



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

ESTUDIO DEL EFECTO DEL
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO
EN LA EXPRESIÓN Y
FOSFORILACIÓN DE LA
PROTEÍNA SURVIVINA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MA. CRISTINA AGUILAR CALLES

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Leticia Rocha Zavaleta

México, D.F.

Abril 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Uff... es difícil comenzar, pero aquí voy....

Por sus múltiples atenciones que me tuvo y sigue teniendo, por escucharme en las buenas y en las malas, por no permitirme ser mediocre, por su apoyo incondicional, humanidad y gran ímpetu científico además por permitirme organizar las reuniones del laboratorio GRACIAS Dra. Rocha, es mi ejemplo a seguir en el mundo de la investigación.

A todas aquellas que a su paso por el laboratorio me mostraron su apoyo y me brindaron su amistad MIL GRACIAS. Vale, Olga, Wendy, Evelyn, Cecy, Laura, Lizbeth, Rafaela, Angélica, Elizabeth, Cleo, Majo.

Un agradecimiento muy especial para la primer persona que me hizo sentir parte del laboratorio, que me ha abierto su corazón y me ha permitido conservar su amistad incondicional, GRACIAS Irmix, T.Q.M.

A todos-todos-todos (y sí que son muchos) mis compañeros y amigos de la UAM que han seguido mis pasos Manuel, Haydee, Larre, Isabel Nieto, Richard, Marco, Galileo, Toño, y por supuesto a los que me han animado a seguir adelante, Xochitl, Gabriel, Aco, René, Barney, especialmente a Memo

por no permitirme claudicar en los momentos más difíciles y ponerme los pies en la tierra MIL GRACIAS.

Por ser mis amigos del alma y algo más Paola y Juan Manuel por las vivencias compartidas, y por estar conmigo SIEMPRE.

Un agradecimiento muy especial que me ha conocido mucho antes de haber emprendido esta aventura científica que me ha fortalecido en los momentos difíciles y me ha enseñado lo que es la verdadera amistad, a ti César “chiminito” por tantos momentos gratos compartidos. T. Q. M.

A ti que tiene poco que nos reencontramos y que sin embargo me has ofrecido tu apoyo y comprensión, gracias primate del alma.

A todos los mencionados MUCHAS MUCHAS GRACIAS.

Dedicatorias

En primer lugar y muy especialmente a mis padres que me dieron la vida, y de ahí en adelante más de lo que yo pudiera merecer. Sé que este logro es de los tres y al fin lo alcanzamos.

Ma' gracias por tus regaños, por enseñarme que todo tiene solución en la vida, por aguantar mi genio en totorales y ahora en la víspera de mi examen de grado, por compartir conmigo grandes cosas y sobre todo: gracias por saber que en ti encuentro algo más grande que es la amistad.

Pa' (mi "antiguo") gracias por ser el padre que tu no pudiste tener, por tu esfuerzo para complacerme en todos los aspectos, por tu apoyo y por preocuparte siempre por mí.

A mis abuelos que, con su experiencia me han enseñado muchas cosas y me han dado la fortaleza espiritual que se necesita y por demostrarme lo orgullosos que están de "su prieta".

A mi enano "cabeza de chile", que con cada una de sus sonrisas me amínoró la carga y me llenó de energía para salir adelante. Mi niño sabes que llenas gran parte de mi vida **TE AMO MUCHO.**

A mi hermana que a pesar de no estar muy de acuerdo con esto, muy a su manera me ha apoyado.

A mi abuela Matiana que es mi refugio en los momentos difíciles, y sé que ha observado cada uno de mis pasos.

A una personita muy especial que vive en un rinconcito de mi corazón y me ha enseñado a valorar la vida desde su partida, Brenda por los momentos que estuve contigo.

A mis tías y tíos por igual, que han estado presentes y que, aunque quizá no entendieran bien mi rumbo científico, pero que se han preocupado por mí.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1. Apoptosis
 - 1.1.1. Vía Extrínseca
 - 1.1.2. Vía Intrínseca
 - 1.1.3. Apoptosis mediada por linfocitos
- 1.2. Regulación de la apoptosis
- 1.3. Survivina
- 1.4. Virus y apoptosis
- 1.5. Virus del Papiloma Humano
- 1.6. Survivina y Virus del Papiloma Humano

2. JUSTIFICACIÓN

3. OBJETIVOS

- 3.1. Objetivo general
- 3.2. Objetivos particulares

4. HIPÓTESIS

5. MATERIAL Y MÉTODO

- 5.1. Material Biológico
- 5.2. Análisis inmunohistoquímico de biopsias cervicales.
- 5.3. Análisis inmunohistoquímico de líneas celulares.
- 5.4. Análisis molecular de biopsias cervicales.
 - 5.4.1. Extracción de ADN de biopsias cervicales.
 - 5.4.2. Cuantificación de ADN.
 - 5.4.3. Análisis de la presencia de VPH por PCR.
 - 5.4.4. Análisis de la presencia de VPH 16 por PCR.
 - 5.4.5. Análisis de la presencia de VPH 18 por PCR.
- 5.5. Análisis de la expresión de survivina en biopsias cervicales.**
 - 5.5.1. Extracción de ARN de biopsias cervicales.
 - 5.5.2. Análisis de la expresión de survivina.
- 5.6. Análisis estadístico.

6. RESULTADOS

- 6.1. Análisis molecular de la presencia de VPH de biopsias cervicales.
- 6.2. Análisis de la presencia de survivina en biopsias cervicales.
- 6.3. Análisis de la presencia de survivina en líneas celulares.
- 6.4. Análisis de la expresión de survivina en biopsias de cérvix.

7. **DISCUSIÓN**

8. **CONCLUSIONES**

9. **PERSPECTIVAS**

10. **BIBLIOGRAFÍA**

11. **APÉNDICE**

RESUMEN

La proteína survivina pertenece a la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) y su forma activa es la fosforilada en el residuo 34 de treonina. Algunos virus inhibidores de apoptosis tienen como molécula blanco a survivina, por ejemplo, la proteína HBX del virus de la hepatitis B, asociado con el desarrollo del carcinoma hepatocelular, interacciona con la proteína survivina, suprimiendo la apoptosis en hepatocitos. En el caso del virus del papiloma humano (VPH), que está fuertemente asociado a tumores cervicales, se ha estudiado profundamente el mecanismo oncogénico pero se sabe muy poco acerca de lo que ocurre en las primeras etapas de la infección, es decir, en lesiones primarias, por lo que hemos estudiado que efecto tiene la infección de VPH en tejido cervical humano en relación a la proteína survivina utilizando biopsias de cérvix humano sano e infectado por VPH. La presencia del VPH fue determinada mediante PCR utilizando los oligonucleótidos MY09-MY11. Mediante inmunohistoquímica observamos la presencia de survivina en 53.19 % de las muestras de tejido infectado por VPH y 29.41% de muestras sanas. El 100% de las muestras infectadas y positivas a la presencia de survivina se observó una tinción en regiones semejantes tanto para la survivina como para VPH. La tinción para survivina fue específicamente nuclear en tejido infectado por VPH, mientras que en líneas celulares derivadas de tumores presentó una localización heterogénea. Se estudió también si la proteína era activa

(fosforilación Thr³⁴) observándose que en el 100% de muestras la proteína se encontró en su forma activa. Interesantemente, el análisis de retrotranscripción (RT-PCR) del gen de survivina demostró que la expresión de survivina no es alterada por la presencia de VPH. En conclusión, existe una asociación de la presencia y fosforilación de survivina con el VPH en etapas tempranas de la infección, sin embargo, el virus no altera el nivel de transcripción de la survivina.

ABSTRACT

The survivin protein belongs to the family of inhibiting proteins of apoptosis (IAP) and its active form is phosphorylated in treonina remainder 34. Some virus inhibiting of apoptosis has like white molecule to survivin, for example, protein HBX of the virus of hepatitis B, associated with the development of the carcinoma to hepatocellular, interacts with the survivin protein, suppressing the apoptosis in hepatocytes. In the case of the human papilloma virus (HPV), that is strongly associate to cervical tumors, the oncogenic mechanism has studied deeply but it is known very little about which it happens in the first stages of the infection, that is to say, in primary injuries, reason why we have studied that effect has the infection of HPV in human cervical weave in relationship to the survivin protein using biopsies of human cervix healthy and infected by HPV. The presence of the VPH was determined by means of PCR using the oligonucleotids MY09-MY11. By immunohistochemistry we observed the presence of survivin in 53.19% of the weave samples infected by VPH and 29,41% of healthy samples. The 100% of the samples infected and positive to the survivin presence. I am as much observed a tint in similar regions for the survivin as for HPV. The tint for survivin was specifically nuclear in weave infected by HPV, whereas in cellular lines derived from tumors it presented/displayed a heterogenous location. One also studied if the protein were active (phosphorylation Thr³⁴) being observed that in the 100% of

samples protein one was in its active form. Interestingly, the analysis of retrotranscription (RT-PCR) of the survivin gene demonstrated that the survivin expression is not altered by the HPV presence. In conclusion, an association of the presence exists and phosphorylation of survivin with the HPV in early stages of the infection, nevertheless, the virus does not alter the level of transcription of the survivin.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 APOPTOSIS

La coordinación entre proliferación y muerte celular es crucial para el desarrollo normal y homeostasis de los tejidos en el adulto ¹. La apoptosis o muerte celular programada es de importancia fundamental en varios procesos biológicos, incluyendo el recambio celular normal, funcionamiento del sistema inmune, el desarrollo embrionario, la metamorfosis ^{2,3} y para remover células dañadas por mutaciones deletereas o infectadas por microorganismos. La apoptosis también es considerada como un mecanismo de defensa contra patógenos como los virus ⁴.

La sobrerregulación de la apoptosis contribuye a desórdenes neurológicos, mientras que la supresión de la misma causa enfermedades autoinmunes y contribuye en el desarrollo del cáncer ^{5,6}.

La apoptosis es una forma activa de muerte celular ^{63,64} que juega un papel crucial en condiciones fisiológicas y patológicas y puede ser iniciada por diferentes vías, conocidas como vía extrínseca, vía intrínseca y mediada por linfocitos.

Los inductores de apoptosis son relativamente diversos e incluyen factores de muerte tales como FasL (ligando Fas), TNF (factor de necrosis tumoral), y TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF), factor de crecimiento, agentes genotóxicos, tales como drogas anti-cáncer, radiación gamma (γ), o bien, estrés oxidativo.

Una vez que el estímulo apoptótico se presenta, se induce la activación de caspasas para formar complejos heterotriméricos con moléculas accesorias de receptores de muerte como adaptadores (Ced4/Apaf-1 y citocromo c).

En forma general, el proceso apoptótico activado por cualquier vía culmina con la fragmentación del DNA. Esta fragmentación es mediada por la proteína CAD (DNAsa activada por caspasa) ó DFF (factor fragmentador de ADN).

CAD es una proteína de 40 kDa y en células no apoptóticas está unida a un factor que inhibe su actividad (ICAD, factor inhibidor de CAD), el cual es una proteína de 35 kDa.

ICAD contiene dos sitios de reconocimiento para caspasa 3. Caspasa 3 se ancla a ICAD y reduce su afinidad de unión a CAD, con lo cual, se elimina la actividad inhibitoria para CAD. Caspasa 7 también se ancla a ICAD (fig. 1).

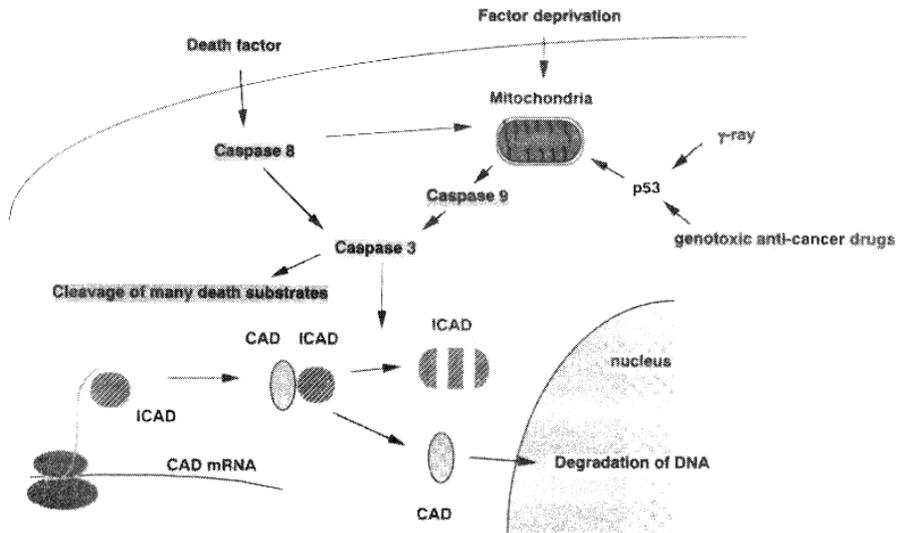


Fig. 1. Esquema representativo de la fragmentación de ADN dependiente de CAD. Cuando CAD es sintetizada en ribosomas, ICAD se une a la cadena nascente de CAD. Después de que la síntesis es completada, ICAD permanece en complejo con CAD. Durante la apoptosis la caspasa 3 es activada. Esta se ancla a ICAD para liberar CAD, la cual promueve la degradación del ADN cromosomal. CAD requiere Mg para su actividad de DNAsa y funciona con un pH neutro. Adaptado de Shigekazu Nagata. *Experimental Cell Research* 2000;256:12-18.

1.1.1. VÍA EXTRÍNSECA

Esta vía involucra señales de transducción a través de receptores de muerte celular, como el receptor para TNF (factor de necrosis tumoral). Para ello se requiere la unión de un ligando al receptor de muerte celular de la superficie celular.

En la membrana plasmática de muchas células están los receptores de muerte, los cuales, activados por su correspondiente ligando de muerte, inician una activación rápida de caspasas y la inducción de apoptosis. Los receptores de muerte son miembros de la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNF). Estos poseen dominios extracelulares ricos en cisteína y una secuencia citoplásmica intracelular conocida como dominio de muerte (DD). Los receptores de muerte mejor conocidos son CD95/Fas/Apo1, TNFR1, TNFR2, DR3/Ws1-1/Tramp, DR4/TRAIL-R1 (ligando del receptor 1 inductor de apoptosis relacionado a TNF), DR5/TRAIL-R2/TRICK2/Killer, y DR6. La activación de estos receptores con su ligando o con anticuerpos agonistas genera la trimerización del receptor y el reclutamiento de proteínas adaptadoras ⁷⁸.

Por ejemplo, cuando el ligando de CD95 (CD95L) interactúa con el receptor, este se trimeriza y con ello se agrupan los dominios citosólicos DD y reclutan a la molécula adaptadora FADD (dominio de muerte asociado a Fas, también llamado Mort1). FADD contiene un DD en su extremo carboxilo terminal el cual permite su unión al receptor CD95 trimerizado a través de interacciones DD-DD, por otro lado, en el extremo amino terminal se encuentra el dominio DED (dominio efector de muerte), dicho dominio se asocia con DEDs similares localizados en el predominio de caspasa 8. Este complejo de proteínas es llamado DISC (complejo señalizador inductor de muerte), y se ha propuesto que más moléculas de procaspasa 8 son reclutadas por este complejo, con lo que se induce la transcatalisis para generar caspasas 8 activas. Interesantemente, la activación de caspasa 8 puede ser inhibida por proteínas FLICE o

FLIPs^{79,80}. Algo similar ocurre cuando el estímulo se da a través del receptor TNFR1 o TRAIL (fig. 2).

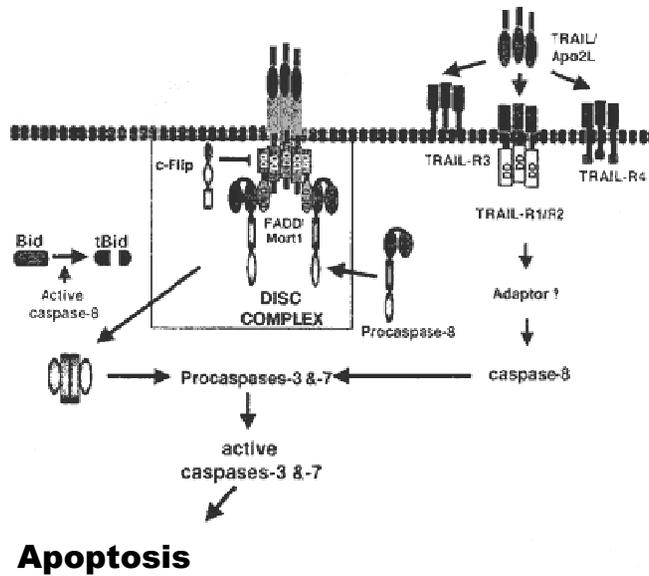


Fig. 2 Vía extrínseca de apoptosis. La unión del ligando a un receptor de muerte, como CD95 y TNFR1, induce la trimerización de estos, lo que a su vez provoca el reclutamiento de varias proteínas adaptadoras a través de interacciones hemofílicas con DD, entre ellas FADD, el cual se une directamente al promotor de activación transcatalítica de caspasa 8. La caspasa 8 activa posteriormente a las caspasas efectoras para el desarrollo de la apoptosis. Adaptado de: Bratton *et. al. Experimental Cell Research* 2000;256:27-33.

1.1.2. VÍA INTRÍNSECA

En esta vía la apoptosis es inducida generalmente por estrés, un número de señales celulares inducen perturbaciones en la mitocondria dando como resultado la liberación de moléculas proapoptóticas, incluyendo AIR (factor inductor apoptosis) y citocromo *c*, del espacio intermembranal dentro del citoplasma⁸¹. El citocromo *c* interactúa con Apaf-1, dATP/ATP y procaspasa 9 para formar un complejo conocido como “apoptosoma” (fig 3). Apaf-1 es una proteína de 130 kDa con un dominio CARD (dominio reclutador de caspasa) en el extremo amino terminal. En un mecanismo no conocido claramente, citocromo *c* y dATP/ATP actúan como cofactores y estimulan la oligomerización de Apaf-1. Procaspasa 9 se une al dominio CARD de Apaf-1, el cual permite que se inicie la activación transcatalítica de la caspasa zimógeno. Una vez activada, caspasa 9 puede activar a las caspasa 3 y 7^{81, 82, 83}. La liberación de citocromo *c* puede ser inducida también por las proteínas proapoptóticas Bid o Bax (fig. 4).

Primera etapa, formación del apoptosoma

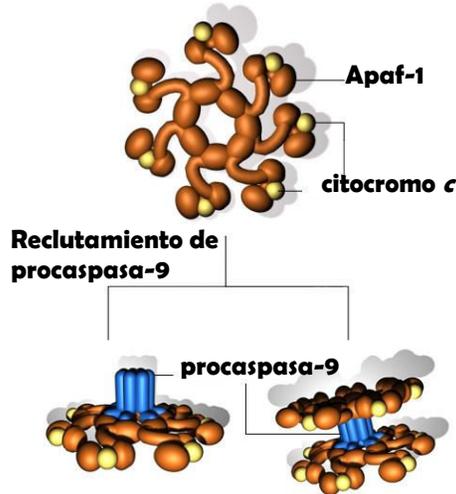


Fig. 3. Representación esquemática de la formación del apoptosoma.

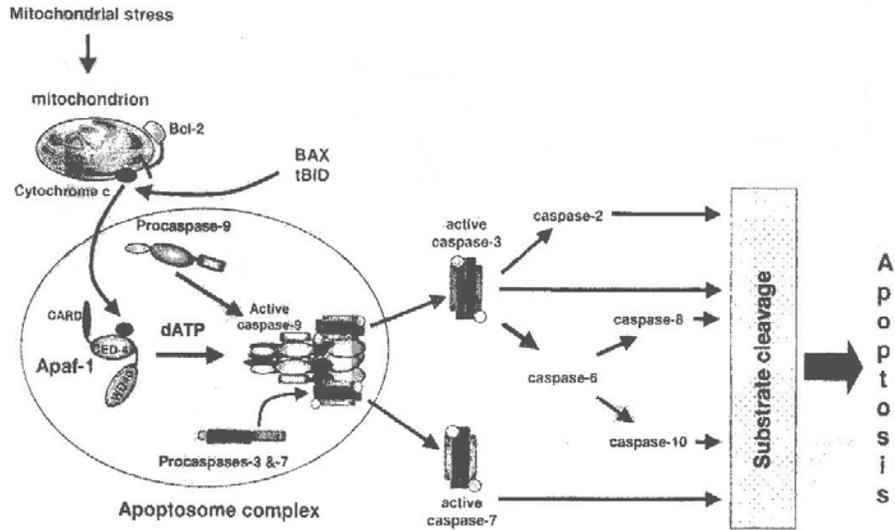


Fig. 4. Apoptosis mediada por estrés (vía intrínseca). El estrés mitocondrial y/o proteínas proapoptóticas Bcl-2 (ej. Bid o Bax) induce la liberación de citocromo c en el citoplasma. El citocromo c induce un cambio conformacional en Apaf-1 dependiente de dATP que permite que se oligomericen en un complejo de 700 kDa aproximadamente, capaz de reclutar y activar a caspasa 9, 3 y 7. Adaptado de: Bratton. *Experimental Cell Research* 2000;256:27-33.

1.1.3. APOPTOSIS MEDIADA POR LINFOCITOS

El mecanismo de citólisis mediada por linfocitos NK es similar al de los linfocitos T citotóxicos. Ambos, tienen gránulos que contienen una proteína denominada perforina, que crea poros en las membranas de las células blanco, y enzimas conocidas como granzimas, que entran en los poros de las perforinas e inducen la apoptosis en las células blanco.

Cuando los receptores antigénicos de los linfocitos reconocen los péptidos asociados al MHC en las células blanco, el citoesqueleto de los linfocitos se reorganiza de modo que el centro que organiza los microtúbulos del linfocito se mueve hacia el área del citoplasma más cercana al contacto con la célula blanco. Los gránulos citoplásmicos del linfocito se concentran en esta misma región y la membrana de los gránulos se une a la membrana plasmática. La fusión de las membranas da lugar a una exocitosis del contenido de los gránulos del linfocito sobre la superficie de la célula diana (fig.5).

Las dos proteínas de los gránulos más importantes para la función letal de los linfocitos son perforina y granzima.

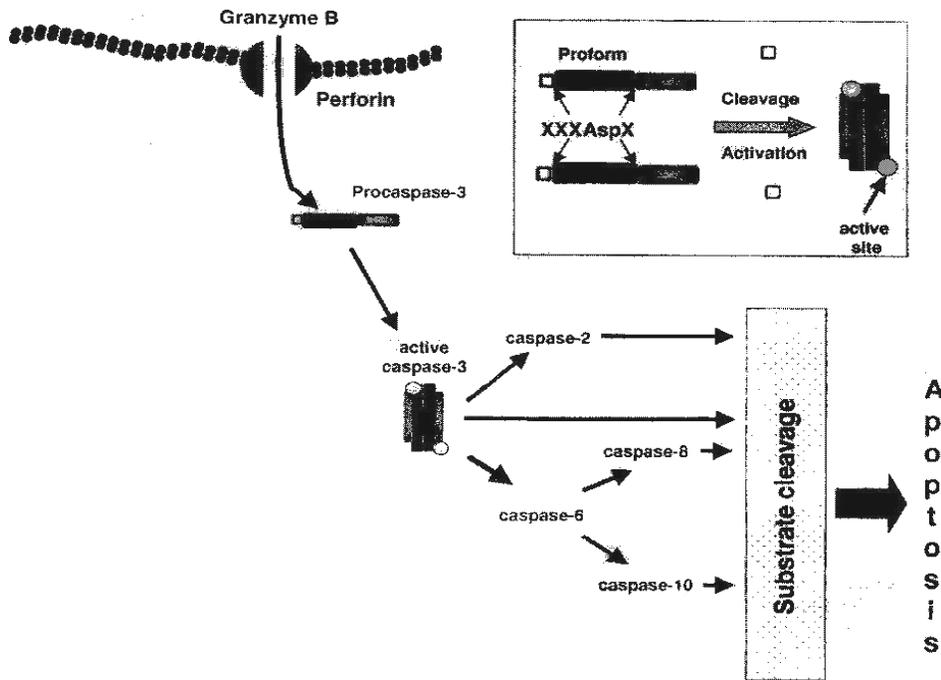


Fig. 5. Apoptosis mediada por linfocitos. Una vez reconocida la célula blanco, el linfocito excita a monómeros de perforina, que al polimerizar producen la formación de poros en la membrana por donde el linfocito introduce granzima, que activa la cascada apoptótica mediada por caspasa 3 en la célula blanco, produciendo muerte celular por apoptosis. Adaptado de: Bratton. *Experimental Cell Research* 2000;256:27-33.

La perforina es un proteína que forma poros y que está presente en forma de monómero en los gránulos del linfocito. Cuando se excita de los gránulos, el monómero de perforina se pone en contacto con concentraciones extracelulares altas de calcio y se polimeriza. La polimerización de la perforina tiene lugar en forma preferente en la bicapa lipídica de la membrana de la célula blanco, donde la perforina polimerizada forma un canal acuoso. Las granzimas son proteasas de serina que penetran en la célula blanco a través de estos canales (Fig. 6). La granzima rompe

proteolíticamente y, por tanto, activa las enzimas celulares denominadas caspasas, que a su vez escinden varios sustratos e inducen la apoptosis de la célula blanco (fig. 6). Por otro lado los linfocitos activados expresan el ligando FasL el cual se une a al receptor Fas en la superficie de las células blanco e induce apoptosis ⁹⁰.

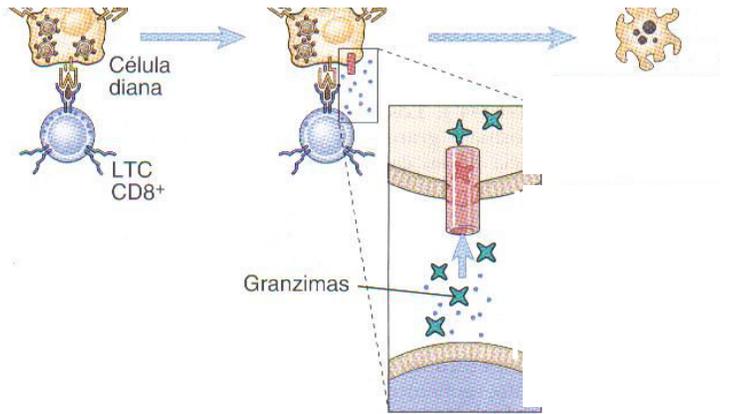


Fig. 6 Mecanismo de lisis mediada por linfocitos los cuales excitan perforina la cual polimeriza en la membrana de la célula blanco y granzima que penetra en las células blanco y activa a la procaspasa 3 induciendo la apoptosis. Adaptado de: Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. *Inmunología celular y molecular*. 2004. 5ª ed. Ed. SAUNDERS Cap. 13 Mecanismos efectores de la inmortalidad celular pag. 315.

El proceso apoptótico es regulado por una amplia serie de moléculas y cascadas de señalización que culminan con la muerte de la célula. Dentro de las moléculas involucradas en la ejecución se encuentran las **caspasas**, una familia de proteasas de cisteína que se anclan o pegan en residuos de aspartato de su sustrato, de ahí su nombre ⁷.

Las caspasas involucradas en apoptosis se dividen en dos categorías, las **caspasas iniciadoras**, las cuales incluyen a las caspasas -2, -8, -9 y -10, y las **caspasas efectoras** como caspasa-3, -6 y -7. Las caspasas iniciadoras se caracterizan por presentar un largo prodominio N-terminal (>90 aminoácidos), mientras que las caspasas efectoras contienen 20-30 residuos en su secuencia prodomino. Todas las caspasas son producidas en las células como zimógenos catalíticamente inactivos con dos subunidades (una larga y una pequeña) y tienen que sufrir una activación proteolítica durante la apoptosis. La activación de una caspasa efectora (tal como caspasa-3 o -7) es ejecutado por una caspasa iniciadora (tal como caspasa-9) a través del anclaje del residuo de aspartato específico que separa la subunidad larga y la pequeña (fig. 7). Las caspasas iniciadoras, sin embargo, son autoactivadas. La activación de una caspasa iniciadora dispara inevitablemente una cascada de activación de caspasas río abajo, este proceso está fuertemente regulado y muchas veces requiere del ensamblaje de complejos multicomponentes bajo condiciones apoptóticas⁷.

A pesar de que las caspasas juegan un papel central en la implementación de la apoptosis, las células pueden sufrir apoptosis sin la activación de caspasas. Un mecanismo independiente de caspasas involucra la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF) de la mitocondria el cual es translocado al núcleo para activar la condensación nuclear^{72, 73}.

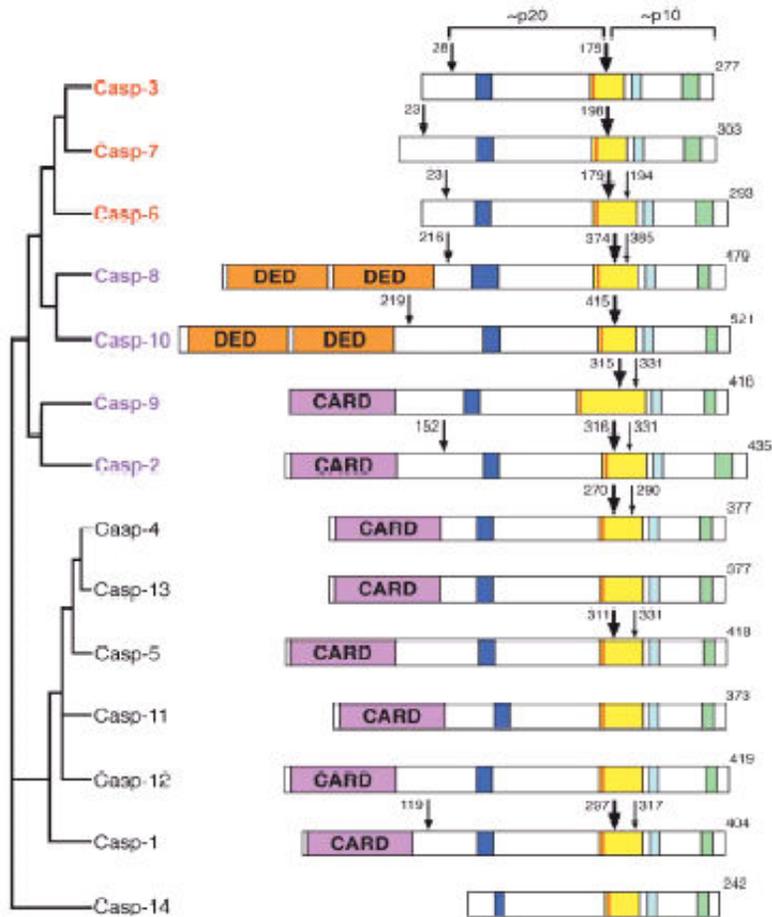


Fig. 7 Diagrama esquemático de las caspasas. Todas las caspasas listadas son de origen humano, excepto caspasa-11 y -12 (ratón), y caspasa-13 (bovina). Las caspasas iniciadoras y efectoras están marcadas en morado y rojo, respectivamente. La posición de la activación (entre la subunidad larga y pequeña) es señalada con una flecha gruesa, mientras que el sitio de anclaje es representado por medio de una flecha delgada. El residuo catalítico de cisteína se muestra con una línea roja²⁶. Adaptado de: Yigong Shi. "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis" *Molecular Cell*, 2002;9:459-470.

1.2 REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS

El proceso apoptótico está altamente regulado. Se han definido diferentes proteínas tanto pro-apoptóticas, es decir aquellas que permiten o aceleran la apoptosis, como anti-apoptóticas que previenen a la célula de este proceso.

Las proteínas que regulan la apoptosis pueden aumentar o disminuir sus niveles, su estado de activación o localización celular durante la apoptosis. Estas incluyen miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (tabla 1) y la proteína p53, las cuales orquestan la respuesta de la célula al daño en el ADN. Bcl-2 suprime la apoptosis y promueve la supervivencia y su expresión disminuye durante la apoptosis en muchos sistemas celulares. Otros miembros de la familia de proteínas Bcl-2, conocidos como Bax y Bak promueven la apoptosis y su concentración se incrementa durante la inducción de apoptosis.

Los niveles de p53 también incrementan siguiendo el daño al ADN celular y, esta molécula puede inducir el arresto del ciclo celular o bien apoptosis mediante la regulación de la expresión de genes específicos en la célula.

Proteínas de la familia de Bcl-2	
FUNCIÓN	ORIGEN
ANTI-APOPTÓTICAS	Mamífero Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, BAG1, Bfl-1, Boo
	Viral E1B-19kD, BHRF-1, KSBCL-2
	<i>C. elegans</i> CED-9
PRO-APOPTÓTICAS	Mamífero Bax, Bak, Bik, Bok, Bad, Harakiri, Bcl-Xs
	<i>C. elegans</i> Egl-1
	<i>Drosophila</i> dBorg-1

Tabla 1. Ejemplos de proteínas pro y anti-apoptóticas de diferente origen ⁷⁴.

Recientes estudios han revelado la existencia de un mecanismo conservado de activación e inhibición de caspasas. En este contexto, se ha identificado una familia de proteínas involucradas en la inhibición de caspasas (proteínas inhibidoras de apoptosis o IAP's) ¹¹. Estas proteínas fueron identificadas primeramente como productos virales usados por baculovirus para inhibir la apoptosis defensiva de las células hospederas y así permitir que el virus tenga más tiempo para replicarse ^{45, 46}.

Estas proteínas se caracterizan por tener uno o más motivos de “dedos de zinc” (zinc-finger) y terminaciones tipo BIR (repeticiones IAP de baculovirus), por lo que también son conocidas como proteínas BIRC (proteínas que contienen terminaciones BIR) (fig. 8) ⁴⁷. Una subfamilia de las proteínas BIR que son estructuralmente distintas han sido identificadas en levaduras, invertebrados y vertebrados. Estas incluyen a la proteína de mamíferos BIRC5 (también conocida como survivina) ⁴⁸.

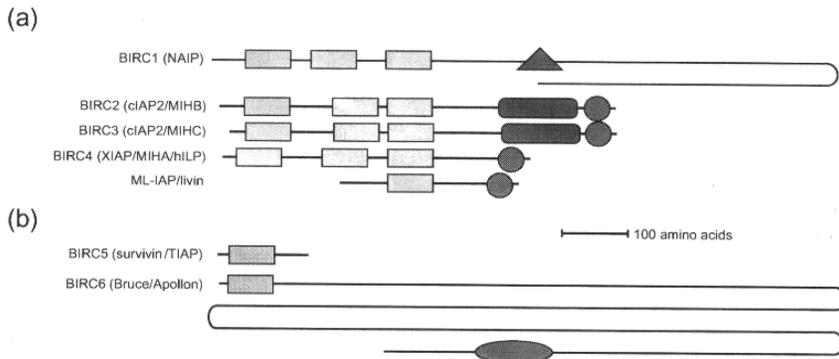


Fig. 8. Proteínas que contienen el dominio BIR humano. Las proteínas que contienen el dominio BIR son agrupadas de acuerdo a su estructura o la función que llevan a cabo. a) Implicadas en la regulación de apoptosis y b) las que parecen tener función en el ciclo celular. Las cajas amarillas representan los dominios BIR. Los círculos morados representan los dominios RING-FINGER. Los óvalos rojos representan los dominio tipo CARD (dominio reclutador de caspasas) que algunas proteínas presentan. Los triángulos verdes representan loops de unión a nucleótidos. Las dos proteínas que son estructuralmente distintas a las proteínas BIRC, la más pequeña y la más larga que contienen dominio BIR, el óvalo azul representa un dominio conjugante de ubiquitina. Las proteínas BIRC de levaduras y *C. elegans*, y la proteína deterina de *Drosophila*, tienen estructuras semejantes a BIRC5 y BIRC6 ^{49, 50}.

Como se mencionó anteriormente, las IAP's, fueron originalmente identificadas en el baculovirus basadas en su capacidad para suprimir la apoptosis en células hospederas infectadas, antagonizando la muerte celular inhibiendo la actividad enzimática de las caspasas maduras.

La unidad funcional en las IAP's es la repetición IAP de baculovirus (BIR), la cual contiene alrededor de 80 aminoácidos plegados alrededor de un átomo de zinc.

Análisis estructurales revelan el mecanismo de inhibición de caspasa-3 y -7 mediado por IAP. El péptido N-terminal de XIAP-BIR2 forma una interacción muy similar tanto con caspasa-3 como con la caspasa-7. Comparado con péptidos inhibidores covalentes, el segmento de XIAP que se une a las caspasas, ocupa el sitio activo de éstas en una orientación reversa, resultando un bloqueo de la entrada del sustrato (fig. 9).

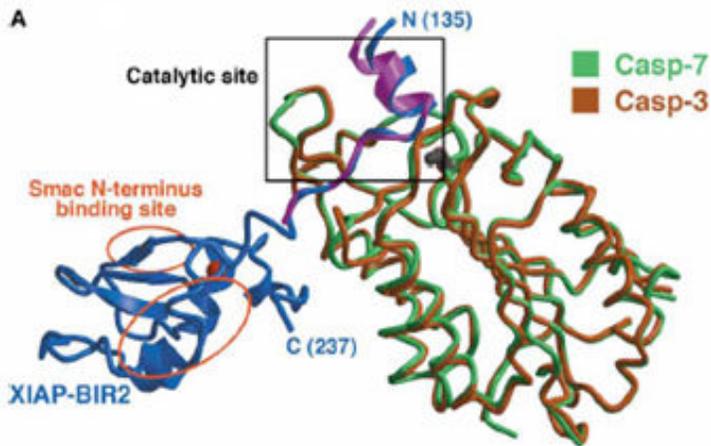


Fig. 9 Sobreposición de la estructura de caspasa-3 (café) y caspasa-7 (verde) junto con su unión al fragmento IAP (azul y rosa respectivamente) La interacción primeramente ocurre entre el segmento N-terminal del dominio BIR2 de XIAP y el sitio activo de caspasa-3 o -7 (marco). Adaptado de: Yigong Shi. "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis" *Moleculr Cell*. 2002;9:459-470.

1.3 SURVIVINA

Como se mencionó anteriormente, la proteína survivina fue detectada primeramente en baculovirus. Dentro de sus características principales, se ha reportado que survivina tiene un peso aproximado de 16.5 kDa y está conformada por 142 aminoácidos, por lo que es catalogada como la más pequeña dentro del grupo de las IAP's, conteniendo únicamente un dominio BIR simple y una cola carboxilo terminal en α -hélice. El análisis de cristalografía de rayos X de survivina humana^{55, 56} o de ratón⁵⁷ mostró que la proteína está organizada en homodímeros estables, una configuración que es probablemente común en otras proteínas IAP como XIAP⁵⁷ (fig. 10).

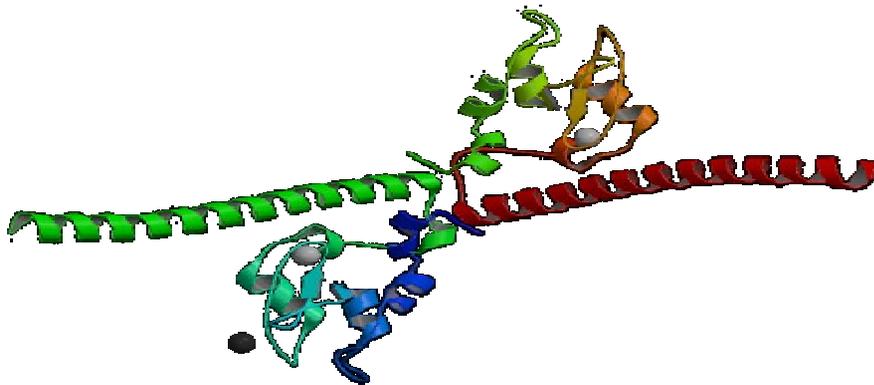


Fig. 10. Representación de la proteína survivina en su conformación más estable de homodímero. Adaptado de Verdecia, et. al. "Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement". *Nature*. 2000;602-608.

Una copia del gen de *survivina* puede generar tres transcritos por splicing alternativo. Además del gen que codifica para la proteína *survivina* silvestre, el cual exhibe una estructura de 4-intrones-4 exones en el genoma humano ⁵¹ y de ratón ⁵², existen también dos isoformas de *survivina* que son generadas por la inserción de un exón 2 alternativo (*survivina-2B*) o la remoción del exón 3 (*surv-ΔEx3*). En estudios de sobreexpresión, *surv-ΔEx3* muestra una acumulación nuclear selectiva que podría involucrar una localización nuclear bipartita, señal que está incluida en el nuevo carboxilo terminal ⁵³. Otra característica única en *surv-ΔEx3* ha sido también identificada, incluyendo una señal de localización mitocondrial y un dominio BH2 (fig. 11), Una proteína *surv-ΔEx3* homóloga que fue también identificada en el virus del herpes simple (HSV). *Survivina-ΔEx3* se localiza en la mitocondria e inhibe la apoptosis por asociación con Bcl-2 y por supresión de la actividad de caspasa-3 por un mecanismo dependiente del dominio BIR ^{54, 94, 95}.

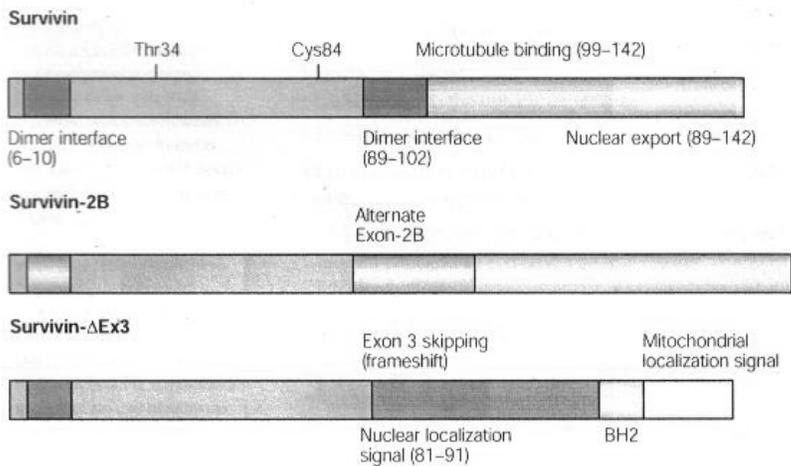


Fig. 11. Estructura-función de la proteína *survivina* generada por splicing alternativo. Organización de *survivina* y sus variantes de splicing alternativo, involucran la inserción alternativa de un exón (*survivina-2B*) o deleción del exón 3 (*surv-ΔEx3*). Regiones discretas implicadas en la dimerización, unión al microtúbulo, localización nuclear, exportación y blanco subcelular en mitocondria son indicados. Adaptado de: Altieri, Ano “Validating *Survivin* as a cancer therapeutic target”. *Nature*. 2003;3:46-51.

Esta proteína ha causado gran controversia, ya que por un lado, ha sido demostrado que survivina inhibe a las caspasas 3 y 7 previniendo el programa de muerte celular ¹². ¹³. Sin embargo, en carcinomas humanos se ha observado una prominente sobreexpresión de survivina. En tejidos cancerosos la sobreexpresión de survivina es acompañada por la desregulación de caspasa 3; esto indica que los cambios en los niveles de éstas juegan un papel importante en la transformación de un tejido normal en uno canceroso, y sugiere además una gran relación entre ellas ¹⁵. Por otro lado, survivina ha sido asociada con la citoprotección y preservación de la integridad del microtúbulo ¹⁶, y su expresión en células malignas puede facilitar la evasión de la apoptosis y promover una progresión mitótica aberrante ¹⁷, además de que cambios en la estabilidad de la proteína pueden contribuir a una acumulación de survivina en mitosis ⁵⁷.

En este contexto, estudios recientes han demostrado que la actividad supresora de la apoptosis así como los niveles de survivina en las células están reguladas a través de la fosforilación de residuos de treonina (Thr) de la proteína. Se ha encontrado que el residuo de treonina 34 (Thr³⁴) de survivina es fosforilada por la cinasa dependiente de ciclina cdc2 ¹⁸, y que la inhibición de la actividad de cdc2 está asociada con un decremento progresivo en los niveles de survivina celular. Así mismo, la inhibición de la fosforilación en Thr³⁴ de survivina, induce la activación de la apoptosis mediada por caspasa 9, y permite la eliminación de células tumorales por apoptosis. Por otro lado, recientes estudios han demostrado otro punto de regulación en la actividad de survivina, el cual está dado por la fosforilación del residuo 117 de treonina (Thr¹¹⁷), sin embargo esta modificación está asociada al alineamiento de cromosomas en la metafase, función del huso mitótico y citocinesis. Dicha fosforilación es llevada a cabo por la cinasa AuroraB. Una vez fosforilada la proteína survivina (Thr¹¹⁷) se forma un complejo con AuroraB y la proteína interna del centrómero (INCEP) permitiendo así la progresión del ciclo celular.

1.4 VIRUS Y APOPTOSIS

Como se mencionó anteriormente, la apoptosis es utilizada en algunos casos como un mecanismo de defensa para eliminar células que han sido infectadas por microorganismos. Sin embargo, en el caso de los virus se ha observado que éstos son capaces de incidir en el proceso apoptótico de diversas maneras. De tal forma, se ha reportado que algunos virus codifican para proteínas que inducen la muerte celular del hospedero una vez que ellos se han replicado, se ha descubierto que estas proteínas pro-apoptóticas tienen un importante papel en la reproducción viral. Como ejemplo de estas proteínas se encuentra E1a de adenovirus⁸, apoptina del virus de anemia del pollo⁹ y proteína tax del HTLV-1¹⁰. Por otro lado, se ha encontrado que algunos virus también codifican para proteínas que específicamente tienen como objetivo inhibir la apoptosis entre estas se incluyen inhibidores de caspasas, proteínas semejantes a Bcl-2, inhibidores de p53, inhibidores de la expresión de MHC e inhibidores de vías de señalización activadas por infecciones virales. Dentro de los virus que tienen la capacidad de inhibir la apoptosis tenemos como ejemplo el virus del herpes (*herpesvirus*) y el virus de la viruela bovino (*cowpox*)²⁷.

Reportes recientes indican que algunos virus inhibidores de la apoptosis, tienen como molécula blanco a la survivina. Zhu y colaboradores (2003), demostraron que el VIH-1 induce un incremento en la transcripción del gen de la survivina, bloqueando así la apoptosis de las células infectadas. Por otro lado se descubrió que la proteína HBX del virus de la hepatitis B, el cual se asocia con el desarrollo del carcinoma hepatocelular, interacciona con la proteína survivina, induciendo una supresión de la apoptosis en las células hepáticas (Marasawa et al. 2003)^{25,28}.

1.5 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El virus del papiloma humano (VPH) es miembro de la familia *Papillomaviridae*, está constituido por un virión de forma icosaédrica, no envuelto, de aproximadamente 55nm²¹. Los VPH's son virus de doble cadena de ADN de aproximadamente 8 kb que infectan el estrato basal del epitelio. El genoma del VPH puede ser dividido en regiones tempranas (E) y tardías (L) conteniendo 7 marcos de lectura abiertos (ORF's) tempranos y 2 tardíos y una región no codificante referida como región regulatoria río arriba (LCR) (fig. 12).

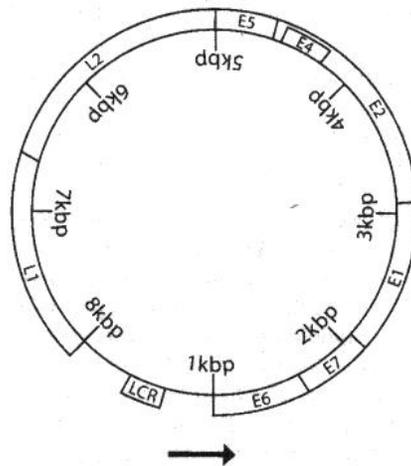


Fig. 12. Representación esquemática del genoma de ADN circular del virus del papiloma humano. Adaptado de: Burd Hielen M. "Human Papillomavirus and cervical cancer". *Clinical Microbiology Reviews*. 2003;1-17.

Los productos de los genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) median funciones específicas que controlan la replicación viral y, en el caso de virus oncogénicos, la transformación celular. Por otro lado, los productos de los genes tardíos (L1 y L2) conforman la cápside viral.

El gen E1 está involucrado con la replicación viral y el mantenimiento del genoma ⁵⁸. El gen E2 es un regulador transcripcional ⁵⁹ y está involucrado con la replicación del ADN viral. El gen E4 codifica para varias proteínas que rompen el sistema citoplásmico de keratina ⁸⁵, proceso conocido como koilocitosis. El gen E5 participa en la transformación celular por su interacción con receptores de factor de crecimiento de la membrana celular ⁶¹. Las proteínas E6 y E7 de los VPH's de alto riesgo actúan como oncoproteínas virales. E6 se une a la proteína supresora de tumor p53 como parte de un complejo trimérico con ligasa celular de ubiquitina, E6AP, induciendo así la rápida degradación de p53 ^{76, 77}. E7 se une a Rb (proteína supresora de tumor), así como a otras proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular ^{78, 79}. Finalmente, los ORF's L1 y L2 codifican para proteínas de la envoltura viral y son activadas hacia las etapas finales del ciclo viral ⁶².

Los VPH's han sido detectados en una gran variedad de animales así como en humanos y son específicos de su respectivo hospedero. Más de 200 tipos de VPH's han sido reconocidos con base en datos de su secuencia de ADN ³⁹. El VPH forma parte de un grupo de virus de DNA que induce verrugas (o papilomas) en una variedad de vertebrados superiores, incluyendo humanos ²¹. Estos virus han sido divididos en tipos cutáneos y mucosos. Los tipos cutáneos de VPH son epidermotróficos y atacan la piel de las manos y pies. Los tipos mucosos infectan el recubrimiento de la boca, garganta, tracto respiratorio, y epitelio anogenital. Basados en su asociación con cáncer cervical y lesiones precursoras, los VPH's pueden ser también agrupados en tipos de alto y bajo riesgo. Los VPH's de bajo riesgo incluyen los tipos 6, 11, 42, 43 y 44 y producen verrugas genitales benignas ⁸⁰. Los VPH's de alto riesgo incluyen los tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70 y están asociados con el desarrollo de cáncer anogenital, incluyéndose el cérvix ⁸⁰. Incluidos en los tipos de alto riesgo están algunos tipos que se encuentran menos frecuentemente en cáncer pero son encontrados en lesiones escamosas intraepiteliales (SIL's). Algunos autores refieren a estos tipos de VPH como de riesgo intermedio ³⁹.

La infección por VPH se dá a través de la unión a receptores en la superficie celular, se ha propuesto que el receptor principal para el VPH tipo 16, es la molécula α_6 -integrina que es un receptor de membrana para matriz extracelular ²³, mientras que el heparán sulfato ha sido propuesto como un co-receptor para el VPH, por ser un requerimiento para la infección del virus. ²⁴.

Los VPH's replican su genoma dentro del núcleo de las células hospederas. El ciclo de vida del VPH está ligado al programa de diferenciación de la célula hospedera infectada, el keratinocito, con la producción de partículas virales maduras restringido a las células suprabasales. Se ha propuesto que la infección por VPH se da a través de microheridas en el epitelio que expone a las células en la capa basal (fig. 13).

El ciclo de vida del VPH está estrechamente ligado al estado de diferenciación de su célula blanco, en el tejido epitelial. La infección ocurre cuando el genoma viral se establece como epitoma y es replicado en sincronía con el ADN cromosomal. Siguiendo la división celular, una de las células “hijas” infectada migra hacia de la capa basal y comienza a diferenciarse, dando como consecuencia la activación de la expresión de genes latentes, la amplificación del genoma viral y el ensamblaje del virion (fig. 12) ⁹¹.

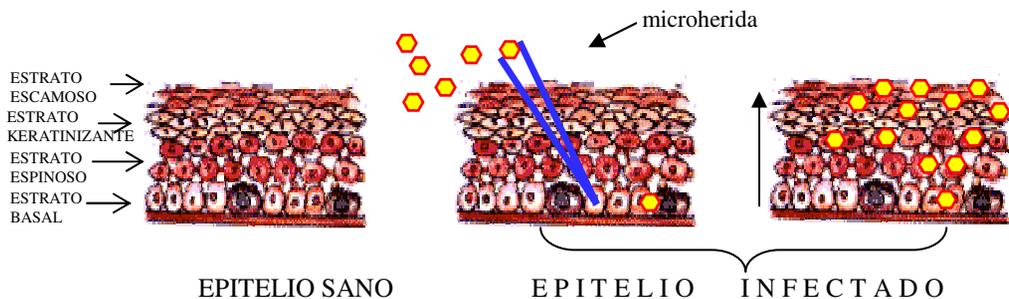


Fig. 13. Representación esquemática del proceso infeccioso del virus del papiloma humano (VPH). Nótese que la entrada del virus se da por una microherida, necesaria para que el virus penetre hasta las células basales del epitelio para poder ocupar la maquinaria de replicación de dichas células y expandir la infección de manera ascendente hacia la capa suprabasal.

En el caso de VPH se ha estudiado profundamente el mecanismo oncogénico que lo caracteriza, sin embargo se sabe muy poco acerca de los mecanismos que el virus utiliza para infectar a la célula, así como los efectos que causa la infección en el metabolismo de dicha célula.

1.6 SURVIVINA Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Es bien conocido que la proteína survivina se sobreexpresa en tumores humanos, entre los que se encuentran aquellos asociados al VPH. Sin embargo, aún se desconoce si existe una asociación entre la survivina y la infección por VPH, ya que, los datos reportados hasta el momento son controversiales. De tal forma, Frost y colaboradores realizaron un estudio de la presencia de survivina en tejido cervical sano, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo (LSIL) y alto grado (HSIL) y carcinomas de células escamosas. Utilizando técnicas de inmunohistoquímica, observaron una intensidad mayor de tinción para survivina en las lesiones avanzadas, comparada con la detectada en los LSIL y tejido normal. Así mismo encontraron que en las lesiones avanzadas la survivina se encontraba básicamente localizada en el núcleo, mientras que, en el tejido sano se observó localizada en el citoplasma. Interesantemente al realizar una hibridación in situ en cortes seriado de tejido, se demostró una co-localización del ADN del VPH y survivina. Contrariamente a lo observado por Frost. Et. Al. Lanham y colaboradores reportaron que no existe diferencia en la expresión de survivina entre neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) 0/1 y NIV 2/3.

Por otro lado, Mutzio y colaboradores estudiaron lesiones de la mucosa oral asociadas a VPH y encontraron una frecuencia mayor de la expresión de survivina en lesiones premalignas asociadas a VPH que en aquellas que no estaban asociadas a la infección oral. Sin embargo, cuando estudiaron muestras de carcinoma de células escamosas orales (OSCC) encontraron una relación negativa entre la presencia de survivina y la de VPH.

Dado lo anterior, es claro que aún es necesario realizar más estudios para poder determinar si existe una asociación del VPH y la expresión de survivina en lesiones premalignas del cérvix uterino.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA O JUSTIFICACIÓN

Es ampliamente conocido que la proteína anti-apoptótica survivina, se sobreexpresa en un amplio número de tumores humanos entre ellos el cáncer cérvico uterino (CCU). El desarrollo de la mayoría de los tumores cérvico uterinos inicia con la infección del epitelio cervical por VPH de alto riesgo, estas lesiones primarias pueden transformarse en lesiones precursoras (pre malignas), que eventualmente pueden dar origen a un tumor. La sobreexpresión de survivina ha sido documentada en los tumores cervicales, sin embargo, no se conoce si esta proteína anti-apoptótica es también expresada durante las primeras etapas del desarrollo de estos tumores.

Por otro lado se sabe, que la survivina es una molécula blanco de algunos virus humanos, entre ellos el virus de la hepatitis B el cual está asociado con el desarrollo de hepatocarcinomas.

Dado lo anterior en el presente proyecto se decidió explorar la presencia de la proteína survivina, así como su estado de fosforilación en biopsias cervicales de pacientes que se encuentran infectadas con VPH 16 y 18.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si la infección por VPH tiene efecto sobre la expresión y fosforilación de la proteína survivina,

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✧ Determinar la presencia de VPH en las biopsias cervicales mediante la amplificación del DNA viral por PCR
- ✧ Determinar “*in vivo*” si la infección con VPH correlaciona con la expresión y de la proteína survivina en biopsias cervicales humanas.
- ✧ Determinar si la survivina existente en tejido cervical humano, se encuentra en su forma activa (fosforilada).
- ✧ Comparar el patrón de expresión y fosforilación de survivina en tejido infectado por VPH y células derivadas de tumores cérvico uterinos
- ✧ Establecer si existe relación de la localización de VPH en células infectadas y aquellas que sobreexpresan survivina en su forma activa.

4. HIPÒTESIS

La proteína survivina, fosforilada en el residuo Thr³⁴, se encuentra presente en células cervicales infectadas por VPH tipo 16 y 18.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 *Material biológico.*

En el presente trabajo se estudiaron biopsias cervicales obtenidas de pacientes del Centro Nacional de Clínicas de Displasias (CENACLID) del Hospital General de México. A todas las participantes se les practicó un estudio colposcópico. Se incluyeron 54 pacientes con un diagnóstico colposcópico de infección por VPH (IVPH), de cada paciente se obtuvieron 2 biopsias de la zona con evidencia colposcópica de IVPH. Además se incluyeron 50 mujeres que no presentaron evidencia colposcópica de IVPH, en este caso se tomaron 2 biopsias de cuadrantes opuestos del cérvix sano.

Una de las biopsias obtenidas de cada participante fue colocada en formalina al 10% y embebida en parafina, para ser posteriormente utilizada en estudios inmunohistoquímicos. La otra muestra, fue colocada en un tubo conteniendo PBS estéril, transportada al laboratorio y procesada el mismo día para la obtención de DNA.

5.2 *Análisis inmunohistoquímico de biopsias cervicales.*

Las biopsias fueron fijadas en formalina al 10% y embebidas en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 5 μ m y se montaron en laminillas tratadas con poli-L-lisina.

Los cortes fueron deparafinados a 60°C durante 30 minutos; una vez transcurrido el tiempo se pasaron por xilol y se rehidrataron mediante pasajes subsecuentes en etanol al 100%, 96% y 70% por 5 minutos. El tejido fue sometido a una recuperación antigénica para desenmascarar epítomos (este fenómeno es producto de la fijación del tejido), esto se logró colocando los cortes en una solución de citrato de sodio (25 mM, pH 6) dentro de una olla de presión y calentando a presión máxima durante 10 minutos.

La actividad endógena de peroxidasa fue bloqueada con solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 10 minutos. Se lavaron los cortes con PBS y se adicionó solución bloqueadora (suero fetal bovino Gibco 2% en PBS) durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se decantó el exceso de suero. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios 1.5 hrs. a temperatura ambiente. Para el análisis de la presencia de survivina y survivina fosforilada se usaron anticuerpos policlonales (Santa Cruz Biotechnology) survivin (FL-142) y p-survivin (Thr34) respectivamente; diluidos 1:100 en PBS-BSA 1%. Por un lado, el anticuerpo survivin (FL-142) reconoce la proteína survivina humana completa (142 aminoácidos), por otro, el anticuerpo p-survivin (Thr 34) reconoce el péptido corto correspondiente a la secuencia que contiene la treonina 34 fosforilada de survivina humana.

Para la detección de virus de papiloma humano se usó un anticuerpo de conejo (ZYMED) que reconoce la proteína L1 de la cápside viral, diluido de la misma forma.

Transcurrido el tiempo se lavaron los cortes con PBS 5 minutos 3 veces y se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a biotina (ZYMED) que detecta Ig's de conejo, durante 1 hr a temperatura ambiente. Enseguida, los cortes fueron lavados nuevamente con PBS 5 minutos y se agregó la enzima peroxidasa conjugada a estreptavidina DAKO (1:100 en PBS) durante 10 minutos y se volvieron a lavar los cortes. Se adicionó el cromógeno (Histostain-DS, ZYMED) preparándolo al instante; a 1 ml de agua desionizada se adicionó una gota (30 μ l) del reactivo 6A y una gota del reactivo 6B, se mezcló perfectamente con ayuda de un vórtex y se adicionó una gota del reactivo 6C y se volvió a pasar por el vórtex hasta que se mezcló perfectamente. El cromógeno se adicionó a las muestras y se dejó actuar un lapso de 5 a 10 minutos. Posteriormente se lavaron los cortes con PBS 5 minutos y pasado este tiempo se adicionó azul de metileno para llevar a cabo la contratinción de la muestra incubando 3 minutos. Enseguida, se lavaron los cortes con agua destilada hasta quitar el exceso de colorante.

Una vez hecha la contratinción se montaron los cortes mediante la adición de 1 gota de medio de montaje (DAKO permanent mounting media) y se procedió a la observación en microscopio óptico para el análisis de las muestras.

5.3 Análisis inmunohistoquímico de líneas celulares.

Se cultivaron células HeLa (cáncer cervical humano asociado a VPH 18), CaLo (cáncer cervical humano asociado a VPH 18), Caski (cáncer cervical humano asociado a VPH 16), SiHa (cáncer cervical humano asociado a VPH 16), C33 (cáncer cervical humano negativo a la presencia de VPH) y ViBo (cáncer cervical humano negativo a la presencia de VPH).

Las células HeLa, CaLo y C33 fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (InVitro) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y antibióticos 10,000 U/ μ g/ μ l (penicilina-estreptomicina, InVitro). Las líneas Caski, SiHa y ViBo fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (InVitro) suplementado de igual forma. Todas las líneas se mantuvieron en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y humedad constante.

Se sembraron células sobre cubreobjetos, hasta que alcanzaron 90% de confluencia se sometieron al análisis inmunocitoquímico fijando las células con acetona a 4°C por 10 minutos y bloqueando la acción de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol; a partir de este punto se aplicó la técnica empleada para tejido cervical (sección 5.2).

5.4 Análisis molecular de biopsias cervicales.

5.4.1 Extracción de ADN de biopsias cervicales.

Todos los reactivos utilizados para la extracción de DNA fueron de la marca Invitrogen. Las muestras fueron lavadas con cambios de 200 μ l de PBS (Apéndice)

cada 15 minutos por un lapso de 2 hr a 4°C para eliminar residuos de sangre. Las muestras de tejido fueron posteriormente colocadas en 400 µl de buffer de lisis (Apéndice) al que se adicionaron 5 µl de proteinasa K (16.5 mg/ml) y se incubó a 55°C hasta que el tejido se había degradado completamente.

Enseguida, se centrifugaron los tubos 5 minutos a 5000 rpm y se recuperó el sobrenadante.

Se adicionó un volumen igual (aproximadamente 400 µl) de fenol:cloroformo (1:1). Se mezcló hasta que se formó una emulsión y se centrifugó a 12,000 rpm 5 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se le agregaron 400 µl de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en un vórtex y se centrifugó 10 segundos a máxima velocidad (14,000 rpm). Se recuperó la fase acuosa (hasta formarse una burbuja del sobrenadante con precaución de no tomar la fase inferior), y se adicionaron 750 µl de etanol absoluto y 53 µl de NaCl₂, se dejó precipitar 1 hr en hielo seco y se centrifugó a 4°C 15 minutos a máxima velocidad (14,000 rpm). Se decantó el sobrenadante y se secó el pellet perfectamente para resuspenderlo en 20-30 µl de agua ultra pura y se cuantificó.

5.4.2 *Cuantificación de ADN.*

La cuantificación se realizó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 260 nm. Para ello se mezcló 1 ml de agua desionizada con 4 µl de DNA. A la lectura resultante (densidad óptica OD) se le aplicó la siguiente fórmula para determinar la cantidad de DNA que se tenía en cada muestra.

$$OD_{260nm} (\text{factor de dilución}) (50) = x \text{ ng}/\mu\text{l}$$

5.4.3 *Análisis de la presencia de VPH por PCR.*

Todos los reactivos utilizados fueron de la marca Gibco BRL. El DNA del VPH fue amplificado usando los oligonucleótidos universales MY09 y MY11 que permiten la aplicación de un fragmento de aproximadamente 450 pb de longitud del gen L1 del DNA de los VPH's comprendido entre las bases 6722 y 7170 del genoma viral ³⁴. Estos segmentos son de gran homología entre 5 tipos de VPH's, entre los que se encuentran los tipos 6, 11, 16, 18 y 33. Dicha secuencia es la siguiente: 5' CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC 3' para MY09 (reverse), mientras que para MY11 (forward), es 5' GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG 3'. La temperatura de alineación para la amplificación con los oligonucleótidos MY es de 72 °C.

La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente: PCR-Buffer 10 x (2 µl), MgCl₂ 50 mM (3 µl), dNTP's 2 mM (2 µl), Taq Pol 5U/µl (0.2 µl), DNA 500 ng, y agua ultrapura (la necesaria para un volumen total de 20 µl).

Las muestras de DNA fueron desnaturalizadas a 95°C, 30 segundos. El alineamiento de los oligonucleótidos se llevó a cabo a 45°C por 30 segundos y la elongación a 72°C, 60 segundos. Los ciclos fueron repetidos 30 veces.

El producto de PCR fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Apéndice), teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un documentador de geles (FOTODYNE Visionary foto). Como control positivo se usó DNA de una biopsia previamente determinada como positiva a VPH y como control negativo, agua ultra pura en lugar de DNA.

5.4.4 *Análisis de la presencia de VPH 16 por PCR.*

La amplificación específica de VPH 16 se realizó usando los oligonucleótidos Pr3 y Pr4 que amplifican un fragmento de 499 pb correspondientes a la fracción: 5' GTC AAA AGC CAC TGT GTC CT 3' y 3' CCA TCC ATT ACA TCC CGT AC 5' de los

genes E6 y E1 del VPH 16³⁴. Se usaron los mismos reactivos y concentraciones que en la amplificación de VPH con los oligonucleótidos generales. Las muestras de DNA fueron desnaturalizadas a 95°C 30 segundos. Los oligonucleótidos fueron alineados a 57°C 60 segundos y la elongación a 72°C 60 segundos. Los ciclos fueron repetidos 30 veces y los productos de PCR fueron analizados como se ha descrito en la sección 5.4.3.

5.4.5 Análisis de la presencia de VPH 18 por PCR.

La amplificación específica de VPH 18 se realizó usando los oligonucleótidos 18LCR-F y 18LCR-R que amplifican un fragmento de 364 pb del VPH 18. Los reactivos utilizados, la desnaturalización de las muestras y el análisis de los resultados de PCR se hicieron de la forma que se define en la sección 5.4.3.

5.5 Análisis de la expresión de survivina en biopsias cervicales.

5.5.1 Extracción de ARN de biopsias cervicales.

Para la extracción de RNA fue utilizado el kit QIAGEN OneStep RT-PCR. Las muestras fueron congeladas en hielo seco inmediatamente después de haber sido disectadas. Una vez obtenido el tejido, se adicionaron 350 µl de buffer RLT -β mercaptoetanol (1:10) y se disgregó el tejido mediante un rotor homogenizador durante 30-40 segundos. Posteriormente, el lisado celular fue centrifugado a máxima velocidad 3 minutos, recuperándose el sobrenadante en un tubo nuevo. Se adicionaron 350 µl de etanol 70% y se mezcló por pipeteo, esta mezcla se colocó en una columna con membrana de silica gel y se centrifugó 15 segundos a 10,000 rpm. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se adicionó a la columna 350 µl de buffer RW1 centrifugándose nuevamente 15 segundos a 10,000 rpm para lavar la columna.

Enseguida se adicionó directamente a la membrana de la columna 80 µl de DNasa I preprada previamente (10µl DNasaI + 70µl buffer RDD, mezclandose invirtiendo el tubo). Se sometió a incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 35 µl de buffer R21 y se centrifugó 15 segundos a 10,000 rpm. Se transfirió la columna a un nuevo tubo colector y se adicionaron 500 µl de buffer RPE a la columna. Se sometió a centrifugación 15 segundos a 10,000 rpm para lavar la columna y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se adicionaron 500 µl de etanol 80% a la columna y se centrifugó 2 minutos a 10,000 rpm para lavar la membrana, se decantó el sobrenadante.

Después de este punto, se transfirió la columna a un tubo colector nuevo y se dejó abierta la tapa de la columna y se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad. Se decantó el sobrenadante.

Para eluir se transfirió la columna a nuevo tubo colector y se adicionaron 14 µl de agua libre de RNasa en el centro de la membrana y se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad.

5.5.2 *Análisis de la expresión de survivina.*

Todos los reactivos utilizados fueron de la marca QIAGEN. El RNA de survivina fue amplificado usando los oligonucleótidos SUR-F y SUR-R¹⁵, que amplifica un fragmento 338 pares de bases del transcrito para survivina humana, los cuales reconocen la secuencia 5' GGA CCA CCG CAT CTC TAC AT 3' y 5' GCA CTT TCT TCG CAG TTT CC 3' respectivamente.

Las muestras de RNA se introdujeron en un termociclador PERKIN ELMER 9600 para ser sometidas a 50°C por 30 minutos para lograr la transcripción reversa, posteriormente a una temperatura de 95°C durante 15 minutos para activar la Taq polimerasa y a su vez inactivar la transcriptasa reversa. Para la mezcla de reacción se utilizaron 2 U de Taq pol (2 µl), primer A y B 0.6 µM (1 µl respectivamente), Master

MIX (10 μ l), dNTP's 2 mM (2 μ l), Buffer RT-PCR 5x (10 μ l) y agua ultrapura para completar un volumen total de 30 μ l. Una vez obtenido el cDNA se incubaron durante 30 ciclos que consisten en: a)desnaturalización a 94°C durante 60 segundos; b)alineamiento de los oligonucleótidos a 55°C por 60 segundos; y, c)elongación a 72°C 60 segundos.

El producto de PCR fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Apéndice), teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un documentador de geles (FOTODYNE Visionary foto).

5.6 Análisis estadístico.

Para evaluar las diferencias en positividad en los grupos experimentales, los datos fueron ordenados en la forma de tablas de contingencia de 2 x 2 y analizados por la prueba exacta de Fisher. Se consideró un nivel básico de significancia de $p=0.05$

6. RESULTADOS

Se realizó un trabajo de campo para la colecta de muestras de tejido cervical. Este se llevó a cabo en el Centro Nacional de Clínica de Displasias, (CENACLID) del Hospital General de México. Se obtuvieron un total de 105 biopsias, de las cuales 54 fueron diagnosticadas colposcópicamente como infección por VPH, y 51 no presentaron evidencia colposcópica de la presencia de VPH. Cabe señalar que la población estudiada son mujeres con una edad promedio de 28 años.

6.1 Análisis molecular de la presencia de VPH de biopsias cervicales.

De cada una de las biopsias se extrajo el DNA y se analizó la presencia del VPH mediante PCR utilizando los oligonucleótidos universales MY09-MY11, los cuales amplifican un fragmento de 450 pares de bases del gen L1 que se encuentra conservado en la mayoría de VPH's conocidos. Como control positivo se utilizó el DNA de una línea celular derivada de un carcinoma cervical (SiHa), la cual es positiva a la presencia de VPH, como control negativo se sustituyó el DNA por agua ultra pura.

En la figura 1 se puede apreciar una imagen representativa del producto amplificado con los oligonucleótidos MY09-MY11 provenientes de DNA de tejido cervical.

Con este estudio molecular se hizo una reclasificación de las muestras con base en la presencia o ausencia de DNA viral para el estudio posterior de identificación del tipo 16 o 18 de VPH.

De tal forma que de las 51 biopsias con diagnóstico colposcópico sano o libre de VPH, se obtuvieron 8 muestras positivas a la infección por VPH y 43 no presentaron evidencia molecular de infección por VPH. Estas 43 muestras fueron seleccionadas para formar el grupo control (sanas). Mientras que, las muestras positivas en el ensayo de PCR universal pasaron a formar parte del grupo experimental infectado por VPH.

Ahora bien, de las 54 biopsias diagnosticadas colposcópicamente como IVPH se obtuvieron 54 muestras positivas a la presencia de VPH por PCR. Por lo tanto, una vez realizada la reclasificación se estableció un grupo positivo a la infección por VPH con un total de 62 muestras y un grupo control negativo a la infección con un total de 43 muestras.

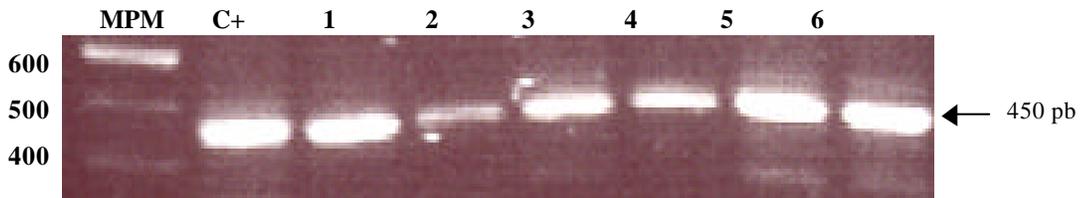


FIGURA 1 Análisis molecular de la presencia de VPH en biopsias cervicales. El DNA obtenido de las biopsias fue sometido a un PCR usando los oligonucleótidos universales MY09-MY11. Como control positivo (C+) se usó DNA de la línea celular SiHa, la cual es positiva al VPH. Como control negativo (C-) se usó agua ultra pura. MPM: marcador de peso molecular 100 pb. Carril 1 al 6 biopsias de tejido cervical.

Se sabe que los VPH 16 y VPH 18 son los tipos oncogénicos más prevalentes en nuestro país. Por lo tanto, con la finalidad de determinar su presencia en la población

de estudio se procedió a analizarlos por PCR usando los oligonucleótidos Pr3-Pr4 para el tipo 16 y 18LCR-F y 18LCR-R para el VPH 18.

El DNA de las muestras que demostraron ser positivas a la presencia de VPH, fue utilizado para estudiar la presencia de VPH 16 y VPH 18. En la figura 2 se muestra un gel representativo de la amplificación de VPH 16.

El análisis molecular demostró que el 75.8% de muestras positivas a VPH está infectada por el tipo 16.

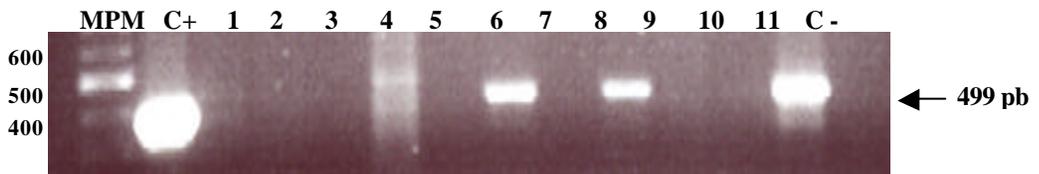


FIGURA 2. Análisis molecular de la presencia de VPH tipo 16 en biopsias cervicales. El DNA obtenido de las biopsias fue sometido a un PCR usando los oligonucleótidos Pr3 y Pr4. Como control positivo (C+) se usó el plásmido PUC HPV16 que contiene al gen completo del VPH 16. Como control negativo (C-) se usó agua ultra pura. Del carril 1 al 11 biopsias de cérvix.

Como el VPH 18 es el segundo tipo viral de alto riesgo más común en México, se procedió a buscar la presencia del mismo en el DNA de las muestras en estudio.

Los oligonucleótidos 18LCR-F y 18LCR-R amplifican un fragmento de 364 pb y el resultado de la amplificación se muestra en la figura 3.

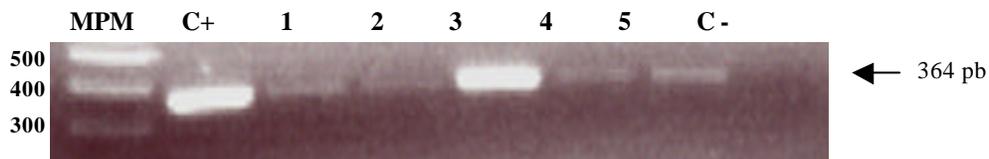


FIGURA 3. Análisis molecular de la presencia de VPH tipo 18 en biopsias cervicales. El DNA obtenido De las biopsias fue sometido a un PCR usando los oligonucleótidos 18LCR-F y 18LCR-R Como control positivo (C+) se usó DNA de células CaLo que son positivas a la presencia de VPH18. Como control negativo (C-) se usó agua ultra pura. Del carril 1 al 5 muestras de tejido cervical.

En este estudio el 24.19 % de las muestras cervicales resultaron estar infectadas por VPH tipo 18.

Los resultados del estudio molecular se resumen en la Tabla 1. Como se puede observar 38.29 % y 17.02% de las muestras fueron positivas a la presencia de VPH16 y 18 respectivamente.

VPH (+) MY09-MY11	VPH16 (+) PCR Pr3-4	VPH18 (+) 18LCR-F y -R
62	47 (75.8%)	15 (24.19) %

TABLA 1. Estudio molecular de la presencia de VPH en biopsias de tejido cervical. El DNA extraído de muestras fue analizado por PCR con oligonucleótidos MY09-MY11 (universales); Pr3-Pr4 (específicos para el VPH tipo 16); y 18LCRF-R (específicos para VPH 18).

6.2 Análisis de la presencia de survivina en biopsias cervicales.

La presencia de la proteína survivina en tejido cervical se estudió por inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo dirigido contra la survivina humana completa. Cabe señalar que para este estudio solo se pudo disponer del siguiente material biológico: se analizaron un total de 47 muestras infectadas con VPH y 17 de tejido sano. En la figura 4 se pueden observar muestras donde se aprecia una reacción positiva a la presencia de survivina en tejido infectado. El estudio inmunohistoquímico demostró la presencia de survivina en 25 (53.19%) muestras infectadas por VPH, mientras que solo 5 (29.41%) muestras de tejido sano fue positiva para la presencia de dicha proteína. Estos resultados indican que survivina está presente en una minoría de células en el tejido sano, pero se encuentra presente en un número elevado de células en el tejido cervical infectado por VPH. La proporción de muestras infectadas positivas a survivina, es significativamente mayor a la proporción de muestras sanas que mostraron positividad a dicha proteína ($p= 0.0001$).

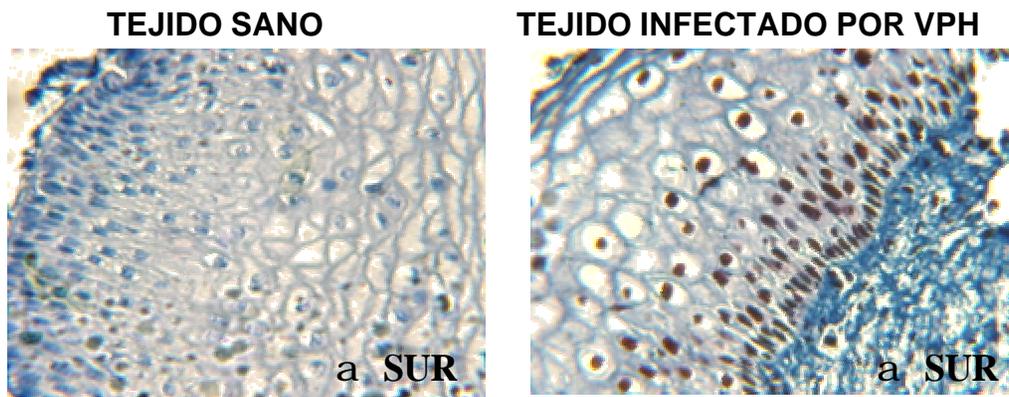


FIGURA 4. Estudio inmunohistoquímico de la presencia de survivina en tejido cervical humano. Muestras de tejido cervical sano o infectado con VPH fueron analizadas utilizando un anticuerpo que reconoce a la proteína survivina humana. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 40x.

Los resultados anteriores sugieren que existe una asociación entre la presencia de survivina y la infección por VPH. Sin embargo, se sabe que durante las primeras etapas de la infección, el VPH se encuentra localizado en estratos bien definidos del epitelio cervical. Por lo tanto, con el fin de investigar si la survivina está presente solamente en células infectadas se realizó un ensayo inmunohistoquímico, usando un anticuerpo dirigido contra la cápside del VPH, para delimitar las áreas del tejido infectado. Posteriormente se realizó un estudio comparativo de las áreas positivas para el virus y para survivina (figura 5). Los resultados mostraron que en el 100% de las muestras existe una distribución del virus y la proteína survivina en los mismos estratos epiteliales.

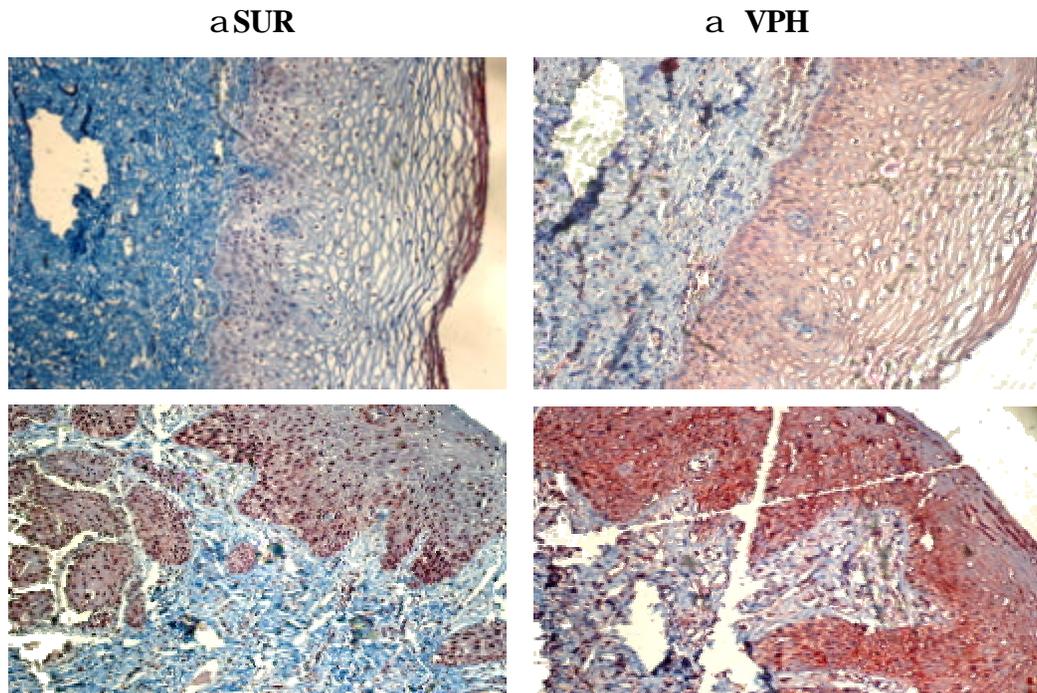


FIGURA 5. Estudio inmunohistoquímico de la presencia de survivina y VPH en tejido cervical humano. Muestras de tejido cervical fueron analizadas utilizando un anticuerpo que reconoce a la proteína survivina humana (α SUR) y un anticuerpo que reconoce al VPH (α VPH). Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 10x.

también se encontró en el citoplasma. Por otro lado es importante destacar que la región en donde se encontraban las células positivas al anticuerpo antisurvivina (α SUR) es la misma donde se encuentran las células con presencia de survivina activa (α THR), y ambas coinciden con la localización del VPH, lo cual sugiere que existe una asociación entre la presencia del virus y la presencia de survivina en sus dos formas.

6.3 Análisis de la presencia de survivina en líneas celulares.

Se sabe que en la mayoría de los cánceres humanos, incluyendo el carcinoma cérvico uterino, la survivina se encuentra sobreexpresada, y presenta un patrón de localización intracelular heterogéneo. Por lo tanto, para comparar el patrón de localización de survivina en células infectadas por VPH y células transformadas, se realizó un estudio inmunocitoquímico de la presencia de survivina y survivina fosforilada en las líneas celulares derivadas de tumores cérvico uterinos, HeLa y Calo que son positivas a la presencia de VPH 18, Caski y SiHa, que presentan VPH tipo 16 y por último C33 y ViBo que no tienen presencia de virus.

En la siguiente figura (7) se puede apreciar que para las líneas Caski y SiHa que están asociadas a VPH16, la presencia de survivina y survivina fosforilada es muy evidente, incluso la localización de la proteína en las 2 líneas es diferente. Por un lado, las células Caski presentan positividad en el núcleo para survivina fosforilada, mientras que las células SiHa muestran presencia de esta misma proteína en el citoplasma.

Ahora bien, en las células HeLa, asociadas a VPH18, se observa la presencia de la proteína en el núcleo en los dos casos (survivina y survivina fosforilada), mientras que en las células CaLo, también asociadas a VPH 18 se aprecia una ligera positividad en el citoplasma.

Estos resultados demuestran que en células derivadas de tumores asociados a VPH la localización intracelular de survivina es heterogénea, en contraste con lo observado en tejido infectado (pero no transformado), donde la localización es principalmente nuclear.

Por último, tanto las células ViBo como C33 negativas a la presencia de VPH, también muestran positividad citoplásmica a survivina y survivina fosforilada. Con este análisis se puede apreciar que hay una diferencia entre el patrón de localización de survivina en tejido infectado con VPH y líneas celulares derivadas de tumores, aunque, el hecho de haber detectado una sobreexpresión de survivina en líneas celulares no asociadas a VPH podría sugerir que el evento de sobreexpresión de survivina en tumores es independiente a la presencia del virus.

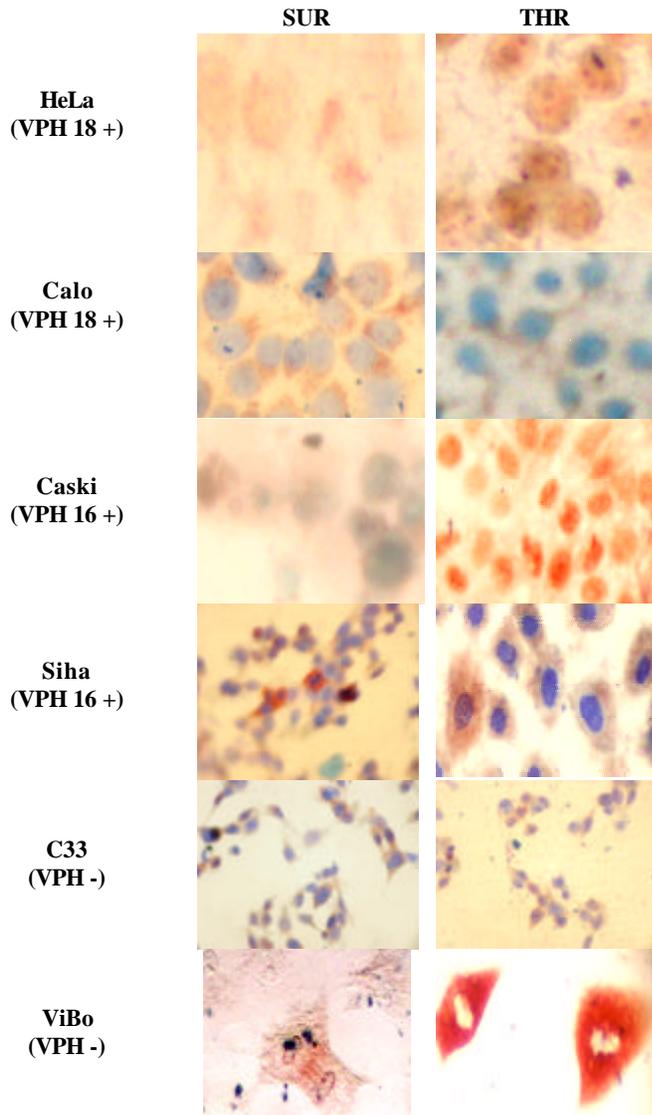


FIGURA 7. Estudio inmunocitoquímico de la presencia de survivina y survivina fosforilada en líneas celulares con presencia de VPH 18 (HeLa ñy CaLo), VPH 16 (Caski y SiHa) y sin presencia de VPH (C33 y ViBo). Las líneas de carcinoma fueron analizadas utilizando los anticuerpos que reconocen a la proteína survivina humana (α SUR) y survivina fosforilada en el residuo 34 de treonina (α THR).

6.4 Análisis de la expresión de survivina en biopsias de cérvix.

Nuestros resultados muestran la presencia incrementada de survivina en muestras de tejido infectado por VPH, comparado con muestras de cérvix sano. Se sabe que algunos virus, como el VIH-1, son capaces de incrementar la transcripción del gen de la survivina. Con el fin de determinar si el incremento de survivina detectado en células infectadas por VPH se debe a un aumento en la transcripción del gen que codifica para esta e dichas células, se procedió a realizar un análisis del RNA mensajero de survivina presente en muestras de tejido sano e infectado por VPH. Se analizaron un total de 31 muestras, de las cuales 13 tenían presencia de VPH y 18 eran sanas.

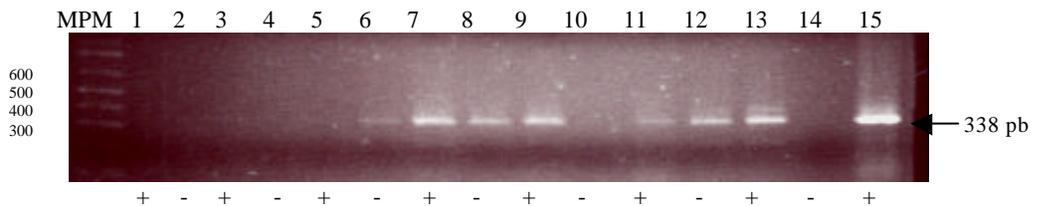


FIGURA 8. Expresión de survivina en biopsias de cérvix analizadas mediante RT-PCR.

Los resultados indican que el 46.15% de las muestras con presencia de VPH mostraban amplificación para survivina, mientras que en los controles negativos se observó que en un 50% hubo amplificación del producto esperado (338 pb) (fig.8). Estos resultados indican que no existe una diferencia en la presencia del transcrito para survivina en epitelio cervical infectado y sano.

7. DISCUSIÓN

El potencial oncológico de algunos tipos de VPH, así como los mecanismos que estos virus utilizan para transformar a las células humanas han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, el mecanismo de infección primaria, así como los cambios moleculares que el virus induce en la célula epitelial han sido menos investigados. El presente trabajo se enfocó en el estudio del efecto potencial de la infección por VPH sobre una molécula muy importante para la regulación de las células: la survivina, la cual se ha descrito como una proteína de doble función, ya que es capaz de inhibir la apoptosis¹⁵,¹⁷, y regular la cariocinesis durante la división celular¹⁶.

En este trabajo se realizó un estudio inmunohistoquímico para detectar la presencia de survivina tanto en el epitelio cervical sano, como en el infectado por VPH. Dicho estudio mostró que la proteína survivina está presente en el 29.41% de biopsias de tejido cervical sano. Es probable que la presencia de la survivina en el tejido sano se deba a que dicha proteína participa en la división celular para llevar a cabo la citocinesis exitosa en las células como lo demostró Wheatley al mutar el sitio activo de survivina para esta acción⁴⁰. De hecho, se ha observado que la expresión de survivina en tejido adulto se restringe a células que atraviesan por la fase G2-M del ciclo celular. El epitelio cervical es un tejido en constante recambio, que está formado por varios estratos celulares. Se sabe que el estrato basal está conformado por células mitóticamente activas, poco diferenciadas⁴². Por lo tanto, la probabilidad de encontrar células en la etapa G2-M, y por lo tanto positivas a la presencia de survivina, es muy alta en este estrato epitelial.

Por otro lado, en el tejido cervical humano infectado con VPH encontramos un aumento en la proporción de biopsias que mostraron positividad a la presencia de survivina (53.19% de las biopsias). Estos resultados parecen indicar que desde las primeras etapas de infección por VPH, la proteína survivina sufre cambios en su expresión. El ciclo de vida del VPH está estrechamente ligado al estado de diferenciación de su célula blanco. Normalmente, las células del cérvix uterino solo se

replican en los estratos basales. Las células más diferenciadas de los estratos superiores ya no se replican, y finalmente mueren y son descamadas en la capa más superficial⁸⁶. Es probable que la sobreexpresión de survivina en las células infectadas por el VPH tenga como función primordial retrasar la muerte de las células para permitir que el virus se replique y pueda formar nuevos viriones. Lo anterior podría demostrarse comparando los niveles de proteínas apoptóticas, como ICAD-CAD en células infectadas y no infectadas con VPH en etapas iniciales de infección.

Ahora bien, O'Connor y colaboradores demostraron que la actividad supresora de apoptosis por parte de la survivina, así como los niveles de ésta en las células, están reguladas a través de la fosforilación de residuos de treonina (Thr) de la proteína. Ellos encontraron que el residuo de treonina 34 de survivina es fosforilada por la cinasa dependiente de ciclina *cdc2*¹⁸, y que la actividad de *cdc2* está asociada con un decremento progresivo en los niveles de survivina celular. Así mismo, la inhibición de la fosforilación en Thr³⁴ de survivina, induce la activación de la apoptosis mediada por caspasa 9, y permite la eliminación de células tumorales por apoptosis. Para determinar el estado de activación de la survivina en el tejido cervical, se realizó un estudio inmunohistoquímico usando un anticuerpo que reconoce específicamente el residuo de treonina 34 fosforilado. Interesantemente encontramos que en el tejido infectado por VPH, la proteína survivina está fosforilada en el residuo 34 de treonina. Este hallazgo apoya la hipótesis de que la función de survivina en el epitelio infectado sea la de detener el proceso apoptótico en dichas células.

Resulta interesante mencionar que en el 100% de las biopsias positivas a la presencia de survivina, se observó una distribución celular semejante de la proteína y el VPH en los mismos estratos epiteliales. Nuestros resultados coinciden con lo observado por Frost y colaboradores en donde por hibridación *in situ* encontraron una co-localización de ADN de VPH y survivina además de que la distribución de la tinción para survivina fue similar a la distribución del ADN de VPH positivamente nuclear⁸⁷. Estos resultados sugieren fuertemente que la infección por VPH induce la expresión de

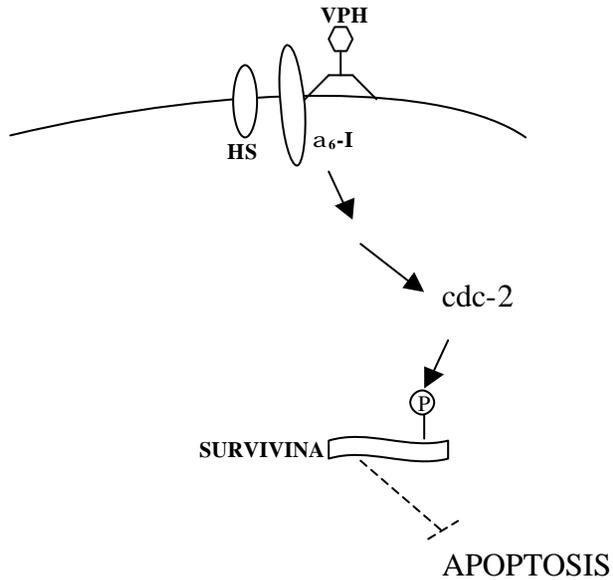
survivina y que además esta proteína se encuentra en su forma activa para la inhibición de apoptosis. Para demostrar que el VPH induce una inhibición de la apoptosis mediada por survivina, sería necesario realizar estudios más profundos para determinar la frecuencia de células apoptóticas en tejido cervical sano y compararlo con el tejido cervical infectado por VPH.

Como se mencionó anteriormente la sobreexpresión de survivina está asociada a diversos tipos de cáncer ⁸⁸. Por lo tanto, para comparar el patrón de localización de survivina en células infectadas por VPH y células transformadas, se realizó un estudio inmunocitoquímico de la presencia de survivina y survivina fosforilada en las líneas celulares derivadas de tumores cérvico uterinos. Nuestros resultados demuestran que en células derivadas de tumores asociados a VPH la localización intracelular de survivina es heterogénea, en contraste con lo observado en tejido infectado (pero no transformado), donde la localización es principalmente nuclear. De igual manera, en las líneas celulares no asociadas a VPH, también existe positividad citoplásmica y nuclear para survivina y survivina activa (Thr³⁴). Con este análisis se puede apreciar que hay una diferencia entre el patrón de localización de survivina en tejido infectado con VPH y líneas celulares derivadas de tumores. Además la sobreexpresión de survivina en líneas tumorales es independiente del origen viral de los tumores. Estas observaciones sugieren la desregulación de survivina en tumores ya no tiene asociación con la presencia del virus. Esta hipótesis es apoyada por varios reportes donde se ha observado una desregulación de survivina en tumores que no tienen un origen viral ^{89, 92, 93}.

Nuestros resultados parecen indicar que existe una asociación entre el VPH y la expresión de survivina. Estudios previos han mostrado una asociación directa entre un virus y la proteína survivina, tal es el caso del virus de la hepatitis B cuya proteína HBX del virus interacciona directamente con survivina para suprimir la apoptosis ²⁸. Para determinar si el VPH tiene una asociación semejante, procedimos a realizar estudios a nivel del RNAm de survivina a través de una retrotranscripción (RT-PCR),

con ello, apreciamos que nuestros resultados contrastan con los hallazgos previos, ya que a diferencia de lo que sucede con el virus de la hepatitis B, el VPH no promueve la expresión de survivina, ya que indistintamente las muestras infectadas y no infectadas con VPH mostraron la presencia de RNAm del gen de survivina, pero esto no deja de lado la posibilidad de que la presencia de VPH induzca la expresión de survivina.

Existen al menos dos posibles formas en las que el virus podría regular a la survivina. Primeramente, se sabe que, la infección por VPH se da a través de la unión a receptores en la superficie celular, se ha propuesto anteriormente que el receptor principal para el VPH tipo 16, es la molécula α_6 -integrina que es un receptor de membrana para matriz extracelular ²³. Por otra parte se ha demostrado que la interacción de varios miembros de la familia de las integrinas, incluyendo a la α_6 -integrina induce la activación de cdc2 ^{29, 30}, produciendo un efecto protector contra la apoptosis ³¹. Dado que esta cinasa fosforila a survivina, hemos considerado un modelo hipotético de la cadena de señalización que podría seguirse tras la infección por VPH de las células epiteliales. Esto es que: el VPH al entrar en contacto con la célula epitelial a través de α_6 -integrina, desencadena una cascada de señalización en la que se activa la cinasa cdc-2 que, a su vez fosforila a la proteína survivina y con ello la estabiliza para poder detener el proceso de muerte (apoptosis) de la célula hospedera. Una segunda posibilidad es que la regulación se lleve a cabo a través de la actividad del oncogen E6 del VPH. Evidencias recientes muestran que la proteína E6 VPH-16 es capaz de inducir la transactivación del promotor para survivina en un modelo de transfección transitoria de líneas celulares. En este mismo trabajo se demostró que la modulación sobre el gen de survivina es efectuada por la proteína p53, la cual al ser degradada por E6 permite la transactivación del promotor de survivina. Dado lo anterior, es posible que en las lesiones cervicales asociadas a VPH, E6 induzca la sobrerregulación de survivina. Sin embargo, esta hipótesis requiere aún ser demostrada con trabajo experimental, ya que existe evidencia de que en las lesiones tempranas asociadas al VPH-16 se presenta una expresión reducida de E6 comparada con la expresión de E7 y L1 (Lanham).



Modelo hipotético de la función que ejerce la presencia del VPH en la fosforilación de la proteína survivina.

Hasta el momento hemos observado una presencia incrementada de survivina en su forma activa en tejido cervical infectado por VPH, además de que las células positivas a survivina se encuentran localizadas en la zona donde se presenta la infección. Lo cual, podría tener implicaciones importantes en el metabolismo normal de la célula epitelial, asociados con los eventos primarios de infección por el VPH.

7. CONCLUSIONES

- ❖ Se determinó que en tejido cervical humano infectado por VPH se presenta asociación con la expresión de la proteína survivina.
- ❖ Se encontró que en el tejido infectado por VPH la survivina está presente en su forma activa, fosforilada en el residuo 34 de Treonina.
- ❖ El patrón de expresión y fosforilación de survivina en células infectadas en etapa temprana con VPH es localizada específicamente, ya sea en núcleo o citoplasma mientras que en células derivadas de tumores está presente tanto en citoplasma como en núcleo.
- ❖ Las células que presentan expresión de survivina en su forma activa, coincide con las zonas infectadas por VPH del epitelio.
- ❖ La infección por VPH no induce un cambio en la expresión del gen que codifica para survivina.

9. PERSPECTIVAS

Determinar que en etapas primarias de infección se detiene la vía apoptótica.

Cuantificar niveles apoptóticos y seccionar células apoptóticas y no apoptóticas para determinar si survivina actúa a ese nivel una vez activa.

Bloquear la presencia de survivina en células infectadas con VPH, para determinar si esta proteína es, efectivamente, clave en el cese apoptótico de células cervicales.

Investigar si la regulación de survivina por el VPH podría ser a nivel de la fosforilación de la misma.

Determinar si la infección por VPH induce la activación de la cinasa dependiente de ciclina p34cdc2, la cual es la cinasa natural de survivina.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Raff MC. "Social Control on cell survival and cell death". *Nature*. 1992;256:397-400.
2. Vaux DL, Haecker G, Strasser A. "An evolutionary perspective on apoptosis". *Cell*. 1994;76:777-9.
3. Thompson CB. "Apoptosis by death factor". *Cell*. 1997;88:355-65
4. Vaux, D. L. And Korsmeyer, S. J. "Cell death in development". *Cell*. 1999;96:245.
5. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. "The halmarks of cancer". *Cell*. 2000;100:57-70.
6. Thompson, C.B. "Apoptosis in the pathogenesis an treatment of disease". *Science*. 1995;267:1456-1462.
7. Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, NA., Wong, W.W., and Yuan, J. "Human ICE/CED-3 protease nomenclature". *Cell*. 1996;87:171.
8. Teodoro, J.G., Shore, G.C., and Branton, P.E. "Adenovirus E1a proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms". *Oncogene*. 1995;11:467.
9. Noteborn, M.H. M., Toodd, D., Verschueren, C. A. J., De Gauw F.M., Curran, W.L., Veldcamp. S., et al. "A single chicken anemia virus protein induces apoptosis". *J. Virol*. 1993; 68-346.
10. Yamada, T. Yamaoka, S., Goto, T., Nakai, M., Tsujimoto. Y., and Hatanaka, M. "The human T-cell leukemia virus type I Tax protein induces apoptosis which is blocked y the Bcl-2 protein". *J. Virol*. 1994;66:3374.
11. Deveraux, W.L., and Reed, J.C. "IAP family proteins-suppressors of apoptosis". *Genes Dev*. 1999;13:239-252.
12. Yamamoto T., Tanigawa N. "The role of survivin as a new target of diagnosis and teatment in human cancer". *Med. Electron Microsc*. 2001;36:207-212.
13. Shin S., Sung B.J., Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung WC, Jung YK, Oh BH. "An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitos of caspase-3 an 7". *Biochemistry*. 2001;96:4002-4003.
14. Ambrosini, G., Adida C., Altieri, D.C. "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma". *Nat. Med*. 1997;3:917-921.

15. J. Kania, S.J. Konturek, K. Marlicz, E.G. Hahn, P.C. Konturek. "Expression of survivin and caspase-3 in gastric cancer". *Digestive Diseases and Sciences*. 2003;48(2):266-271.
16. Altieri, D.C. "The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy". *Trends Mol. Med.* 2001;7:542-547.
17. Nathan R. Wall, Daniel S. O'Connor, Jannet Plescia, Yves Pommier, and Dario c. Altieri. "Suppression of survivin phosphorylation on Thr³⁴ by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis". *Cancer research*. 2003;65(1): 230-235.
18. O'Connor, D.S., Grossman, D., Plescia, J., Li, F., Zhang, H., Villa, A., Tognin, S. "Phosphorylation of survivin". *Proc. Natl, Acad. Sci. USA*. 2000;97:13113-13107.
19. Mesri, M., Wall, N. R., Li, J., Kim, R. W., and Altieri, D.C. "Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus". *J. Clin. Investing*. 2001;108:981-990.
20. Grossman, K., Kim, P. J., Schechner, J. S., and Altieri, D. C. "Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting". *Proc. Natl, Acad. Sci.* 2001;98:635-640.
21. Lippincott-Raven. *Fields Virology*. Chapter 6: Papillomaviruses. He viruses and their replication y Chapter 66: Papillomaviruses. 3ed, 1996;2045-2076. FIELDS Cap 65: 2197.
22. Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R. E., Sapp, M. "Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate". *J. Virol.* 2001;75 (3):1565-1570.
23. Chun-Sik Y. Dwang-Dong K., Sue-Nie P. And Seon-Woo Ch. "α₆-integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP". *BBRC*. 2001;283:668-673.
24. Giroglou, T., Florin, L., schäfer, F., Streeck, R. E., Sapp, M. "Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate". *J. Virol.* 2001;75 (3):1565-1570.
25. Zhu, Y., Roshal, F. Li, Blckett J. And Planelles V. "Upregulation of survivin by HIV-1 Vpr". *Apoptosis*. 2003;8:71-79.
26. Shi Yigong. "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis". *Molecular cell*, 2002;9:459-470.
27. Vaux, D.L. Viral infection of apoptosis. Chapter 10: Virus and apoptosis. 2a. ed. 1999:263-272.
28. Marasawa H., Matsuzawa, S., Welsh K., Zou H., Armstrong R., Tamm I., Reed J.C. "HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression" *EMBO*. 2003;1;22(11):2729-2740.

29. Symington B.E. "Fibronectin receptor modulates cyclin-dependent kinase activity". *J. Biol. Chem.* 1992;25;267(36):25744-25747.
30. Manes T., Zheng D. Q., Tognin S., Woodard A. S., Marchisio P. C., Languino L.R. " α_v - β_3 integrin expression up-regulates cdc2, which modulates cell migration". *J. Cell. Biol.* 2003;26;161(4):817-826.
31. Corley S. M., Ladiwala U., Besson A., Yong V. W. "Astrocytes attenuate oligodendrocyte death in vitro through an α_6 integrin-laminin-dependent mechanism". *Glia.* 2001;36(3):281-294.
32. Lorenzo Lo Muzio, Guseppina Campisi, Lucia Giovanelli, Pietro Ammatuna, Immacolata Greco, Stefania Staibano, Giuseppe Pannone, Gaetano De Rosa, Chiara Di Liberto, Matteo D'Angelo. "HPV DNA and survivin expresión in epithelial oral carcinogenesis: a relationship?" *Oral Oncology.* 2004;40:736-741.
33. Andres Cop-Joze, Pizem-Nina Gale. Immunohistochemical analysis of pro and active-caspase 3 in laryngeal squamous cell carcinoma". *Virchovx Arch.* 2004;444:439-446.
34. Leticia Rocha-Zavaleta, Tonatiuh Barrios, Alejandro García-Carrancá, Victor Valdespino, Fernando Cruz-Talonia. "Cervical secretory immunoglobulin A to human papillomavirus type 16 (HPV16) form HPV16-infected women inhibit HPV16 virus-like particle-induced hemagglutination of mouse red blood cells". *Immunol.Med. Microb.* 2001;31:47-51.
35. Cör, Andrej, Pizem, Joze, Gale Nina. "Immunohistochemical analysis of pro- and active-caspase 3 in laryngeal squamous cell carcinoma". *Virchows Arch.* 2004. 444;439-446.
36. Leticia Rocha-Zavaleta, Alejandro García-Carranca, Angeles Lira de la Cruz, Tonatiuh barrios, Victor Valdespino, Fernando Cruz-Talonia. "Molecular evaluation of the prevalence of oncogenic human papillomavirus genotypes in cervical acetowhte lesions". *Intervirolgy.* 2002;45:11-114
37. Lorenzo Lo Muzio, giuseppina Campisi, Lucia Giovannelli, Pietro Ammatuna, Immacolata Greco, Stefania Saibano, giuseppe Pannone, Gaetano De Rosa, chiara Di Liberto, Matteo D'Angelo. "HPV DNA and survivin expresión n epithelial oral carcinogenesis: a relationship?". *Oral Oncology.* 2004;40:736-741.
38. Gretchen L. Eiben, Diane M. Da Silva, Steven C. Fausch, I. Caroline Le Poole, Michael I. Nishimira W. martin Kast "Cervical cancer vaccines: recent advances in HPV research". *Viral Immunology.* 2003; 16,2: 111-121.

39. Eileen M. Burd. "Human papillomavirus and cervical cancer". *Clin. Microbiol. Rev.* 2003. 16(1):1-17.
40. Wheatley, SP, Henzing AJ, Dodson H, Khaled W, Ernshaw WC. "Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of surviving that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCEP) in vivo". *J. Biol. Chem.* 2004;13;279(7):5655-60.
41. Werness, B.A., A.J. Levine, and P.M. Howley. "Association of human papillomavirus types 16 and 18 E₅ proteins with p53". *Science.* 1990. 248:76-79.
42. Dyson, N., P. M. Hoalley, K. Munger, et. Al. "The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product". *Science.* 1989. 243:934-940.
43. Crish, J. F., F. Bone, S. Balasubramanian, et. Al. "Suprabasal expression of the human papillomavirus type 16 oncoproteins in mouse epidermis alters expression of cell cycle regulatory proteins". *Carcinogenesis.* 2000;21:1031-1037.
44. Durst, M., D. Glitz, A. Shneider, et. Al. "Human papillomavirus type 16 (HPV16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization". *Virology.* 1992; 189:132-140.
45. Uren, A. G., Belharz, T., O'Connell, M. J., Bigg, S. J., van Driel, R., Vaux, D.F. and Lithgow, T. "Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96:10170-10175.
46. Uren, A. G., Wong, L., Pakush, M, Fowler, K. J., Burrows, F. J., Vaux, D. F. and Choo, D. H. A. "Survivin and the inner centromere protein INCEP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype". *Curr. Biol.* 2000; 10:1319-1322.
47. Silke, John and Vaux, David L. "Two kinds of BIR-containing protein-inhibitors of apoptosis, a required for mitosis". *J. Cell. Sci.* 114(10):1821-1827.
48. Uren, A.G., Coulson, E. J and Vaux, D. L. "Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIR ps) in viruses, nematodes, vertebrates and yeast". *Trends Biochem. Sci.* 1998;23:159-162.
49. Jones, G., Jones, D., Zhou, L., Steller, H. and Chu, Y. X. "Deterin a new inhibitor of apoptosis from *Drosophila melanogaster*". *J. Biol.Chem.* 2000; 275:22157-22165.
50. Hausen, H. P. Bardroft, M., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. "A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors". *J. Cell. Biol.* 1998; 141:1415-14-22.

51. Altieri, D.C. "Validating surviving as a cancer therapeutic target". *Nature*. 2003;3:46-51.
52. Mahotka C., Wenzel M, Springer E., Gabbert HE., Gerharz CD "Survivin-delta Ex3 and surviving-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor surviving with different antiapoptotic properties. *Cancer Res*. 1999. 59:6097-6102.
53. Rodriguez, J.A., Span, S.W., Ferreria, C.G., Druyt, F.A. & Giaccone, G. "Crm1-mediated nuclear export determines the cytoplasmic localization of the antiapoptotic protein Survivin" *Esp. Cell Res*. 2002. 275, 44-53.
54. Verdecia, M.A., *et al* "Structure of human anti-apoptotic protein surviving reveals a dimeric arrangement" *Nature Struct. Biol*. 200. 7;602-608.
55. Verdecia, M.A. Huang, H., Dutil, E., Kaiser, A. Hunter, T, and Noel, JP. "Structure of the human anti-apoptotic protein surviving reveals a dimeric arrangement" *Nat. Struct Biol*. 200. 7; 620-623.
56. Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Selvesen, G. S., and Reed, J.C. "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*. 1997. 388; 300-304.
57. Zaho, J., Tenex, T., Martins, L. M., Downward, J. & Lemoine, N. R. "The ubiquitin-proteasome pathway regulates surviving degradation in a cell cycle-dependent manner". *J. Cell Sci*. 2000. 113; 4363-4371.
58. Harrington C.S. "Control of human papillomavirus replication: implications for squamous neoplasia". *J. Pathol*. 1996;178:237-8.
59. Thierry F. "Proteins involved in the control of HPV transcription". *Papillomavirus Report*. 1993;4:27-32.
60. Herrington C.S. "Control of human papillomavirus replications implications for squamous neoplasia". *J. Pathol*. 1996;178:237-238.
61. Banks L., Matlashewski G. "Cell transformation and the HPV E5 gen". *Papillomavirus Rep*. 1993;352:824-827.
62. Pfister, H., Fuch P.G. "papilomaviruses: particles, genome organization and proteins. In: Syrjanen K, Gissmann L., Koss LG, eds. "Papillomavirus and human disease". Berlin:Springer-Verlag 1987:1-18.
63. Wyllie A. H., Herr J. F. and Currie A. R. "Cell death: the significance of apoptosis". *Int. Rev. Cytol*. 1980. 68:251-306.
64. Cohen G. M. "Caspases: the executioners of apoptosis". *Biochem*.1997. 326:1-16.

65. Earnshaw W. C., Martins L. M. and Kaufmann S. H. "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis". *Anna. Rev. Biochem.* 1999. 68:383-424.
66. Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S. et al. "cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade". *Cell.* 1997. 91: 479-489.
67. Zow H., Li Y., Liu X., and Wang X. "An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9". *J. Biol. Chem.* 174:11549-11556.
68. Saleh A., Srinivasula S. M., Acharya S., Fishel R. and Alnemri E. S. "cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation". *J. Biol. Chem.* 274:17941.-17945.
69. Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yakner B. A. et al "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid beta". *Nature.* 2000 403:98-103.
70. Morishima N., Nakanishi K., Takenouchi H., Shibata T. and Yusuhiko Y. "An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis: cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12". *J. Biol. Chem.* 2002. 277:34287-34294.
71. Rao R. V., Castro-Obregon S., Frankowski H., Schuler M., Stoka V., del Rio G. et al. "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: an Apaf-1-independent intrinsic pathway". *J. Biol. Chem.* 2002. 277:21836-21842.
72. Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marco I., Snow B. E., Brothers G. M. et al. "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor". *Nature.* 1999. 297:441-446.
73. Kroemer G. and Reed J. C. "Mitochondrial control of cell death". *Nat. Med.* 2000. 6:513-519.
74. Christopher Potten and James Wilson "Apoptosis the life and death of cells". Ed. Cambridge. 2004.
75. Frederick L. Kieche, Xinbo Zhang. "Apoptosis: biochemical aspects and clinical implication". *Clin. Ch. Acta.* 2002. 326:27-45.
76. Guda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. "Molecular cloning and expression of the Fas ligand: A novel member of the tumor necrosis factor family". *Cell.* 1993. 75, 1169-1178.

77. Suda, T., Okazaki, T., Naito, Y., Yodota, T., Arai, N., Ozaki, S., Nakao, K., and Nagata, S. "Expression of the Fas ligand in T-cell-lineage". *J. immunol.* 1995. 154:3806-3813.
78. Ashkenazi, R., and Dixit, V. M. "Death receptor: Signaling and modulation". *Science.* 1998. 281:1305-1308.
79. Muzio, M., Stockwell, B. T., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. "An induced proximity model for caspase-8 activation" *J. Biol. Chem.* 1998. 273:2926-2930.
80. Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. "FLICE is activated by association with the CD95 death inducing signaling complex (DISC)". *EMBO J.* 1997. 16:2794-2804
81. Srinivasola, S. M., Ahmad, M., Fernandez-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. "Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1 mediated oligomerization". *Mol. Cell.* 1998. 1:949-957.
82. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, T., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang X. "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates and apoptotic protease cascade". *Cell.* 1997. 91:479-489.
83. Zoo, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wong, X. "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates cytochrome c-dependent activation of caspase-3". *Cell.* 1997. 90:405-413.
84. Laimms, L. A. "The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer". *Infect agents Dis.* 1993. 2:74:86.
85. Doorbar J., Ely S. Sterling J, et al. "Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network". *Nature.* 1991;342:824-827.
86. Tamm I, Wang Y., Sausville E., Scudiero DA, Vigna N., Oltersdorf T., Reed. JC. "IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases and anticancer drugs" *Cancer Res.* 1998; 58:5313-5320.
87. Frost M., Jarboe, Elke A., Orlicky D., Gionanni, r., Thompson L., Chesney, Enomoto T., Shroyer, K. R. "Immunohistochemical localization of surviving in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma". *Am. J. Clin. Pathol.* 2002;117:738-744.
88. Ambrosini G., Adida C., Altieri DC. "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma". *Nat. Med.* 1997;3:917-921.

89. Shiraki K., Takase K. and Nakano T. "The emerging role of caspase inhibitors in gastrointestinal cancers". *J. Gastroenterol.* 2002;37;323-331.
90. Abbas, Abul K., Lichtman, Andrew H. "Inunología celular y molecular". Ediciones Harcourt S.A. 5ª ed. 562 pp.
91. Laimins, L.A. "The biology of human papillomavirus from warts to cancer". *Infect Agents Dis.* 1993. 2:74-86.
92. Lania, D. Kontured S.J., Marlioz K., Hahn E.G. and Kounturek PC. "Expression of surviving and caspase-3 in gastric cancer". *Digestive diseases and Sciences.* Vol. 48 No. 2 Feb 03. 266-271.
93. Grabowski P., Khühnel T., Mühr-Wilkenshoff F., Heine B., Stein H., Höpfner M., Germer CT. and Scherübl H. "Prognostic value of nuclear surviving expression in oesophageal squamous cell carcinoma". *British Journal of Cancer.* 2003;8;115-119.
94. Chantalat, L. *et al.* "Crystal structure of human surviving reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions". *Mol. Cell.* 2000. 6; 183-189.
95. Muchmore, S.W. *et al.* "Crystal-structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein surviving". *Mol. Cell.* 2000. 6; 173-182.
96. Lanham, S., Herbert A., Watt, P. "HPV detection and measurement of HPV-16, telomerase, and survivin transcripts in colposcopy clinic patients". *J. Clin Pathol.* 2001;54:304-308.
97. Borbély, Ágnes A., Murvai M., Kenya, J. Beck, Z., Gergely, L., Li, F., Veress, G. "Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expresión". *J. General Virology.* 2006;87:387-294.

9. APÉNDICE

PBS 1X (Buffer salino de fosfatos)

8g. NaCl, 9.2g KCl, 1.44 g. Na₂HPO₄, 0.24 G. KH₂PO₄ en 800 ml. De agua destilada. Ajustar PH a 7.4 con HCl. Aforar a 1 litro y esterilizar en autoclave. Almacenar a 4°C.

PBS-BSA 1% (100 ml.)

Pesar 1g. de albúmina sérica bovina y adicionar a 100 ml. De buffer salino de fosfatos. Mezclar con vórtex y almacenar a °C.

Buffer de lisis.

100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 25mM EDTA pH 8, 0.5% SDS. Almacenar a temperatura ambiente.

EDTA 0.5 m pH 8 (100 ml.)

18.6g Na₂EDTA en 70 ml. de agua destilada. Ajustar pH con 10M NaOH. Aforar a 100 ml., se disuelve hasta que llega al pH adecuado. Almacenar a 4°C.

Tris-HCl 1M (100 ml.) pH 8.

12.1 g Tris-base en 50 ml. De agua. Ajustar pH con HCl. Aforar a 100 ml. Almacenar a 4°C.

Buffer TBE 1x

10.8 g. Tris-base, 5.5 g. ácido bórico, 10 mM EDTA pH8. Aforar a 1 litro. Almacenar a 4°C.

Agarosa 1%

En 100 ml. de buffer TBE adicionar 1g. de agarosa y mezclar por calentamiento. Se deja entibiar y se adiciona bromuro de etidio (350 µl) 0.5mg/ml.