



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**MAPEO DE LOS SITIOS DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES DE LA
ONCOPROTEINA E6 DEL VIRUS DE PAILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ERIKA ALEJANDRA GARCÍA HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GRECO HERNÁNDEZ RAMÍREZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. ROCIO ÁNGELES GARCÍA BECERRA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**MAPEO DE LOS SITIOS DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES DE LA
ONCOPROTEINA E6 DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ERIKA ALEJANDRA GARCÍA HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GRECO HERNÁNDEZ RAMÍREZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. ROCIO ÁNGELES GARCÍA BECERRA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015

Tal
UNAM
POSGRADO
Ciencias Biológicas



COORDINACIÓN

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 22 de junio de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GARCÍA HERNÁNDEZ ERIKA ALEJANDRA** con número de cuenta **406078966**, con la tesis titulada "**MAPEO DE LOS SITIOS DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES DE LA ONCOPROTEÍNA E6 DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO**", realizada bajo la dirección del **DR. GRECO HERNÁNDEZ RAMÍREZ**:

Presidente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Vocal: DR. JOSÉ EFRÁIN GARRIDO GUERRERO
Secretario: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Suplente: DRA. ARACELI HERNÁNDEZ FLORES
Suplente: DRA. ROCÍO ANGELES GARCÍA BECERRA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 07 de octubre de 2015

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México en especial al **Posgrado en Ciencias biológicas**, por haberme brindado las herramientas académicas para poder realizar con éxito mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de maestría. Este trabajo fue financiado por CONACyT con el proyecto “Estudio de los mecanismos moleculares de traducción de genes oncogénicos del virus de papiloma humano 18” con número de registro **168154**

Al comité Tutoral por su asesoría durante el desarrollo de esta tesis, el cual estuvo formado por:

Dr. Greco Hernández Ramírez Facultad de Medicina, UNAM

Dra. Marcela Lizano Soberón Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Roció García Becerra Facultad de Medicina, UNAM

Agradecimientos

A mi tutor el Dr. Greco Hernández por todo el apoyo que me ha brindado durante todo el tiempo que he trabajado con él, le doy las gracias por sus grandes y valiosos consejos y también por sus regaños que tanto me han ayudado a superarme y hacer mejor cada día, le agradezco por su confianza que me ha brindado.

Al instituto Nacional de cancerología (INCAN) donde fue realizado fue desarrollado el trabajo experimental.

Al Dr. Alejandro García Carrancá por su asesoría durante la realización de mi trabajo de tesis.

Dedicatoria

Todo este esfuerzo que he hecho a lo largo de esta trayectoria llena de grandes vivencias y emociones es dedicada en primer lugar a mis padres Felipe y Ofelia, que se han esforzado y siempre me ha apoyado para que yo pueda cumplir todos mis sueños y metas. Espero algún día poder devolverles un poco de lo que ustedes han hecho por mí.

A mis hermanos Luz Adriana e Israel que me han acompañado en los mejores y en los peores momentos de mi vida y siempre me han apoyado y sé que siempre puedo contar con ellos, y ello saben que siempre contarán conmigo.

A mi sobrino Ángel con el que crecido y compartido tantas cosas, hemos sido cómplices en tantas locuras y sabes que siempre estaré ahí para ti. Aunque muchas personas no lo entiendan yo lo admiro porque él es firme en sus ideologías y no le importa lo que los demás piensen de él, es una persona libre en todos los sentidos.

A mis sobrinos Adrián y Alejandro que entre sonrisas y juegos llenan mi vida de alegría, que si me ven afligida están ahí con una gran sonrisa.

A todos ellos les quiero decir que los amo y que son lo más importante en mi vida.

Índice

	Página
Índice de figuras _____	i
Índice de tablas _____	ii
Resumen _____	1
Abstract _____	3
Introducción _____	4
Características biológicas del VPH _____	7
Ciclo de vida de los VPHs _____	8
Proteínas virales y su función _____	10
La proteína oncogénica E6 _____	11
Transcripción _____	13
Transcripción de los VPH _____	14
Objetivo general _____	16
Objetivos particulares _____	16
Antecedentes _____	17
Justificación _____	19
Metodología _____	20
Población de estudio _____	20
Extracción de DNA y RNA _____	20
Tipificación del tipo de VPH encontrado en biopsias de tumor. _____	21
Mapeo de los sitios de inicio de la transcripción _____	24
Resultados _____	29
Discusión _____	34
Conclusiones _____	37
Literatura citada _____	38

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Clasificación de los virus del papiloma humano _____	5
Figura 2. Organización del genoma de los VPH _____	8
Figura 3. Ciclo viral de los VPH _____	9
Figura 4. Blancos celulares de E6 _____	12
Figura 5. Mapa transcripcional del VPH 16 _____	15
Figura 6. Inicios de la transcripción VPH18 _____	17
Figura 7. Mapa del vector pTZ57/T _____	27
Figura 8. Geles de agarosa mostrando las amplificaciones de los RACE de los cDNAs virale. _____	30
Figura 9. Ejemplo del análisis de las secuencias para el mapeo de los sitios de inicio de la transcripción _____	31
Figura 10. Relaciones filogenéticas de algunas especies de α papilomavirus (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 y 10) _____	33

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Clasificación de los VPH según su capacidad de generar lesiones malignas _____	5
Tabla 2. Característica de los oligonucleótidos usados para la tipificación _____	22
Tabla 3. Programas de amplificación para VPH 16 y VPH 18 _____	22
Tabla 4. Programas de amplificación para PGMY 09/11 y GP5+/6 _____	23
Tabla 5. Características de oligonucleótidos del 5'- RACE _____	25
Tabla 6. Programa de amplificación para las 5'-UTRs _____	26
Tabla 7. Programa de amplificación de los PCR de colonia _____	28
Tabla 8. Tipificación del tipo de VPH de las muestras de tumor _____	29
Tabla 9. Mapeo de los sitios de inicio de la transcripción _____	32

Resumen

Los virus de papiloma humano (VPHs) son los agentes infecciosos más frecuentemente transmitidos por contacto sexual en todo el mundo. De hecho, la infección persistente con los VPHs es el principal factor de riesgo de que las mujeres desarrollen cáncer cérvicouterino. Este es una de las principales causas de muerte por cáncer entre las mujeres de los países subdesarrollados, y la tercera causa de muerte por cáncer entre las mujeres a nivel mundial. Aunque hay aproximadamente 200 tipos de VPHs descritos, los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, y 82 son considerados cancerígenos o de alto riesgo.

El genoma de los VPHs codifica para seis proteínas no estructurales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y dos proteínas estructurales que conforman la cápside (L1 y L2). E6 y E7 son dos potentes proteínas oncogénicas cuya expresión continua lleva a la inmortalización de las células infectadas y es la causa del cáncer asociado a los VPH.

En el presente trabajo se realizó el mapeo de los sitios de inicio de la transcripción en biopsias de tumor por medio de la técnica de RACE de los tipos virales: 16, 18, 31, 39, 45 y 58. El análisis del VPH 16 mostro 2 poblaciones de mensajeros: una con un 5'-UTR de 9 nucleótidos y la otra con 7 nucleótidos. Para el VPH 18, también se encontraron dos poblaciones de mensajeros, la primera con un 5'-UTR de 3 nucleótidos y la otra con 0 nucleótidos. En el VPH 39, se encontraron dos poblaciones de mensajeros, la primera con un 5'-UTR de 3 nucleótidos y la segunda con un 5'-UTR de 1 nucleótido. Para el VPH 31, se encontró solo una población de mensajeros con un 5'-UTR de 9 nucleótidos. En el VPH 45, también se encontró solo una población de mensajeros con un 5'-UTR de 3 nucleótidos y por último para VPH 58 se encontró una población con un 5'-UTR de 217 nucleótidos.

Como se observó para los tipos virales 18, 39 y 45, todas las poblaciones de mensajeros presentan 5'-UTRs extremadamente cortos que van de 0 a 3 nucleótidos. Con el mapeo de los sitios de inicio de la transcripción de los diferentes tipos virales analizados, se puede ver claramente una tendencia, los tipos virales 18, 39 y 45 con un 5'-UTR corto (entre 0 - 3 nucleótidos de longitud) pertenecen a la especie 7 de los α papilomavirus y los tipos virales 16, 31 y 58 con un 5'-UTR más largos (entre 7 – 217 nucleótidos de longitud) están agrupados en la especie 9 de los α papilomavirus.

Abstract

Human papillomavirus (HPV) are the infectious agents most frequently sexually transmitted worldwide. Indeed, persistent infection with HPV is the main risk factor for developing cervical cancer, and this is one of the leading causes of cancer death among women in developing countries, and the third leading cause of cancer death among women worldwide. Although there are about 200 types of HPV described, types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, and 82 are considered high risk or carcinogenic.

The HPV genome encodes six nonstructural proteins (E1, E2, E4, E5, E6 and E7) and two structural proteins forming the capsid (L1 and L2). E6 and E7 are two powerful oncogenic proteins whose continuous expression leads to immortalization of infected cells and is the cause of cancer associated with HPV.

In this work the site of the initiation of transcription of HPV types 16, 18, 31, 39, 45 and 58 were mapped in tumor biopsies, through the RACE technique. The mRNA analysis showed two populations for HPV16: one with a 5'-UTR of 9 nucleotides and one with 7 nucleotides. HPV 18 showed, two populations of messengers, the first with a 5'-UTR of 3 nucleotides and the other with 0 nucleotides. In HPV 39, two populations of messengers were found, the first with a 5'-UTR of 3 nucleotides and the second with a 5'-UTR of 1 nucleotide found. For HPV 31 only a messenger population was found with a 5 'UTR of 9 nucleotides. In HPV 45, it was also found only a population of messengers with a 5'-UTR of 3 nucleotides; and finally, for HPV 58 a population of messengers was found with a 5'-UTR of 217 nucleotides. As observed for HPV types 18, 39 and 45, all populations of 5'-UTR messengers were extremely short ranging from 0 to 3 nucleotides. Mapping initiation of transcription site of the different viral types analyzed, one can clearly see a trend, HPV types 18, 39 and 45 with a short 5'-UTR (between 0-3 nucleotides long) belong to the species and the α papillomavirus HPV types 16, 31 and 58 with longer 5'-UTR (between 7-217 nucleotides long) are grouped in 9 species of α papillomavirus.

Introducción

Los virus de papiloma humano (VPHs) son los agentes infecciosos más frecuentemente transmitidos por contacto sexual en todo el mundo. De hecho, las infecciones persistentes con los VPHs son el principal factor de riesgo para que las mujeres desarrollen cáncer cervicouterino (CaCu), siendo éste una de las principales causas de muerte por cáncer entre las mujeres de países subdesarrollados y la tercera causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial. En el 2012, se registraron 527,624 nuevos casos de los cuales el 50.3% fueron deceso, este porcentaje representa el 7.4 % de muertes en mujeres por cáncer [1, 2].

Alrededor de 120 tipos de VPHs han sido completamente caracterizados. Con base en la secuencia de la proteína L1 se encuentran clasificados en cinco principales géneros filogenéticamente relacionados: alfa (α), beta (β), gama (γ), Mu (μ) y Nu (ν) [3, 4]. Esta clasificación se muestra en la Figura 1.

Los VPHs además se pueden clasificar en 1) cutáneos, que son aquellos con la capacidad de infectar la piel, que producen las verrugas comunes y que carecen de la capacidad de inducir proliferación maligna. Entre estos encontramos los tipos virales 1, 2, 4, 10, 27, 57, entre otros; y en 2) mucosos, aquellos asociados a patologías en mucosas [5]. Los VPHs mucosos se encuentran dentro del género α y se pueden subdividir en virus de bajo riesgo, dentro de los cuales se encuentran los causantes de verrugas genitales y/o condilomas; y de alto riesgo, llamados así porque tienen la capacidad de generar CaCu u otros tipos de neoplasias malignas como cáncer de orofaringe. (Tabla 1). Se sabe que los VPHs tipo 16 y 18 son los causantes de aproximadamente el 70% de todos los casos de CaCu reportados alrededor del mundo [6-7].

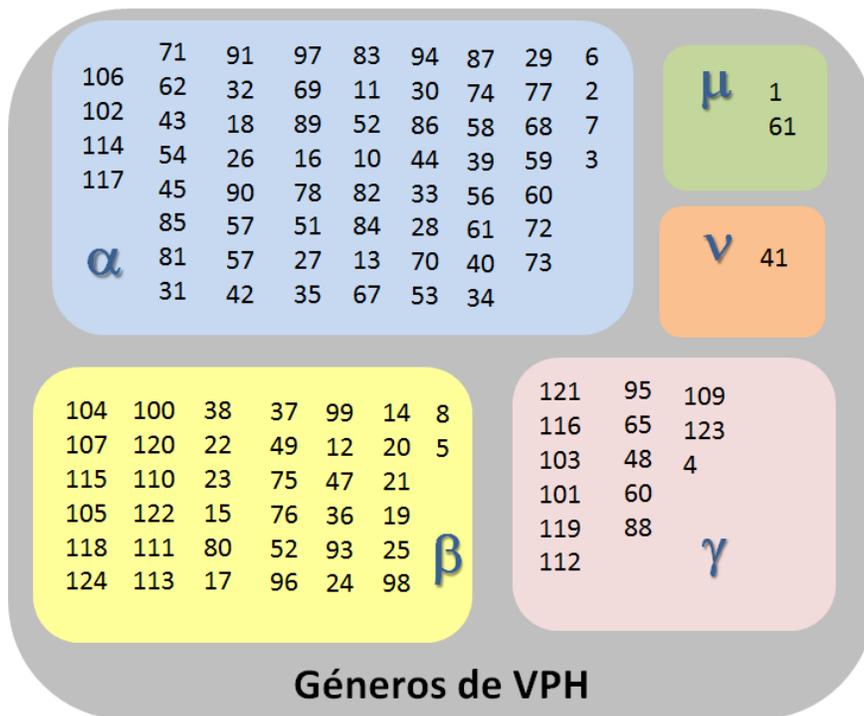


Figura 1. Clasificación de los virus del papiloma humano. Se agrupan en cinco principales géneros filogenéticamente relacionados: alfa (α), beta (β), gama (γ), Mu (μ) y Nu (ν). Los números representan cada tipo viral [3,4].

Tabla 1. Clasificación de los VPH según su capacidad de generar lesiones malignas [5].

Clasificación de riesgo	Tipo de VPH
Alto riesgo	18,16,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,73 y 82
Bajo riesgo	6,11,40,42,43,44,54,61,70,72 y 81

La probabilidad de contagio por un VPH genital está influenciada por diferentes factores de riesgo, siendo la actividad sexual la principal causas de su transmisión. Así mismo hay una fuerte asociación entre el número de parejas sexuales y la adquisición de los VPHs.

El contagio por los VPHs genital no es suficiente para el desarrollo de CaCu. Además del contagio se necesitan otros factores de riesgo para el desarrollo de esta neoplasia, como son: antecedente de enfermedad de transmisión sexual y/o presencia de verrugas genitales; la persistencia de la infección que induzca cambios genéticos y lleve a la inmortalización de los queratinocitos; el uso prolongado de anticonceptivos orales; esto se debe a que la región larga de control (LCR) en el genoma viral contiene elementos de respuesta a glucocorticoides inducidas por hormonas como la progesterona; coinfecciones con otros tipos de virus como el virus del herpes simple (HSV) tipo 2, citomegalovirus (CMV), herpes humano tipos 6 y 7 (HHV-6/7); y por último la predisposición genética, que representa el 27 % del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor. Por otro lado, la predisposición genética afecta la susceptibilidad a la infección por VPH, la capacidad para resolverla y el tiempo de desarrollo de la enfermedad [8].

Los VPHs de alto y bajo riesgo pueden causar lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL, *Low grade Squamous Intraepithelial Lesion*), que se caracterizan por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en el epitelio basal. Este se diferencia y madura mostrando anormalidades menores en la célula. La zona de transformación del cuello uterino es un sitio de continuos cambios metaplásicos, los cuales están más activos durante la pubertad y el primer embarazo y terminan con la menopausia. Una metaplasia escamosa atípica, inducida por el VPH que se desarrolle en esta región, puede progresar a lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL, *High grade Squamous Intraepithelial Lesion*) que evita la maduración y diferenciación, produciendo una replicación continua de células inmaduras y eventualmente la acumulación de anormalidades genéticas que favorecen la malignidad y el desarrollo de CaCu. Los VPH también

han sido implicados en el desarrollo de tumores malignos en sitios distintos, como ano, vagina, vulva, pene y orofaringe [9].

Características biológicas del VPH

Los VPHs pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, son virus pequeños no encapsulados de forma icosaédrica de 55 nm de diámetro y compuesto por 72 capsómeros. Su genoma está constituido por DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pb que se divide en 3 regiones (Figura. 2): la región temprana (E, *early*), la región tardía (L, *late*) y la Región Larga de Control (LCR, *Long Control Region*).

La región temprana ocupa aproximadamente el 50% del genoma total del virus y codifica para seis proteínas: E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Estas son necesarias para la replicación del DNA viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular. La región tardía ocupa el 40% del genoma viral y codifica para las proteínas L1 y L2. Y por último la región larga de control (LCR), comprende el 10% del genoma viral; no codifica para ninguna proteína pero contiene el origen de replicación; además contiene múltiples sitios de unión a factores que activan o reprimen la transcripción y son importantes para la regulación [10,11].

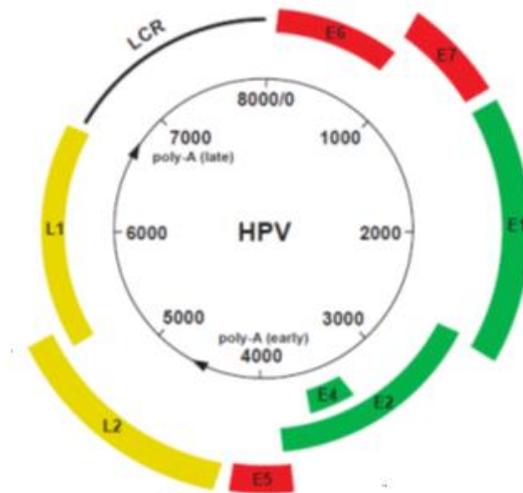


Figura 2. Organización del genoma de los VPH. Representación esquemática de la organización de los genes tempranos (E6, E7, E1, E2, E4 y E5), tardía (L1 y L2) y la Región Larga de Control (LCR).

Ciclo de vida de los VPHs

Los VPHs infectan queratinocitos localizados en el estrato basal del epitelio escamoso estratificado cuando está expuesto debido a microlesiones. Una vez que los viriones reconocen a las células blanco entran a estas por endocitosis de vesículas de clatrina donde se lleva a cabo el desensamblaje del virión y la entrada del DNA viral al núcleo [12,13].

Posteriormente, el ciclo de vida lo determina el proceso de diferenciación de los queratinocitos. En queratinocitos del estrato basal primero se lleva a cabo la expresión de los genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7). Las proteínas tempranas E1 y E2 mantienen el genoma episomal en un bajo número de copias y retardan la diferenciación de los queratinocitos basales; esto favorece la proliferación de queratinocitos basales infectados. Cuando la célula basal empieza a diferenciarse se favorece la expresión de las proteínas tempranas E6 y

E7, impulsando a las células a la fase S del ciclo celular, lo que crea el ambiente propicio para la replicación del genoma viral y la proliferación celular necesaria para la producción de viriones infecciosos y de esta manera incrementar el número de células infectadas. Cuando las células infectadas se encuentran en estrato espinoso se inicia la expresión de los genes tardíos (L1 y L2), que son las proteínas estructurales de la cápside, y con esto el ensamblaje de los viriones. La expresión de E4 en el estrato granuloso ayuda a la liberación de los viriones a través de la descamación celular ya en el estrato córneo. En la Figura 3 se esquematiza el ciclo de vida de los VPHs [14-15].

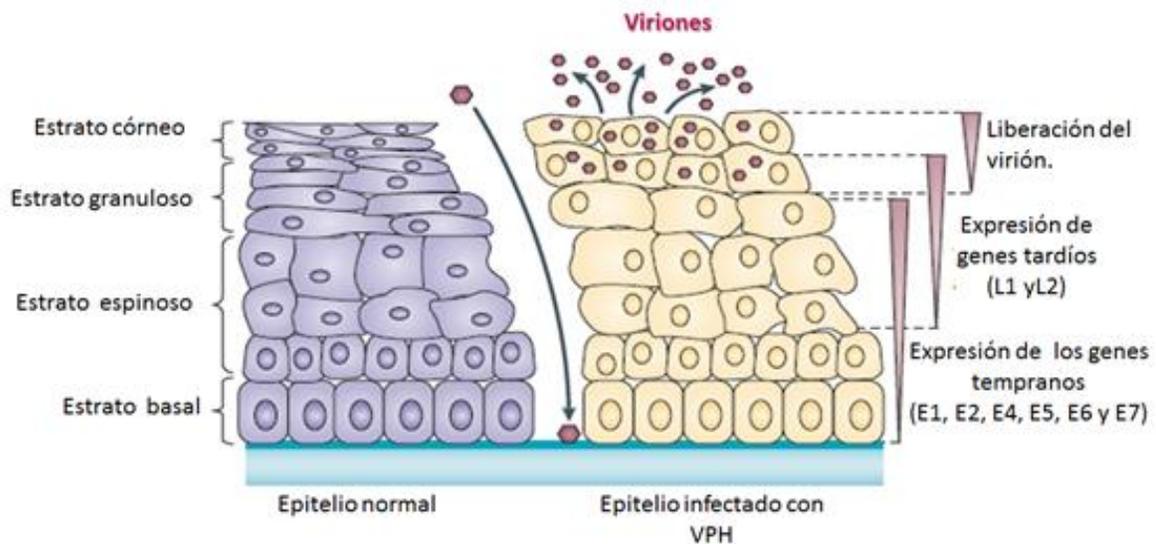


Figura 3. Ciclo viral de los VPH. En la imagen se muestra que la expresión de las proteínas virales depende del grado de diferenciación de las células del epitelio estratificado. A la izquierda se muestra un epitelio normal y a la derecha un epitelio infectado por VPH. Modificado de Moody, 2010 [16].

Proteínas virales y su función

L1 y L2 son las proteínas estructurales de la cápside. E2 es uno de los principales reguladores de la transcripción del VPH, y funciona mediante el reclutamiento de factores celulares que activan o reprimen la transcripción de una manera dosis dependiente [17-18]. E1 es una DNA helicasa dependiente de ATP; es esencial para la replicación y amplificación del episoma viral y es requerida durante todo el ciclo de replicación, primero para aumentar el número de copias y posteriormente para mantener un nivel constante de episomas en las células durante la diferenciación del epitelio [19]. La proteína E4 regula los niveles de expresión de E2, facilitando la amplificación del genoma viral y la expresión de las proteínas tempranas. Se sabe que E4 está asociada a la degradación de los filamentos de queratina lo que ayuda a la liberación de los viriones [20, 21]. E5 regula la actividad de los receptores de los factores de crecimiento como el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR); participa en la evasión del sistema inmune y es requerida para la amplificación completa del genoma viral; y participa en la activación de los genes tardíos L1 y L2 [22-24]. E6 y E7 son proteínas oncogénicas cuya expresión continua lleva a la inmortalización y transformación de las células infectadas y es la causa del cáncer asociado a los VPH. E7 se une y promueve la degradación de la proteína celular supresora de tumores del retinoblastoma (pRB), y también se une a miembros de la familia de factores de transcripción AP1 involucrados en vías de señalización relacionadas con procesos oncogénicos y de diferenciación celular [25].

La proteína oncogénica E6

El gen E6 codifica para una proteína relativamente pequeña de aproximadamente 150 aminoácidos. Cuenta con cuatro motivos Cys-X-X-Cys que forman “dedos de zinc” y que contribuyen a la rigidez y estabilidad de sus dos dominios. Cada dominio consiste en tres hojas beta (S1, S2 y S3) y dos alfa hélices (H1 y H2), por lo que su integridad es esencial para llevar a cabo diversas funciones. Los dominios carboxilo y amino terminal son variables en longitud y secuencias entre los diferentes VPHs [26,27].

La localización de E6 ha sido descrita principalmente en núcleo y en pequeña proporción en el citoplasma celular, sin embargo, su localización es un proceso activamente controlado y depende del estado de diferenciación de las células en respuesta a diversos estímulos.

A pesar de su tamaño relativamente pequeño, la proteína E6 induce cambios muy importantes en el ciclo del virus y en el proceso de immortalización y transformación de la célula. E6 es uno de los genes que se expresan más tempranamente durante la infección por VPH, creando un ambiente más propicio para la producción de nuevas partículas virales al inhibir el proceso de apoptosis y alterar la expresión de otros genes celulares [26,27].

Una de las interacciones mejor estudiadas es la que se lleva a cabo entre E6 y la proteína supresora de tumor p53, un factor transcripcional y pieza clave en la coordinación de señales en el estrés citotóxico. Normalmente, p53 se presenta en niveles bajos y es inactivo transcripcionalmente. Sin embargo el daño celular provoca un aumento en sus niveles y su activación por medio de modificaciones post-traduccionales. Una vez activa p53 inicia la reparación del DNA y la detención del ciclo celular y/o apoptosis dependiendo del tipo y la extensión del daño.

El principal mecanismo por el que los VPHs de alto riesgo inactivan a p53 es induciendo su degradación vía ubiquitin-proteosoma. En condiciones normales,

los niveles de p53 son regulados por la ubiquitina ligasa Mdm2, sin embargo durante la infección viral y en condiciones de estrés la degradación de p53 por Mdm2 es inhibida, permitiendo que p53 incremente sus niveles y se active. Los VPH de alto riesgo inducen su degradación formando un complejo con la proteína E6AP (E6 associated protein). La interacción entre E6 y E6AP es por medio de un motivo denominado LXXLL, formado por hélices anfipáticas ricas en leucinas. Este motivo se ha encontrado en diferentes proteínas que interactúan con E6.

La degradación de p53 por E6 no es suficiente para la inmortalización y la transformación celular. Esta se produce por la interacción de E6 con diversas proteínas celulares, lo que altera varias vías de señalización. En la Figura 4 se muestran otros blanco celulares de E6 y sus implicaciones [26,27].

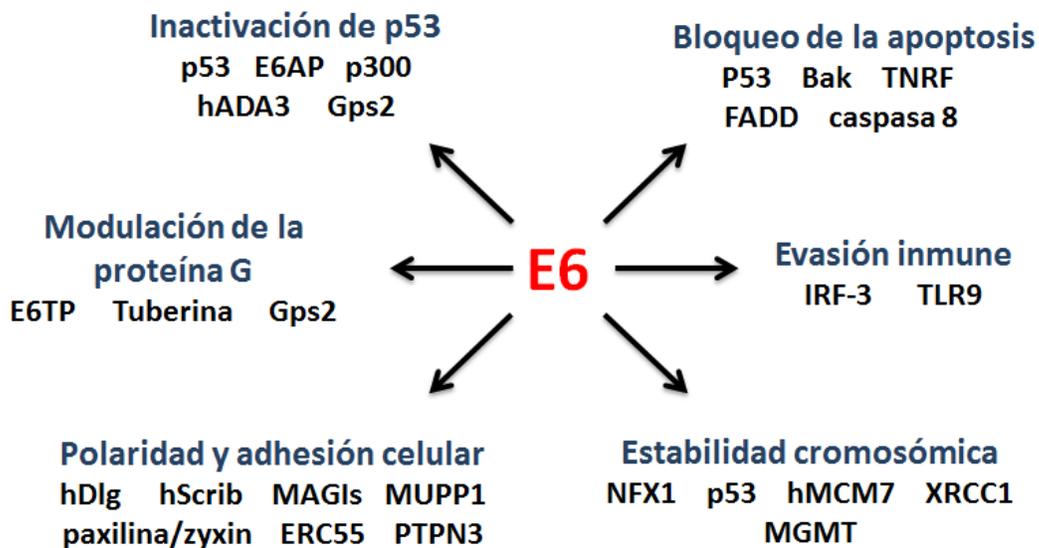


Figura 4. Blancos celulares de E6. La unión E6 con diversas proteínas altera diferentes vías de señalización. Modificado de Howie, 2009 [26].

Transcripción

La transcripción consiste en la formación de una molécula de RNA a partir de la información genética contenida en un segmento de ADN. Mientras que en la replicación se copia el cromosoma entero, la transcripción es más selectiva. La célula restringe la expresión de la información genética a productos génicos necesarios en cada momento, lo que está finamente regulado por secuencias específicas que indican el principio y el fin de los segmentos que deben ser transcritos.

Para el inicio de la transcripción, es necesario la enzima RNA polimerasa, que se une a secuencias promotoras y a diversos factores de transcripción. En eucariontes existen tres RNA polimerasas: La RNA polimerasa I, que transcribe a los RNA ribosomales (rRNA) 18S/28S; la RNA polimerasa II, que se encarga de transcribir a los RNA mensajeros (mRNA) y a algunos RNAs pequeños; y por último la RNA polimerasa III, la cual transcribe a los RNAs de transferencia (tRNA), al rRNA 5s y a otros RNAs pequeños [28].

El inicio de la transcripción en promotores eucariontes requiere de un gran número de factores que se unen antes de que la RNA polimerasa se pueda unir. Estos factores son llamados factores transcripcionales basales, la región de unión entre la RNA polimerasa y estos factores es definida como el núcleo del promotor y contiene todos los sitios de unión necesarios para que la RNA polimerasa se pueda unir y funcionar. La RNA polimerasa II requiere de factores generales de transcripción llamados $TF_{II} X$, donde la X representa la letras de un factor individual [28].

Los promotores usados por la RNA polimerasa II presentan más variación en cuanto a su secuencias, sin embargo muestran una tendencia a que la primera base del mRNA sea una A flanqueada por ambos lados por pirimidinas. Dicha región se denomina iniciador (Inr) y se encuentra entre las posiciones -3 y +5 respecto al sitio de inicio. Muchos promotores tienen una secuencia llamada caja TATA, usualmente localizada aproximadamente a 25 pares de bases río arriba del

sitio de inicio. La secuencia consenso es TATAA y suele ir seguida por otras tres o más pares de bases A-T. La caja TATA tiende a ser rodeada por secuencias ricas en C-G que podrían ser un factor en su función.

Los promotores que no presentan caja TATA suelen contar con otro elemento promotor río abajo (DPE, por sus siglas en inglés, *downstream promoter element*) que se localiza entre +28 y +32 [28].

Transcripción de los VPH

La transcripción del genoma del virus ocurre a partir de solo una de las cadenas del DNA y se inicia en más de una región promotora generando mRNA policistrónicos, con múltiples fragmentos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés), en la figura 5 se muestra el mapa transcripcional del VPH 16. En los VPHs del género α se han caracterizado 2 promotores: el promotor temprano, localizado en la LCR del genoma viral que promueve la expresión de las proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7); y el promotor tardío, que se encuentra dentro del marco de lectura de E7 y codifica para las proteínas tardías L1 y L2. Tanto los transcritos tempranos como tardíos deben poliadenilarse para producir mensajeros maduros que puedan ser exportados al citoplasma y sean eficientemente traducidos. Se han caracterizado dos sitios de poliadenilación, uno para los transcritos tempranos conocido como pAE, localizado en el ORF de L2, y el otro para los transcritos tardíos conocida como pAL localizado dentro de la región 3' UTR del genoma del VPH [29].

El promotor viral temprano, igual que la mayoría de los promotores de la RNA polimerasa II, contiene una caja TATA "río arriba" del sitio de inicio de la transcripción; a su vez contiene potenciadores transcripcionales a los cuales se unen factores de transcripción celulares. Dentro el promotor de los VPH mucosos se encuentran cuatro sitios de unión para el factor transcripcional viral E2, el cual se ha visto que tiene función represora [30].

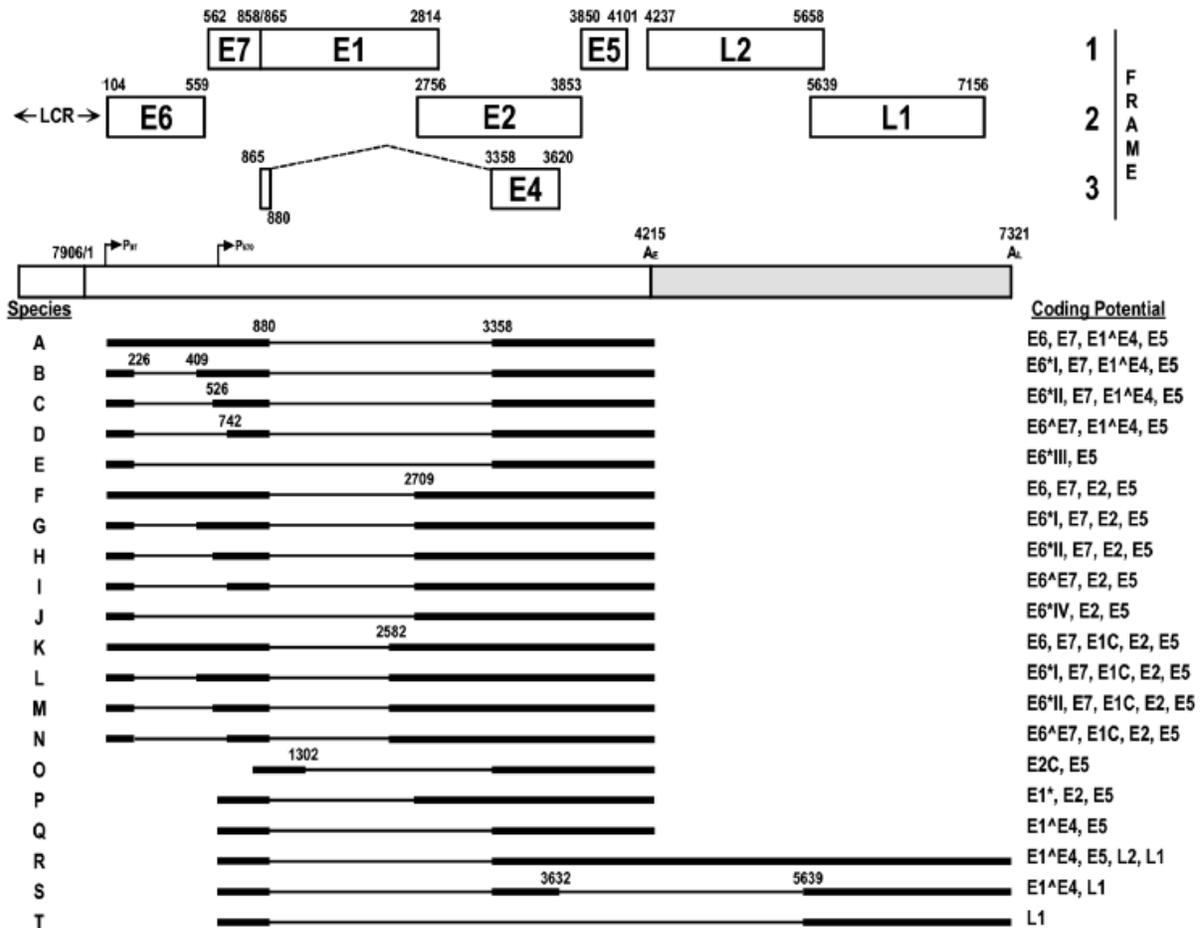


Figura 5. Mapa transcripcional del VPH 16. En el esquema se muestran los diferentes transcritos policistrónicos que dan origen a las proteínas virales. Los transcritos de la A-N se transcriben del promotor temprano. Los transcritos de la O-T se transcriben del promotor tardío. Tomado de Zheng, 2006.

Objetivo general

- Mapear los sitios de inicio de la transcripción que dan origen al mRNA de la proteína E6 de los virus de papiloma humano de alto riesgo en biopsias de tumor de cáncer cervicouterino.

Objetivos particulares

- Tipificar el tipo de VPH encontrado en biopsias de tumor de cáncer cervicouterino.
- Localizar los sitios de inicio de la transcripción de los mRNAs de E6 aislados de diferentes biopsias de tumores de cáncer cervicouterino ya tipificados; mediante el método de amplificación rápida de los extremos de los cDNAs (RACE)

Antecedentes

La transcripción de los VPHs se ha estudiado principalmente en células en cultivo. En estos trabajos se ha encontrado que el transcrito que codifica el ORF del E6 de VPH18 expresa diversas poblaciones de mRNAs que resultan de múltiples sitios de iniciación de la transcripción, de los cuales el que inicia en el nucleótido 105 (derivado del promotor P₁₀₅) es el mayoritario [31-33]. Mientras que las regiones 5' no traducidas (5'-UTRs) de algunos mRNAs tienen 1-6 nucleótidos de longitud, el transcrito mayoritario carece de 5'-UTR (por lo que se denominan mRNA *leaderless*) ya que el nucleótido 105 con el que inicia la transcripción es la A del codón AUG que inicia la traducción (Figura 6) [34].

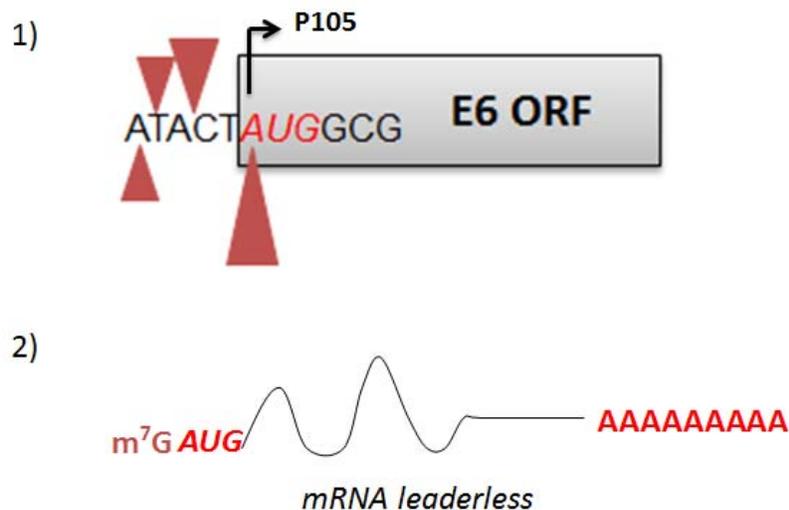


Figura 6. Inicios de la transcripción VPH18. 1) Se muestra los diferentes inicios de la transcripción del VPH18, los triángulos representan los diferentes inicios de la transcripción y el tamaño de estos representa la proporción de cada transcritos, como se nota los que inician en el promotor 105 (P₁₀₅) es el mayoritario. 2) Se muestra un mRNA *leaderless*, el cual carece de 5'UTR y el nucleótido con el que inicia la transcripción es el mismo con el que inicia la traducción.

Así, la estructura de los mRNAs de E6 y E7 de VPH-18, encontrada en diversos tipos celulares contrasta drásticamente con la de los mRNAs eucariontes en general y con los de humano en particular, cuyo codón iniciador necesita una secuencia contexto llamada Kozak, formado por una guanina en la posición +4 y una purina en la posición – 3 respecto a la adenina del codón de inicio. La secuencia consenso Kozak es **AGXXATGGCG** [35, 36]), y cuyas 5'-UTRs tienen una longitud promedio de 210 nucleótidos. De hecho, las 5'-UTRs celulares eucariontes más cortas conocidas tienen 15 nucleótidos de longitud, encontrados en ciertos mRNAs de hongos y de ratón (extremadamente poco frecuentes) [37-39].

Justificación

Las 5'-UTRs son importantes en la regulación de la expresión génica a diferentes niveles postranscripcionales, incluyendo el transporte, la localización celular y la estabilidad del mensajero en el citoplasma. Con respecto a la traducción, juegan un papel crucial en la búsqueda y reconocimiento del codón de inicio, así como en la unión de proteínas reguladoras de la traducción [40]. Dada la rareza de la estructura de los 5'-UTRs encontrada en células y de que no hay mRNAs *leaderless* en eucariontes, es muy importante saber si la producción de mRNAs *leaderless* de la oncoproteína E6, 1) también sucede en tumores y 2) si es un fenómeno característico y general de los diversos VPHs de alto riesgo para regular su expresión genética.

Metodología

Población de estudio

Se obtuvieron un total de 66 biopsias de tumores a través de un protocolo realizado por la Secretaria de Salud y el departamento de servicios ginecológicos del Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Todas las muestras fueron colectadas bajo el consentimiento de las pacientes.

Las pacientes que participaron en el presente estudio fueron diagnosticadas con tumor maligno de cuello uterino, el promedio de edad fue de 55 años, la paciente más joven es de 27 años y la mayor de 90 años. Las pacientes son originarias de 6 estados de la República Mexicana (Distrito Federal, Hidalgo, Morelos, Oaxaca, Guerrero y Veracruz).

Extracción de DNA y RNA

La extracción del DNA de las biopsias de tumores se realizó por medio del *Kit Wizard Genomic DNA Purification kit* de la siguiente manera. A cada muestra se le agrega 600 μL de buffer de lisis y 20 μL de proteinasa K y se deja incubando a 55°C en agitación constante toda la noche. Al día siguiente, se agrega 200 μL de la solución de precipitación de proteínas, se mezcla y se deja incubando en hielo durante 5min. Posteriormente se centrifuga a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min y se recupera el sobrenadante en un tubo nuevo. A la muestra se le agrega 600 μL de isopropanol, se mezcla y se centrifuga a 14,000 rpm durante 5 min, se elimina el sobrenadante, se agrega 600 μL de etanol al 70% y se centrifuga a 14,000 rpm durante 5 min y se elimina el sobrenadante. Finalmente, la pastilla se deja secar y se resuspende en 50 μL de buffer de elución, se cuantifica y se guarda a -20°C hasta su uso.

La extracción del RNA total se llevó a cabo por el método de TRIzol de acuerdo al siguiente protocolo. Cada muestra de tumor fue homogenizada utilizando nitrógeno líquido y un mortero; para evitar contaminación, el mortero se cubre con papel aluminio estéril para cada muestra. Una vez homogenizada la muestra se pasa a un tubo de 1.5 mL, se le agrega 1mL de TRIzol y se deja incubar a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se le agrega 200 µL de cloroformo, se mezcla por vortex durante 15 segundos y se centrifuga a 11,000 rpm a 4°C por 10 min. Posterior a la centrifugación la muestra se separa en 3 fases, estando el RNA en la fase acuosa (fase superior); esta fase se transfiere a un tubo nuevo y se le agrega 500 µL de isopropanol frío, se incuba a -20 °C por 30 min y se centrifuga a 11,000 rpm a 4°C por 10 min. Se remueve el sobrenadante, se adiciona 1 mL de etanol al 70%, se mezcla y se centrifuga a 8,000 rpm, se remueve el sobrenadante por pipeteo. Finalmente se deja secar la pastilla por 15 min, se resuspende en 50 µL de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC) se cuantifica y se guarda a - 80 °C hasta su uso.

Tipificación del tipo de VPH encontrado en biopsias de tumor.

La tipificación de las biopsias se realizó usando la técnica de PCR. Primero se llevó a cabo la amplificación con oligonucleótidos específicos para el VPH16 (Tabla 2), con las siguientes condiciones de reacción: Buffer 1X (2.5 µL), MgCl₂ 2.5 mM (2.5 µL), dNTPs 2mM (2 µL), oligonucleótido directo 10 µM (1 µL), oligonucleótido reverso 10 µM (1 µL), Taq DNA polimerasa (0.6 µL) y DNA 500 ng, volumen final de la reacción 25 µL. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 3.

Tabla 2. Característica de los oligonucleótidos usados para la tipificación

Oligonucleótido	Secuencia	Región del VPH que amplifica	Tamaño del amplificado
F048 VPH-16	5'GAACCGAAACCGGTTAGTAT3'	E6	513 pb
R551 VPH-16	5'ATGGCGCGCTTTGAAGTACCAACA3'		
HZ30 VPH18	5'TTATACTTGTGTTTCTCTCTGCGTCG3'	E6	480 pb
E65' VPH18	5'ATGGCGCGCTTTGAAGTACCAACA3'		

Las muestras que resultaron negativas a VPH16 se amplificaron con los oligonucleótidos específicos para el VPH18 (tabla 2), con las siguientes condiciones de reacción: Buffer 1X (2.5 µL), MgCl₂ 2.5 mM (2.0 µL), dNTPs 2mM (2 µL), oligonucleótido directo 10 µM (1 µL), oligonucleótido reverso 10 µM (1 µL), Taq DNA polimerasa (0.6 µL) y DNA 500 ng, volumen final de la reacción 25 µL. Las condiciones de amplificado se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Programas de amplificación para VPH 16 y VPH 18

Proceso	PCR VPH 16			PCR VPH 18		
	No. Ciclos	Tiempo	Temperatura	No. Ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	5 min.	94 °C	1	5 min.	94 °C
Desnaturalización	35	30 seg.	94 °C	35	30 seg.	94 °C
Alineamiento		30 seg.	50 °C		30 seg.	59 °C
Elongación		30 seg.	72 °C		30 seg.	72 °C
Elongación final	1	10 min.	72 °C	1	10 min.	72 °C

Por último, las muestras que no amplificaron con los oligonucleótidos específicos para VPH16 y VPH18 se amplificaron con los oligonucleótidos PGMY 09/11 [41] que amplifican un fragmento de 450pb y están diseñados para

identificar los demás tipos del VPH de alto riesgo. La reacción se llevó a cabo con las siguientes condiciones de reacción: Buffer 1X (2.5 µL), MgCl₂ 2.5 mM (4.0 µL), dNTPs 2mM (2.5 µL), oligonucleótido directo 10 µM (1 µL), oligonucleótido reverso 10 µM (1 µL), Taq DNA polimerasa (0.4 µL) y DNA 500 ng. El volumen final de la reacción es 25 µL. A sí mismo, se amplificaron con los oligonucleótidos GP5+/6 [42] que amplifica un fragmento 150pb y que al igual que los PGMY 09/11 están diseñados para identificar los demás tipos de VPH de alto riesgo. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: Buffer 1X (2.5 µL), MgCl₂ 2.5 mM (3.5 µL), dNTPs 2mM (2.5 µL), oligonucleótido directo 10 µM (0.5 µL), oligonucleótido reverso 10 µM (0.5 µL), Taq DNA polimerasa (0.6 µL) y DNA 500 ng; volumen final de la reacción 25 µL. Los programas de amplificación para ambos pares de oligonucleótidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Programas de amplificación para PGMY 09/11 y GP5+/6

Proceso	PCR PGMY 09/11			PCR GP5+/6		
	No. Ciclos	Tiempo	Temperatura	No. Ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	5 min.	94 °C	1	10 min.	94 °C
Desnaturalización	40	30 seg	95 °C	40	30 seg	94 °C
Alineamiento		1min.	55 °C		30 seg	48 °C
Elongación		1 min.	72 °C		30 seg	72 °C
Elongación final	1	5 min.	72 °C	1	7 min.	72 °C

Los fragmentos de DNA obtenidos con los oligonucleótidos PGMY 09/11 y GP5+/6 se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Posteriormente los fragmentos de DNA se purificaron con el Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) siguiendo las condiciones del fabricante.

Para terminar la tipificación los productos purificados se secuenciaron con el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing, con las siguientes condiciones de reacción: 2 µL de Ready Reaction Mix, 2 µL de BigDye, 1 µL de

oligonucleótido, 30 ng de DNA y H₂O hasta un volumen final de 10 µL. Se amplifica de la siguiente manera: 96°C por 1min y 25 ciclos de 96°C por 15 seg, 55°C por 15 seg y 60°C por 4 min. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa BioEdit *Sequence Alignment Editor* y se compararon con las reportadas en la base de datos GeneBank del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Tool*)

Mapeo de los sitios de inicio de la transcripción

El mapeo de los sitios de inicio de la transcripción se realizó con la técnica de amplificación rápida de los extremos de los cDNA (5'- RACE, *5-Rapid Amplification of cDNA Ends*) utilizando el kit SMARTer™ RACE cDNA Amplification (Núm. Catalogo 634924) de Clontech, utilizando el siguiente protocolo:

1. Para cada reacción de 5'- RACE mezclar en un tubo de PCR (200 µl):

- RNA (1 µg) 1.0 – 2.75 µl
- 5' –CDS Primer A 1.0 µl
- H₂O hasta un volumen final de 3.75 µl

2. Centrifugarlo 15s a 13,000 rpm

3. Incubar a 72°C por 3 min

4. Incubar a 42°C por 2 min

5. Adicionar 1 µl de SMARTer IIA

6. Agregar a cada reacción lo siguiente

- 5X First-strand Buffer 2.0 µL
- DTT (20mM) 1.0 µL
- dNTP Mix (10mM) 1.0 µL
- RNase inhibidor (40U/ µl) 0.25 µL
- SMARTScribe™ Reverse Transcriptase (100U) 1. µL

7. Incubar a 42°C por 90 min
8. Incubar a 70°C por 10 min
9. Agregar 20 µL de Tricine-EDTA Buffer

Una vez obtenido el cDNA se llevó a cabo la amplificación con oligonucleótidos específico para cada tipo de VPH (las características de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 5). Las reacciones de PCR se montaron de la siguiente manera: 5.0 µL de 10X PCR buffer, 1.0 µL de dNTPs (10mM), 1.0 µL de Advantage 2 Polimerasa Mix (50X), 1.0 µL de UPM (universal primer mix), 1.0 µL de GSP (oligonucleótido específico para cada tipo de VPH), 2.5 µL del cDNA y 34.5 µL de H₂O. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 6.

Tabla 5. Características de oligonucleótidos del 5'- RACE

VPH	Secuencia	Gen	Gene Bank
18	5'GCACTGGCCTCTATAGTGCC3' R1 5'CCCAGTGTTAGTTAGTTTTTCCAATGTGTC3' R2	E6	GQ180792.1
45	5'CAGAAACCATTGAACCCAGCAG3' R1 5'GGAGGAAAACGATGAAGCAGATGG3' R2	E6 E7	KC470260.1
31	5' GGGACGACACACCACACGG 3' R1 5'GACAAGCAGAACCGGACACATCC3' R2	E6 E7	JO4353.1
16	5' CTGTCAAAGCCACTGTGTCCTG3' R2	E6	AY686584
39	5' GTAGTTGCATACACCGAGTCCGAG3' R1 5' GCATGGTTCGGGTTTCATCTATTTC3' R2	E6 E6	KC470249.1

La amplificación de los 5'-UTR se realizó por PCR con las siguientes condiciones: 5.0 µL de 10X PCR buffer, 1.0 µL de dNTPs (10mM), 1.0 µL de Advantage 2 Polimerasa Mix (50X), 1.0 µL de UPM (universal primer mix), 1.0 µL de GSP (oligonucleótido específico para cada tipo de VPH), 2.5 µL del cDNA y 34.5 µL de H₂O. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Programa de amplificación para las 5'-UTRs

Proceso	PCR 5'UTR		
	No. Ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	5 min.	94 °C
Desnaturalización	35	30 seg.	94 °C
Alineamiento		30 seg.	68 °C
Elongación		3 min.	72 °C
Elongación final	1	5 min.	72 °C

Los fragmentos de DNA se migraron electroforéticamente en geles de agarosa al 1.5%, y luego se purificaron con el *Kit QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) siguiendo las condiciones del fabricante.

Los productos fueron clonados dentro del vector pTZ57R/T con el *kit InsTAclone™ PCR Cloning* (Thermo Scientific) (Figura 7) La reacción de ligación se realizó de la siguiente manera: 2 µL de buffer de ligación 5X, 1 µL de vector, 0.4 µL de T3 DNA ligasa, 5 µL de producto de PCR y 1.6 µL de H₂O.

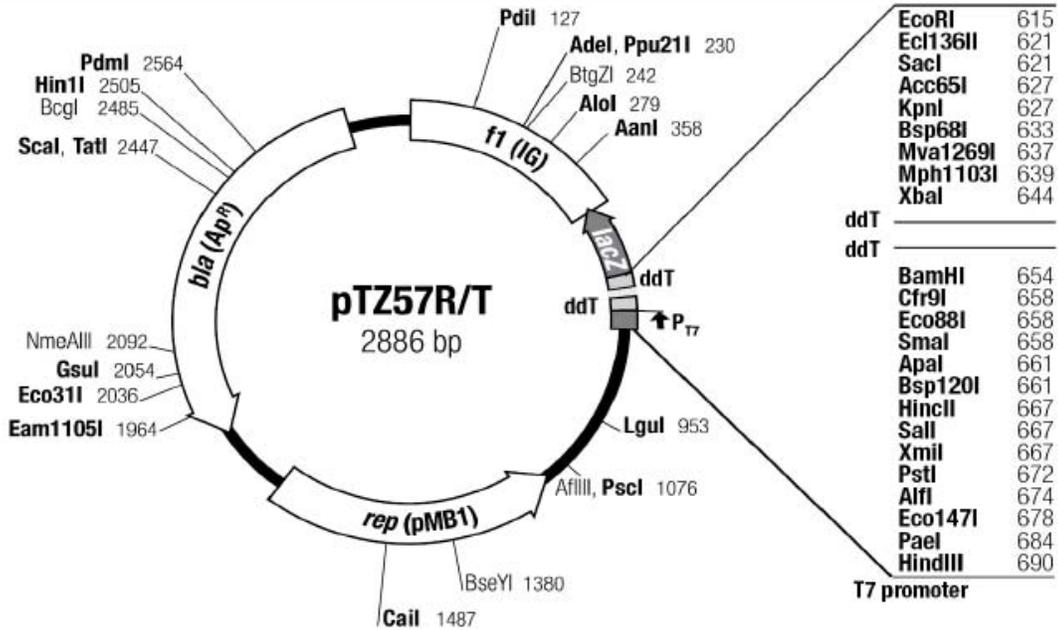


Figura 7. Mapa del vector pTZ57/T de la compañía Fermentas. Mapa del vector TA donde se muestran los diferentes sitios de restricción y en el cual fueron clonados todos los productos de RACE.

Las bacterias químicamente competentes de la cepa DH5 α preparadas con el método de Cl₂Rb fueron transformadas con las ligaciones siguiendo el siguiente protocolo. Las bacterias competentes se descongelan en hielo, en un tubo nuevo se agrega 5 μ L de la ligación y 50 μ L de las bacterias competentes, se incuban en hielo por 30 min, se lleva a un choque térmico a 42°C por 30 seg., después se incuban en hielo por 3min, posteriormente al tubo se le agrega 450 μ L de medio SOC y se incuban a 37°C por 1 hr con agitación (6000 rpm). En una placa de LB con ampicilina a una concentración de 100 μ g/mL se transfiere 100 μ L de la transformación y se deja incubando a 37°C por 18 hrs.

De las colonias que crecieron en la placa se seleccionaron 50 colonias a las cuales se les realizó PCR de colonia con las siguientes condiciones: 2.5 μ L de buffer, 0.5 μ L de dNTPs (10 μ M), 2 μ L de MgCl₂, 1 μ L de oligonucleótido M13F, 1 μ L de oligonucleótido M13R, 0.1 μ L de taq polimerasa (Fermentas) y H₂O hasta un

volumen final de 25 μ L. Se pica una colonia y se diluye en los 25 μ L de la reacción. Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Programa de amplificación de los PCR de colonia

Proceso	PCR de colonia		
	No. Ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	2 min.	94 °C
Desnaturalización	35	30 seg	94 °C
Alineamiento		30 seg	60 °C
Elongación		1 min.	72 °C
Elongación final	1	5 min.	72 °C

Para la observación de los productos del PCR de colonia se llevó a cabo electroforesis en geles de agarosa al 1%, los productos que correspondieron al tamaño esperado se secuenciaron siguiendo el protocolo mencionado anteriormente. El análisis de la secuencia se llevó a cabo con los programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* y *SeqBuilder*.

Resultados

Las 66 biopsias analizadas resultaron positivas a algún tipo de VPH, en total se encontraron 7 tipos virales de los cuales los de mayor prevalencia fueron los tipos 16 y 18 con un 68.1 % y 15.1 % respectivamente. El restante 16.8 % corresponde a los tipos virales 31, 45, 58, 33, 39 (tabla 8).

Tabla 8. Tipificación del tipo de VPH de las muestras de tumor

Tipo de VPH	Número de muestras
16	45
18	10
31	4
45	3
58	2
33	1
39	1

El mapeo de los sitio de inicio de la transcripción se ha hecho en HPV16 y HPV18 en cultivo celular, y se ha encontrado que presentan 5'-UTR pequeños. En el caso de VPH18 se encontraron transcritos que carecen de 5'-UTRs, es decir que el nucleótido con el que inicia la transcripción es la A del codón de inicio de la traducción [31-33, 43]. Por esta razón, en esta tesis decidimos mapear el sitio de inicio de la transcripción de los diferentes tipos de VPH encontrados en biopsias de tumor para observar si otros tipos virales presentan la misma característica de 5'-UTR pequeños. El mapeo de los sitios de inicio de la transcripción se llevó a cabo por la técnica de RACE de los tipos virales 16, 18, 31, 39, 45 y 58. Debido a que solo se obtuvo una biopsia del tipo viral 33, y a que el RNA obtenido no fue de calidad, el mapeo de los sitios de inicio de la transcripción de este tipo viral no se pudo llevar a cabo.

Para los tipos virales 16, 18 y 45 se analizaron 2 biopsias, y para los tipos virales 31, 39, y 58 se analizó 1 biopsia. Los paneles de la figuras 8 muestran las amplificaciones obtenidas. Todas las bandas fueron extraídas, clonadas y alrededor de 50 colonias por banda fueron secuenciadas.

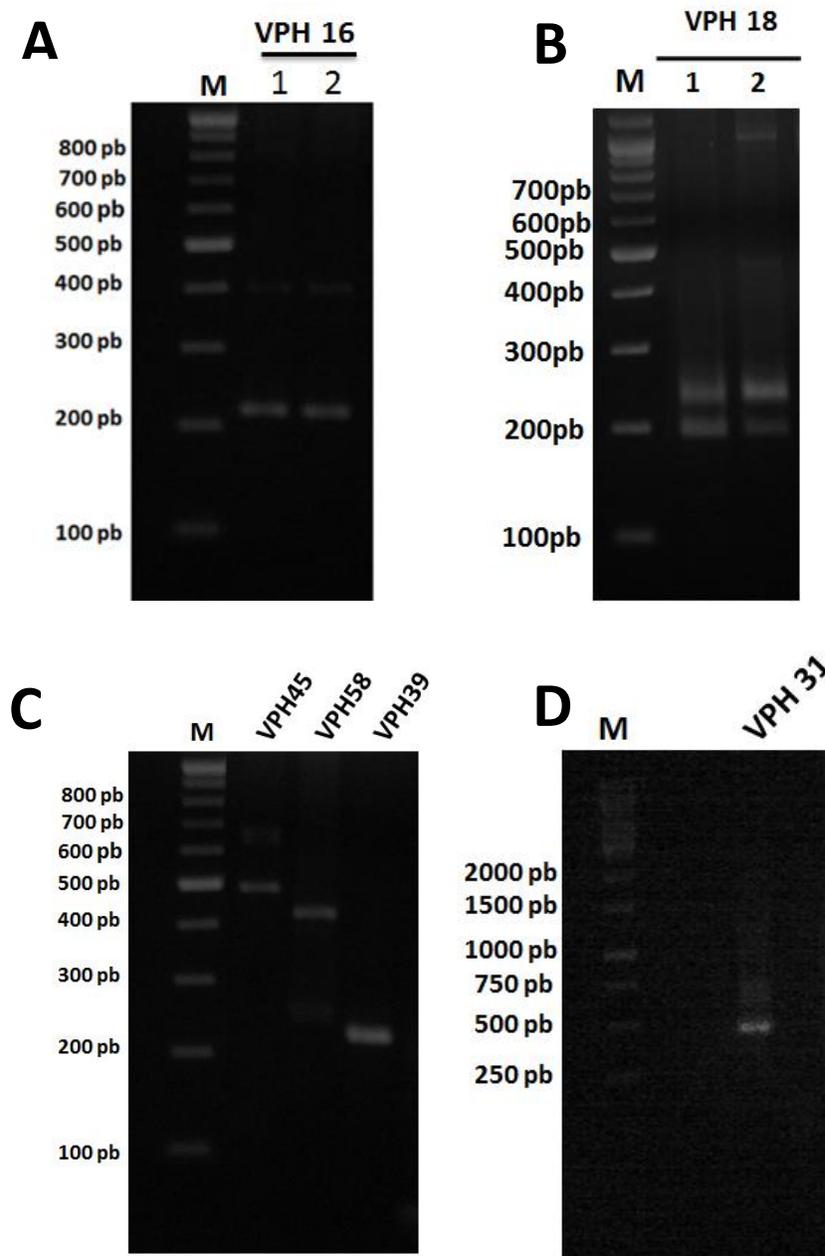


Figura 8. Geles de agarosa mostrando las amplificaciones de los RACE de los cDNAs virales. A) RACE VPH16. B) RACE VPH18, C) RACE VPHs 45, 31, 39 y 58 y D) RACE VPH31. Carriles: M, marcador de peso molecular.

Para el análisis del mapeo de los sitios de inicio de la transcripción, se utilizó como referencia la secuencia de un *cassette* que contiene el kit de RACE que se une al extremo 5' de los mensajeros y el codón de inicio de E6. La secuencia que está entre estas 2 secuencias corresponde al 5'-UTR. En la Figura 9 se muestra un ejemplo del análisis de las secuencias.

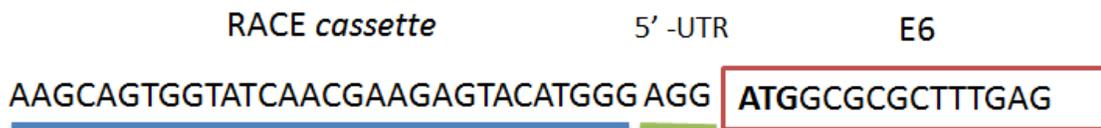


Figura 9. Ejemplo del análisis de las secuencias para el mapeo de los sitios de inicio de la transcripción.

El análisis de las secuencias del VPH 16 mostró 2 poblaciones de mensajeros: una con un 5'-UTR de 9 nucleótidos y la otra con 7 nucleótidos. Para el VPH 18, también se encontraron dos poblaciones de mensajeros, la primera con un 5'-UTR de 3 nucleótidos y la otra con 0 nucleótidos. En el VPH 39, se encontraron dos poblaciones de mensajeros, la primera con un 5'-UTR de 3 nucleótidos y la segunda con un 5'-UTR de 1 nucleótido. Para el VPH 31, se encontró solo una población de mensajeros con un 5' UTR de 9 nucleótidos. En el VPH 45, también se encontró solo una única población de mensajeros con un 5'-UTR de 3 nucleótidos y por ultimo para VPH el 58 se encontró una población con un 5'-UTR de 217 nucleótidos. Como se observa para los tipos virales 18, 39 y 45, todas las poblaciones de mensajeros presentaron 5'-UTR extremadamente cortos que van de 0 a 3 nucleótidos. En la Tabla 9 se muestra un resumen con el mapeo de los sitios de inicios de la transcripción de los tipos virales analizados.

Tabla 9. Mapeo de los sitios de inicio de la transcripción del ORF de E6 de los tipos virales provenientes de tumores de cáncer cervicouterino analizados en esta tesis

Tipo de VPH	Longitud de los 5'-UTR	Número de Secuencias analizadas	Número de tumores analizados
16	9 7	33 16	2
18	3 0	31 9	2
31	9	15	1
39	3 1	35 9	1
45	3	70	2
58	217	44	1

Con el mapeo de los sitios de inicio de la transcripción de los diferentes tipos virales analizados, se pudo observar claramente una tendencia: los tipos virales 18, 39 y 45 con un 5'-UTR corto (entre 0 - 3 nt de longitud) pertenecen a la especie 7 de los α papilomavirus y los tipos virales 16, 31 y 58 con 5'-UTR más largos (entre 7 – 217 nt de longitud) están agrupados en la especie 9 de los α papilomavirus (Figura 10).

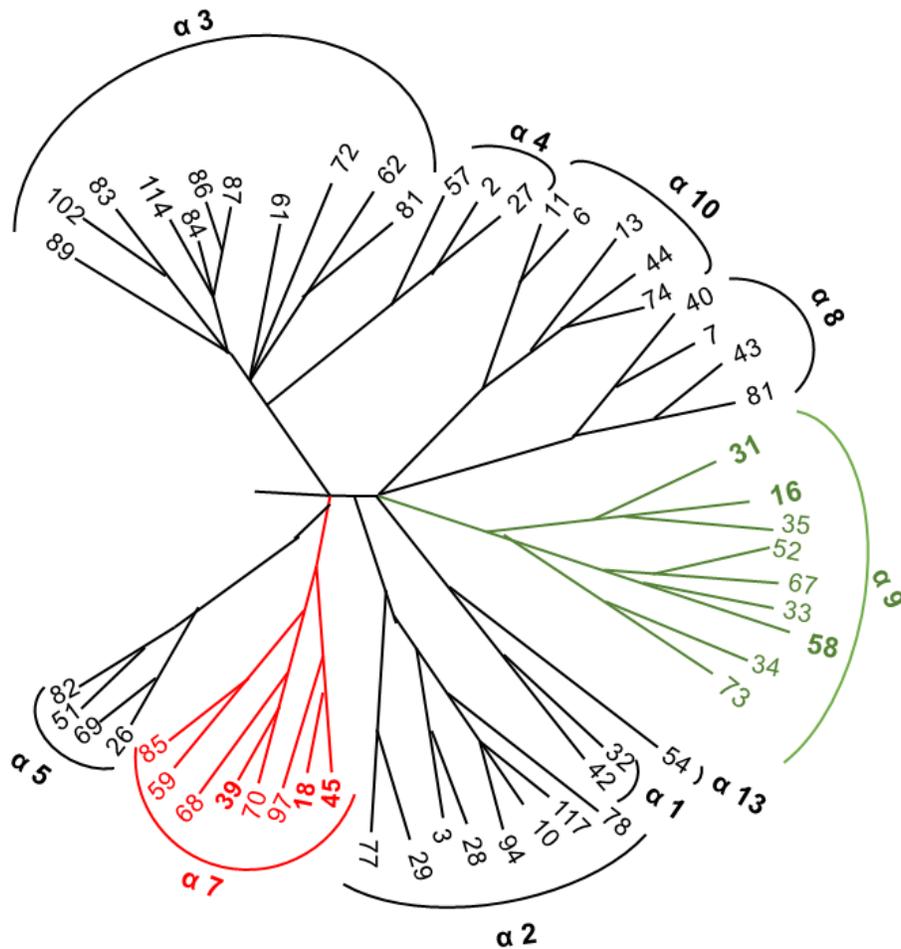


Figura 10. Relaciones filogenéticas de algunas especies del genero α papilomavirus (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 y 10). Los números indican los diferentes tipos de papilomavirus. En verde se muestra la especie $\alpha 9$ en la cual se encuentran agrupados los VPH con 5'-UTR más grandes, con negritas se muestran los tipos analizados. En rojo se muestra la especie $\alpha 7$ donde se encuentran agrupados los tipos virales con 5'UTR corta, con negritas se muestran los tipos analizados. Modificado de Crow, 2012.

Discusión

El VPH es uno de los agentes infecciosos transmitidos por contacto sexual con mayor frecuencia a nivel mundial y a su vez es el principal factor de riesgo para el desarrollo de CaCu. E6 es una de las proteínas virales oncogénicas cuya expresión continua lleva a la inmortalización y transformación celular. En este trabajo se llevó a cabo el mapeo de los sitios de inicio de la transcripción de la oncoproteína E6 en biopsias de tumor.

Para realizar el mapeo de los sitios de inicio de la transcripción, primero se realizó la tipificación de un total de 66 biopsias de tumores, en las cuales se encontraron siete diferentes tipos virales, siendo los tipos virales 16 y 18 los de mayor prevalencias. Juntos, estos dos tipos virales representan más del 80 % del total de las muestras. Los diferentes tipos de VPH de alto riesgo presentan una distribución geográfica por región, siendo el VPH16 el de mayor prevalencia a nivel mundial; a su vez, los tipos virales 18, 45, 31, 33 y 58 son los que presentan mayor variabilidad en su distribución geográfica alrededor del mundo [7, 45]. En Europa los primeros 3 lugares de prevalencia los ocupan los tipos 16, 18 y 31 respectivamente; en África los primeros tres lugares son los tipos virales 16, 52 y 18; en Asia los tipos virales 16, 52 y 58 son los tres primeros lugares; en Norteamérica el de mayor prevalencia es el 16 seguido de 53 y el 52; y por último en Sudamérica los primeros tres lugares los ocupan los tipos virales 16, 58 y 18 [7]. Por su parte, para México, Salcedo en el 2014 realizó un estudio de prevalencia de VPH en mujeres mexicanas, encontrando que tipos virales 16, 18, 31 y 45 ocupan los primeros cuatro lugares de prevalencia respectivamente [46]. Estos datos concuerdan con los obtenidos en este trabajo ya que el primer, segundo, tercer y cuarto lugar de prevalencia se encuentran los tipos virales 16 con un 68.1 %, el 18 con 15.1 % y el 31 con un 6 % y el 45 con un 4.5%. Por otra parte se ha observado que la prevalencia de los tipos virales no solo cambia

alrededor del mundo, sino que también dentro de México, se han realizado estudios en los cuales se observa la prevalencia por regiones (central, sur y oeste), encontrando que en la región central y sur los tipos virales más prevalentes son el 16, 18 y 31, por otra parte para la región oeste los tipos virales con mayor prevalencia son el 16 y 58 [47]. La distribución de los VPH analizados en el presente trabajo concuerda con la distribución que se reporta para la región central de México ya que las biopsias analizadas en el presente estudio se obtuvieron en esta misma zona. Todos estos estudios son importantes para tener un mejor control en la prevención del desarrollo de cáncer cervicouterino, ya que se podría diseñar vacunas específicas de los tipos virales más prevalentes por región.

El mapeo de los sitios de inicio de la transcripción de la oncoproteína E6 en biopsias de tumor de los VPHs de alto riesgo realizado en esta tesis, reveló que los tipos virales 45 y 39 generan 5'-UTR cortos (entre 1 - 3 nt de longitud) al igual que el tipo viral 18, el cual ya se había analizado únicamente en cultivos celulares por diferentes grupos [31-33, 43]. En los estudios ya reportados, se encontraron diferentes sitios de inicio de la transcripción, de los cuales se identifican dos sitios predominantes: el primero se encuentra ubicado en el nucleótido 55, y el segundo (el cual es mayoritario) se encuentra en el nucleótido 105 y genera mensajeros que carecen 5'-UTR. Hay que enfatizar que todos estos estudios se han realizado solamente en líneas celulares [48]. En el presente estudio realizado por primera vez en mapeo de los sitios de inicio de la transcripción en biopsias de tumor de cáncer cervicouterino positivas para el VPH18, se encontraron dos sitios de inicio de la transcripción, los cuales generan dos poblaciones de mensajes uno con un 5'-UTR de 3 nucleótidos y la otra población, la cual es la mayoritaria, sin 5'-UTR. Esto concuerda con los datos reportados anteriormente. Sin embargo, en nuestros datos no se observó el sitio de inicio en el nucleótido 55, debido probablemente a que la presencia de mRNA con 5'-UTR cortas es una característica usada por este tipo viral en la regulación de la expresión de E6 y su función en la transformación celular y la generación de cáncer, esto en biopsias de tumores, ya que se sabe

que mensajeros con 5'- UTRs cortos se traducen con mayor eficiencias que mensajeros con 5'- UTRs largos [49].

Al igual que para el VPH18, los sitios de inicio de la transcripción del VPH 16 también han sido mapeados en líneas celulares por diferentes grupos [44, 50], reportando 5'- UTRs de entre 7 y 9 nucleótidos de longitud. En los resultados obtenidos en este estudio, se encontraron dos poblaciones de mensajeros con 5'- UTRs de 7 y 9 nucleótidos, lo que concuerda con los datos reportados.

Para los tipos virales 31 y 58 no se tienen estudios previos sobre el mapeo de los sitios de inicio de la transcripción. En el presente estudio se encontró que el tipo viral 31 genera mensajeros con un 5'-UTR de 9 nucleótidos, y para el tipo viral 58 sorprendentemente se encontró mensajeros con 5'- UTR de 217 nucleótidos. Esta longitud contrasta con todos los tipos virales analizados.

Los tipos virales 18, 39 y 45 con 5'-UTR corto (entre 0 - 3 nt de longitud) pertenecen a la especie 7 de los α papilomavirus y los tipos virales 16, 31 y 58 con 5'-UTR más largos (entre 7 – 217 nt de longitud) están agrupados en la especie 9 de los α papilomavirus [3, 4].

Las UTRs juegan un papel importante en la regulación post-transcripcional, incluyendo el transporte del mRNA hacia el citoplasma, la localización subcelular, la estabilidad y en la síntesis de proteínas. Los mensajes de la oncoproteína E6 de los tipos virales 18, 45 y 39 contrastan con la longitud promedio reportada para 5'- UTR eucariontes que es aproximadamente de 70 a 200 nucleótidos y en particular para los 5'-UTRs humanos la longitud promedio es de 210 nucleótidos [39, 47, 51]. En otro virus de importancia medica no se han determinado el tamaño exacto de las 5'-UTRs. Las 5'-UTRs más largas reportadas en humanos se encuentran en mensajeros que codifican para factores de transcripción, proto-oncogenes, factores de crecimiento [52]. Por el contrario 5'-UTRs cortos solo se han reportado en parásitos como *Giardia lamblia*, con 5'-UTRs de 0 a 14 nucleótidos de longitud [53] y en *Entamoeba histolytica* que presenta 5'- UTRs de 5 nucleótidos [54].

Conclusiones

- Los tipos de VPH 16 y 18 son los de mayor prevalencia encontrados en biopsias de tumores de cáncer cervicouterino.
- Los VPH tipo 16, 33, 58 presentan 5'-UTR más largas que van de 7-217 nucleótidos y además estos tipos virales pertenecen al grupo 7 del genero α .
- Los VPH tipo 18, 45 y 39 presentan 5'-UTR extremadamente cortas entre 0 y 3 nucleótidos y estos están agrupados en el grupo 9 del genero α .

Literatura citada

1. Zur Hausen, H. (2009) Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, 384: 260-265.
2. Ferlay J, *et al.* GLOBOCAN (2012) v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet].
3. Bernard, H. *et al.* (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401:70–79.
4. de Villiers EM. *et al.* (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324:17-27.
5. Bernard, H.U. (2005) The clinical importance of the importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomavirus. *J. clin. Virol.*, 32S: S1-S5
6. Muñoz, N. *et al.* (2003) Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N. Engl. J. Med.*, 348:518-27.
7. Crow, J. (2012) HPV: The global burden. *Nature*, 488: 7413:S2-3.
8. Lopez-Saavedra A., Lizano-Soberón M. (2006) Cáncer Cérvicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La historia que no termina. *Cancerología*, 1: 31-55
9. Burd E. M. (2003) Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol. Rev.*, 16:1-17

- 10.** Zheng, Z.M. and Mbacker, C.C. (2006) Papillomavirus genome structure, expression and post-transcriptional regulation. *Front. Biosci.*, 11: 2286-2302.
- 11.** Muñoz, N. *et al.* (2006) Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 23 (Suppl. 3): S3/1-S3/10.
- 12.** Day PM. *et al.* (2003) Papillomavirus infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*, 307: 1-11.
- 13.** Li M, *et al.* (1998) Intercapsomeric disulphide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J. Virol.*, 72: 2160-7.
- 14.** Doorbar, J. (2005) The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol.*, 32 (Suppl.1):S7-15.
- 15.** Stubenrauch F. *et al.* (1999) Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol.*, 9: 379–86.
- 16.** Moody C.A. *et al.* (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature*, 10: 550-560.
- 17.** Lambert, P.F. *et al.* (1989). Genetic assignment of multiple E2 gene products in bovine papillomavirus-transformed cells. *J. Virol.*, 63, 3151–3154.
- 18.** Bouvard, V. *et al.* (1994). Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J.*, 13: 5451–5459.
- 19.** Egawa, N. *et al.* (2012). The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J. Virol.*, 86:3276–3283.

- 20.** Bryan, J.T. *et al.* (2001). Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology*, 281 (1), 35–42.
- 21.** Doorbar, J (2013). The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*, 445: 80–98.
- 22.** Petti L, Nilson LA Dimaio D, (1991) Activation of the platelet–derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *EMBO J.*, 10: 845–855.
- 23.** Zhang, *et al.* The E5 protein of humanpapillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon- γ . *Virology*, 310:100–108.
- 24.** Fehrmann, F. *et al.* (2003). Humanpapillomavirus type 31 E5 Protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J.Virol.*, 77:2819–2831.
- 25.** Ganguly,N. *et al.*(2009) Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J. Biosci.*, 34(1): 113–123.
- 26.** Howie, H.L. *et al.* (2009) Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, 384: 324-334.
- 27.** Vande Pol, S.B. *et al.* (2013) Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 445: 115-137
- 28.** Sainsbury S, Bernecky C. (2015) Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature*, 16: 129-143
- 29.** Graham, S.V. (2010) Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol.*, 5:1493–1506.

- 30.** Schwartz, S. (2013) Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology*, 445: 187-196
- 31.** Schneider-Gadicke, et al. (1986) Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J.*, 5: 2285-2292.
- 32.** Wang, X. *et al.* (2011) Construction of a full transcription map of human papillomavirus type 18 during productive viral infection. *J. Virol.*, 85: 8080-8092.
- 33.** Thierry, F. *et al.* (1987) Characterization of a transcriptional promoter of human papillomavirus 18 and modulation of its expression by simian virus 40 and adenovirus early antigens. *J. Virol.*, 61: 134-142.
- 34.** Thierry, F. (2009) Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology*, 384: 375-379.
- 35.** Kozak, M. (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in the eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acid Res.*, 12: 857-872
- 36.** Kozak, M. (2002) Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, 299: 1-34.
- 37.** Mignone, F. *et al.* (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.*, 3:1-10
- 38.** Pesole, G. *et al.* (2000) The untranslated regions of eukaryotic mRNAs: structure, function, evolution and bioinformatic tools for their analysis. *Brief. Bioinformatics*, 1: 236-249.

- 39.** Pesole, G. *et al.* (2001) Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene*. 276: 73-81.
- 40.** Jackson, R.J. *et al.* (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11: 113-127.
- 41.** Gravitt, P. (2000) Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 38: 357–361
- 42.** Husman, R. (1995) The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J. Gen. Virol.*, 76:1057-1062
- 43.** Romanczuk H. *et al.* (1990) Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J. Virol.*, 64:2849-59.
- 44.** Smotkin D, *et al.* (1986) Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 83:4680-4.
- 45.** Clifford G. *et al.* (2003) Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br. J. Cancer*, 88, 63 – 73
- 46.** Salcedo, M., *et al.* (2014) Human Papillomavirus Genotypes among Females in Mexico: a Study from the Mexican Institute for Social Security. *Asian Pac J. Cancer Prev.*, 15:10061–10066.
- 47.** Peralta-Rodríguez, R., *et al.* (2012). Prevalence of human papillomavirus in the cervical epithelium of Mexican women: meta-analysis. *Infectious Agents and Cancer*, 7:26-34.

- 48.** Stenger G. *et al.* (2001) Identification of a promoter in position 56 within the long control region of human papillomavirus type 18. *Arch Virol.*, 146: 2069–2084
- 49.** Araujo P. *et al.* (2012) Before It Gets Started: Regulating Translation at the 5-UTR. *Comparative and Functional Genomics*, 2012:1, 8
- 50.** Rosenstierne M. *et al.* (2003) Identification and characterization of a cluster of transcription start sites located in the E6 ORF of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*, 84:2909-2920.
- 51.** Resch A. *et al.* (2009) Evolution of alternative and constitutive regions of mammalian 5'UTRs. *BMC Genomics*, 10:162-176
- 52.** Davulari R. *et al.* (2000) CART Classification of Human 5 UTR Sequences. *CSHL*,10:1807–1816
- 53.** Adam R. (2000) The *Giardia lamblia* genome. *International Journal for Parasitology* 30: 475-484
- 54.** Bruchhaus I. (1993) Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *DNA Cell Biol.*,12:925-933.