon, 2004. (<http://www-dep.iarc.fr/>).
3. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, et al, (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*. 189: 12-19.
4. Ullmann EV, (1923). On the aetiology of the laryngeal papilloma. *Acta Oto-laryngol*. 5:317-334.
5. Waelsch L, (1917). Übertragungsversuche mit spitzem Kondylom. *Arch. Dermatol. Syph*. 124:625-646.
6. Rous P and Beard JW, (1935). Progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas. *Journal of Experimental Medicine*. 62: 523-545.
7. de Villiers EML, Gissmann H, zur Hausen H, (1981). Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *Journal of Virology*. 40: 932 – 935.
8. zur Hausen H, (1982). Human genital cancer: synergism between two virus infections and/or synergism between a virus infection and initiating events? *Lancet*. 2: 1370 – 1372.
9. zur Hausen H, (1996). Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1288: 55 – 78.
10. zur Hausen H, (1999). Papillomaviruses in human cancers. *Proceedings of the Association of American Physicians*. 111: 581 – 587.
11. Burk RD, Ho GY, Beardsley L, et al, (1996). Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *Journal of Infectious Diseases*. 174: 679 – 89.
12. Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z, et al, (2000). Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 182: 257-264.
13. Burk RD, Kelly P, Feldman J, et al, (1996). Declining presence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sexually Transmitted Diseases*. 23: 333-341.
14. Negrini BP, Schiffman MH, Kurman RJ, et al, (1990). Oral contraceptive use, human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix. *Cancer Research*. 50 (15): 4670 – 5.
15. Magnusson PK, Lichtenstein P, Gyllenstein UB, (2000). Heritability of cervical tumors. *International Journal of Cancer*. 88: 698-701.
16. Bosch FX, de Sanjose S, (2003). Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*. 3: 3 – 13.
17. Schiffman MH. (1992). Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. 84: 394 – 8.
18. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, et al, (1999). Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *The Journal of Infectious Diseases*. 180 (5) 1415 – 23.
19. Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL, et al, (2002). Incidence, prevalence and clearance of type – specific human papillomavirus infections: The Young Women’s Health Study. *The Journal of Infectious Diseases*. 186 (4): 462 – 9.

20. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T, (1999). Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *Journal of the National Cancer Institute*. 91: 252-258.
21. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, et al, (1994). Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *The Journal of Infectious Diseases*. 169 (2): 235 – 40.
22. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al, (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *The New England Journal of Medicine*. 338 (7): 423 – 8.
23. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al, (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of medicine*. 348 (6): 518 – 27.
24. Bachtary B, Obermair A, Dreier B, et al, (2002). Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *International Journal of Cancer*. 102(3):237-43.
25. Rubin MA, Kleter B, Zhou M, et al, (2001). Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *The American Journal of Pathology*. 159 (4) 1211 – 8.
26. Daling JR, Madeleine MM, Schwartz SM, et al, (2002). A population – based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. *Gynecologic Oncology*. 84(2): 263 – 70.
27. Trimble CL, Hildesheim A, Brinton LA, et al, (1996). Heterogeneous etiology of squamous carcinoma of the vulva. *Obstetrics and Gynecology*. 87 (1): 59- 64.
28. Clark MA, Hartley A, Geh JI, (2004). Cancer of the anal canal. *The Lancet Oncology*. 5(3): 149 – 57.
29. Andersson S, Rylander E, Larsson B, (2001). The role of human papillomavirus in adenocarcinoma carcinogenesis. *European Journal of Cancer*. 37: 246-250.
30. Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH, (1991). Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*. 185: 251-7
31. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, et al, (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self – assembles into virus – like particles that are highly immunogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89(24): 12180 – 4
32. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al, (2002). A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *The New England Journal of Medicine*. 347 (21): 1645 – 51.
33. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H, (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*. 324:17 – 27.
34. The health professional's HPV handbook 1: Human papillomavirus and cervical cancer. Walter Prendiville and Philip Davies. Taylor & Francis Group.
35. <http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Papovaviruses.html>
36. Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, et al, (2001). Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 1218 – 23.
37. Mantovani F, Banks L. (2001). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. 20:7874 – 87
38. 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.
39. 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.

40. Boyer SN, Wazer DE, Band V, (1996). E7 protein of human papillomavirus 16 induces degradation of the retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Research*. 56: 4620 – 4
41. Munger K, Basile JR, Duensing S, et al, (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogen*. 20: 7888 – 98
42. Burkhardt A, Willingham M, Gay C, et al, (1989). The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology* 170, 334 – 339.
43. Sparkowski J, Anders J, Schlegel R, et al, (1995). E5 oncoprotein retained in the endoplasmic reticulum / cis Golgi still induces PDGF receptor autophosphorylation but does not transform cells. *The EMBO Journal*. 14, 3055 – 3063.
44. Martin P, Vass WC, Schiller JT, et al, (1989). The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF – 1 receptors. *Cell* 59, 21 –32.
45. Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D, (1995). The HPV 16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology* 211, 227 – 233.
46. Petti L, Nilson LA, Dimaio D, (1991). Activation of the platelet – derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *The EMBO Journal*. 10, 845 – 855.
47. Valle G, Banks L, (1995). The human papillomavirus HPV-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *The Journal of General Virology*. 76: 1239-1245
48. Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R, (1993). The human papillomavirus type 6 and 16, E5 proteins are membrane associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *Journal of Virology*. 67, 6170 – 6178.
49. Leechanachai P, Banks L, Moreau F, et al, (1992). The E5 gene from HPV 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* 7, 19 - 25.
50. Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM, et al, (1994). The human papillomavirus type 16, E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology* 203, 73 – 80.
51. Straight SW, Herman B, McCance DJ, (1995). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *Journal of Virology*. 69, 3185 – 3192.
52. Benyue Z, Ping L, Exing W, et al (2003). The E5 protein of HPV16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon- γ . *Virology* 310, 100 – 108.
53. Fouts ET, Yu X, Egelman EH, et al, (1999). Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 4447 - 4458.
54. Liu JS, Kuo SR, Makhov AM, et al (1998). Human Hsp 70 and Hsp 40 proteins facilitate human papillomavirus type 11 E1 protein to binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 30704 – 30712.
55. Gillitzer E, Chen G, Stendlund A, (2000). Separate domains in E1 and E2 proteins serve architectural and productive roles for cooperative DNA binding. *The EMBO Journal*. 19, 3069 – 3079.
56. Gillette TG, Lusky M, Borowiec JA, (1994). Induction of structural changes in the bovine papillomavirus type 1 origin of replication by the viral E1 and E2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91, 8846 – 8850.
57. Wilson VG, West M, Woytek K, et al, (2002). Papillomavirus E1 proteins: Form, function, and features. *Virus genes* 24:275 - 290
58. Swindle CS, Engler JA, (1998). Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1. *Journal of Virology*. 72, 1994 – 2001.

59. Lee D, Sohn H, Kalpana GV, et al, (1999). Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature*. 399: 487-91.
60. McBride A, Myers G, (1997). The E2 proteins. Human papillomavirus. *Los Alamos National Laboratory*, p. III-54 - III-72
61. Rashmi S. Hegde, (2002). The papillomavirus E2 proteins: Structure, function, and biology. *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure*. 31: 343 – 60.
62. Lefebvre O, Steger G, Yaniv M. (1997). Synergistic transcriptional activation by the papillomavirus E2 protein occurs after DNA binding and correlates with a change in chromatin structure. *Journal of Molecular Biology*. 266: 465 – 78.
63. Peng YC, Breiding DE, Sverdrup F, et al, (2000). AMF-1/Gps2 binds p300 and enhances its interaction with papillomavirus E2 proteins. *Journal of Virology*. 74: 5872 – 9
64. Demeret C, Desaintes C, Yaniv M, et al, (1997). Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of HPV18 viral oncogenes. *Journal of Virology*. 71(12): 9343–9349.
65. Desaintes C, Demeret C, Goyat S, et al, (1997). Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *The EMBO Journal*. 16(3):504-14.
66. Desaintes C, Goyat S, Garbay S, et al, (1999). Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells. *Oncogene*. 18(32):4538-45.
67. Doorbar J, Parton A, Hartley K, et al, (1990). Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology*. 178:254–262
68. Nasser M, Hirochika R, Broker TR, et al, (1987). A human papillomavirus type 11 transcript encoding an E1^{E4} protein. *Virology*. 159: 433–439
69. Breitburd F, Croissant O, Orth G, (1987). Expression of human papillomavirus type-1 E4 gene products in warts, p. 115–122. *In* B. M. Steinberg, J. L. Brandsma, and L. B. Taichman (ed.), *Cancer cells*, vol. 5. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y
70. Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, et al, (2002). Identification of a G2 Arrest Domain in the E1^{E4} Protein of Human Papillomavirus Type 16. *Journal of virology*. 76(19): 9806–9818.
71. Sorathia C, Davy J, Doorbar J. Regulation of E2-mediated transcription by 16 E4. Study ongoing.
72. Stubenrauch F, Laimins LA, (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Seminars in Cancer Biology*. 9: 379 – 86.
73. Stubenrauch F, Zobel T, Iftner T, (2001). The E8 domain confers a novel long distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high risk HPV 31. *Journal of Virology*. 75: 4139 – 49.
74. Doorbar J, Foo C, Coleman N, et al, (1997). Characterisation of events during the late stages of HPV 16 infection in vivo using high affinity synthesis fabs to E4. *Virology*. 238: 40 – 52.
75. Day PM, Roden RB, Lowy DR, et al, (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. *Journal of Virology*. 72: 142 – 50.
76. Bouallaga I, Thierry F. (1999). Control of Human Papillomavirus type 18 transcription: role in carcinogenesis. *Recent Research Developments in Virology*. 1, 369-383.
77. Evander M, Frazer IH, Payne E, et al, (1997). Identification of the alpha-6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *Journal of Virology*, 71: 2449-2456.
78. Giroglou T, Florin L, Schafer F, et al, (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *Journal of Virology*. 75, 1565-1570.

79. Yoon CS, Kim KD, Park SN, et al, (2001). Alpha (6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283, 668-673.
80. Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, et al, (1992). Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *Journal of Virology*. 66, 3740-3748.
81. Bouallaga I, Massicard S, Yaniv M, et al, (2000). An enhanceosome containing the Jun B/Fra-2 heterodimer and the HMG-I(Y) architectural protein controls HPV 18 transcription. *EMBO Reports*. 1, 422-427.
82. Butz K, and Hoppe-Seyler F, (1993). Transcriptional control of HPV oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *Journal of Virology*. 67, 6476-6486.
83. Morris PJ, Dent CL, Ring CJ, et al, (1993). The octamer binding site in the HPV16 regulatory region produces opposite effects on gene expression in cervical and non-cervical cells. *Nucleic Acids Research*. 21: 1019-1023.
84. Hoppe-Seyler F, Butz K, and zur Hausen H, (1991). Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. *Journal of Virology*. 65: 5613-5618.
85. Apt D, Chong T, Liu Y and Bernard HU, (1993). Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *Journal of Virology*. 67: 4455-4463.
86. Bauknecht T, Angel P, Royer HD, zur Hauen H. (1992). Identification of a negative regulatory domain in the HPV18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *The EMBO Journal*. 11:4607-4617.
87. Bauknecht T, Jundt F, Herr I, et al, (1995). A switch region determines the cell type-positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. *Journal of Virology*. 69:1-12.
88. Dong XP, Stubenrauch F, Beyer-Finkler E, and Pfister H. (1994). Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV-16 DNA from cervical cancers. *International Journal of Cancer*. 58:803-808.
89. May M, Dong XP, (1994). The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *The EMBO Journal*. 13:1460-1466.
90. Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT, (2003). Papillomavirus infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*. 307: 1- 11.
91. Li M, Beard P, Estes PA. (1998). Intercapsomeric disulphide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *Journal of Virology*. 72: 2160-7
92. Wilson VG, West M, Woytek K, et al, (2002). Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. 24: 275-90
93. Frattini MG, Lim HB, Laimins LA. (1996). In vitro synthesis of oncogenic HPVs requires episomal genomes for differentiation-dependent late gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 3062 - 7
94. Sherman L, Jackman A, Itzhaki H, et al, (1997). Inhibition of serum- and calcium- induced differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6 oncoprotein: role of P53 inactivation. *Virology*. 237: 296 - 306.
95. Doorbar J, Ely S, Sterling J, et al, (1991). Specific interaction between HPV 16 E1 - E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 352: 824 - 7.
96. Hans-Ulrich Bernard. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *The Journal of Clinical Virology*. 32S. S1-S6.
97. Stöppler MC, Ching K, Stöppler H, et al, (1996). Natural variants of the HPV16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *Journal of Virology*. 70: 6987 - 6993

98. Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, et al, (2001). Asian– American variants of HPV16 and risk for cervical cancer: a case control study. *Journal of the National Cancer Institute*. 93, 1325– 1330
99. Da Costa MM, Hogeboom CJ, Holly EA, Palefsky JM, (2002). Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant. *The Journal of Infectious Diseases*. 185: 1229– 1237
100. Giannoudis A, Herrington CS, (2001). Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *The Journal of Pathology*. 193, 295– 302
101. Giannoudis A, Duin M, Snijders PJ, et al, (2001). Variation in the E2-binding domain of HPV16 is associated with high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *British Journal of Cancer*. 84, 1058–1063
102. Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, et al. (2000). Sequence analysis of the long control region of HPV 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *The Journal of General Virology*. 81, 1975– 1981
103. Villa LL, Sichero L, Rahal P, et al, (2000). Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *The Journal of General Virology*. 81, 2959–2968
104. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, et al, (1997). Genomic variation of HPV16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. 89, 796– 802
105. Xi LF, Critchlow CW, Wheeler CM, et al. (1998). Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Research*. 58, 3839– 3844.
106. Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, et al, (2004). Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology*. 319: 315– 323.
107. Ho L, Chan SY, Burk RD, et al, (1993). The genetic drift of HPV 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and movement of ancient human populations. *Journal of Virology*. 67:6413– 6414.
108. Ong CK, Chan SY, Campo MS, et al, (1993). Evolution of HPV 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *Journal of Virology*. 67, 6424– 6431.
109. Yamada T, Manos MM, Peto J, et al, (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *Journal of Virology*. 71: 2463– 2472.
110. Wheeler CM, Yamada T, Hildesheim A, (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridisation. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 11 – 19
111. Yamada T, Manos MM, Peto J, et al, (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *Journal of Virology*. 71: 2463 – 2472
112. Sichero L, Franco E, Villa LL, (2005). Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *The Journal of Infectious Diseases*. 191: 739 – 42
113. Giannoudis A, Herrington CS, (2001). Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *Journal of Pathology*. 193: 295 – 302
114. Londesborough P, Ho L, Terry G, et al, (1996). HPV genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *International Journal of Cancer*. 69: 364 – 368
115. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Research*. 58: 829 – 833

116. Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, et al, (1999). Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *International Journal of Cancer*. 82: 203 – 207
117. Grodzki M, Besson G, Tommasino M. Increased risk for cervical disease progression of french women infected with the human papillomavirus 16 E6 – 350 G variant. Study ongoing.
118. De la Cruz-Hernández E, García-Carranca A, Lizano-Soberon M. (2005). Differential splicing of E6 within HPV18 variants and functional consequences. *Journal of General Virology*. 86, 2459 – 2468
119. Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, Garcia-Carranca A, (1997). Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 89:1227–1231.
120. <http://www.ops-oms.org/Spanish/DD/PIN/ps050819.htm>
121. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST, (2006). Genome variations of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *International Journal of Cancer*. 118: 1071 – 1076.
122. Pirog EC, Kleter B, Olgac S, et al, (2000). Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *The American Journal of Pathology*. 57: 1055 - 1062
123. De Boer MA, Peters LA, Aziz MF, et al, (2005). Human papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *International Journal of Cancer*. 114: 422 – 5
124. Burk RD, Terai M, Gravitt PE, et al, (2003). Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Research*. 63: 7215-20.
125. Hecht JL, Kadish AS, Jiang G, Burk RD, (1995). Genetic characterization of the human papillomavirus 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype of decreased oncogenic potential. *International Journal of Cancer*. 60, 369-76.
126. Rose B, Steger G, Dong XP, et al, (1998). Point mutations in SP1 motifs in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 18 isolates from cervical cancers increase promoter activity. *The Journal of General Virology*. 79: 1669 – 63.
127. Hubert WG, (2005). Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle. *Journal of Virology*. 79: 5914 – 22.
128. Veress G, Szarka K, Dong XP, et al, (1999). Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *The Journal of General Virology*. 80: 1035 – 43.
129. Rose BR, Thompson CH, Zhang J, et al, (1996). Sequence variation in the upstream regulatory region of HPV 18 isolates from cervical cancers. *Gynecologic Oncology*. 66: 282 – 289
130. Meissner JD, (1999). Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CasKi, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *The Journal of General Virology*. 80, 1725-1733
131. Lizano M, De la Cruz-Hernández E, Carrillo-García A, et al, (2006). Distribution of HPV 16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population. *Gynecologic Oncology* (article in press).
132. Giannoudis A, Duin M, Snijders PJ, Herrington CS, (2001). Variation in the E2-binding domain of HPV 16 is associated with high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *British Journal of Cancer*. 84: 1058-1063
133. Hegde RS, (2002). The papillomavirus E2 proteins: Structure, function and biology. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 31: 343-360

134. Steger G, Schnabel C, Schmidt HM, (2002). The hinge region of the HPV type 8 E2 protein activates the human p21^{WAF1/CIP1} promoter via interaction with Sp1. *The Journal of General Virology*. 83: 503-510
135. Lee D, Lee B, Kim J, et al, (2000). cAMP response element-binding protein-binding protein binds to HPV E2 protein and activates E2-dependent transcription. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 7045-7051
136. Hadaschik D, Hinterkeuser K, Oldak M, et al, (2003). The Papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation. *Journal of Virology*. 77: 5253-5265
137. Lee D, Kim JW, Kim K, et al, (2002). Functional interaction between HPV 18 E2 and poly (ADP-ribose) polymerase I. *Oncogen*. 21: 5877-5885
138. Massimi P, Pim D, Bertoli C, et al, (1999). Interaction between HPV 16 E2 transcriptional activator and P53. *Oncogen* 18: 7748-7754
139. Desaintes C, Demeret C, Goyat S, et al, (1997). Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *The EMBO Journal*, 16: 504 – 514
140. Demeret C, García-Carranca A, Françoise Thierry, (2003). Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by HPV 18 E2 protein. *Oncogen*, 22: 168-175
141. Bellanger S, Demeret C, Goyat S, Thierry F, (2001). Stability of the HPV 18 E2 protein is regulated by a proteasome degradation pathway through its amino-terminal transactivation domain. *Journal of Virology*. 75:7244-725