



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EFFECTO DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) SOBRE EL FACTOR CREB3 Y EL
ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO: CONTRIBUCIÓN AL PROCESO
CARCINOGENICO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. QUINTERO ESQUIVEL SILVIA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOAQUÍN MANZO MERINO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALTA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

**EFFECTO DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) SOBRE EL FACTOR CREB3 Y EL
ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO: CONTRIBUCIÓN AL PROCESO
CARCINOGENICO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. QUINTERO ESQUIVEL SILVIA

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

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/980/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **3 de octubre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **QUINTERO ESQUIVEL SILVIA** con número de cuenta **520019270** con la tesis titulada **“EFECTO DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) SOBRE EL FACTOR CREB3 Y EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO: CONTRIBUCIÓN AL PROCESO CARCINOGENÉTICO”**, realizada bajo la dirección del **DR. JOAQUÍN MANZO MERINO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Vocal: DR. MOISÉS LEÓN JUÁREZ
Vocal: DR. CARLO CESÁR CORTÉS GONZÁLEZ
Vocal: DRA. VERÓNICA VALLEJO RUIZ
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA

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

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 21 de octubre de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos Institucionales

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM**. Por el apoyo académico que me permitió desarrollarme en el campo de la investigación científica a través del conocimiento crítico y metodológico, y así lograr obtener el grado de Maestra en Ciencias.

Al **CONACYT** por la beca otorgada con número de CVU 1033968. Que fue de gran apoyo para culminar esta etapa de desarrollo académico.

Al Instituto Nacional de Cancerología por los recursos para la realización de este trabajo a través del proyecto **(017/048/IBI)(CEI/1227/17)** y al CONACyT con el proyecto PRONAI-7 Virus y Cáncer: 303044.

Al **Dr. Joaquín Manzo Merino** por la asesoría directa para la realización de este proyecto, y sus valiosas enseñanzas.

A los **miembros de mi comité tutor**: La Dra. Leticia Rocha Zavaleta y el Dr. Alejandro García Carrancá, por sus aportaciones y comentarios que fueron dando forma a este trabajo.

Agradecimientos a título personal

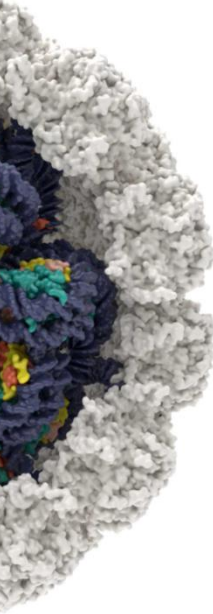
A mi familia por mantener en mí esa chispa de calidez humana y empatía, por enseñarme a ver la vida con alegría y sacar mi mejor sonrisa, a donde voy van conmigo, porque me enseñaron el tesoro más valioso que acompañara mi existencia, y que se refleja en mis valores morales, cada objetivo que me propongo y cada peldaño que avanzo es por su apoyo incondicional, soy muy afortunada con su presencia y cariño.

A mis profesores, amigos y amigas, en especial Zaira, Andy, Sofi, Perla, Caro, Elenka que conocí en el posgrado.

A la **Dra. Marcela Lizano Soberon**, y a los integrantes del laboratorio de Epidemiología y Biología molecular de Virus oncogénicos, y Laboratorio de Agentes Biológicos y Cáncer. Adri, Kelly, Katy, Leo, Roberto, Isme por compartirme sus conocimientos para la elaboración de las técnicas, por su ayuda al momento de interpretar algún resultado y sobre todo gracias al Doctor Joaquín que ha sido una pieza importante en mi desarrollo personal y profesional, sus consejos y su gran ejemplo es de las cosas más valiosas que me llevo de este periodo de la maestría.

Dedicatoria: A mi mamá y hermanas... las amo con todo mi corazón.

"Aquellos investigadores eran mejores aunque no lo hubieran logrado. Yo también quería ser uno de ellos". Ada E. Yonath



Efecto del Virus del Papiloma humano (VPH) sobre el factor CREB3 y el estrés del retículo endoplásmatico: Contribución al proceso carcinogénico

Índice

Lista de figuras

Lista de tablas

Abreviaturas

Resumen	1
Abstract	2
1 Introducción	3
1.1. Cáncer y agentes infecciosos.....	3
1.2. Virus oncogénicos.....	4
1.3. Virus del papiloma humano (VPH).....	5
1.3.1. Estructura del VPH.....	8
1.3.2. Ciclo replicativo del VPH.....	10
1.4. Carcinogénesis inducida por VPH.....	13
1.5. Oncoproteínas del VPH.....	15
1.5.1. Oncoproteína E6 y su contribución a la carcinogénesis.....	16
1.5.2. Oncoproteína E7 y su contribución a la carcinogénesis.....	19
1.6. El estrés del retículo endoplásmico como factor para la carcinogénesis.....	22
1.6.1. Estrés del retículo endoplásmico (ERE).....	22
1.6.2. Respuesta a proteínas desplegadas (UPR).....	23
1.6.3. ERE, UPR y cáncer	25
1.7. CREB3.....	28
1.7.1. CREB3 y sus blancos moleculares.....	32
2. Antecedentes	34
3. Planteamiento del problema	37
4. Justificación	38
5. Pregunta de investigación	39
6. Hipótesis	39
7. Objetivo	39
7.1. Objetivo general.....	39
7.2. Objetivos particulares	39
8. Metodología	40
8.1. Diseño experimental	40
8.2. Maxi preparación: Aislamiento y purificación de DNA plasmídico.....	41
8.3. Líneas celulares.....	42
8.4. Cultivo celular.....	42
8.5. Plásmidos.....	42
8.6. Transfección.....	43
8.7. Silenciamiento.....	43
8.8. Ensayos de PullDown.....	44
8.8.1. Purificación de proteínas de fusión	44
8.8.2. Ensayo de interacción in Vitro.....	44
8.9. Western Blot.....	44

8.9.1. Extracción de proteínas.....	44
8.9.2. Electroforesis de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE).....	45
8.9.3. Transferencia.....	45
8.9.4. Bloqueo e incubación con anticuerpo primario y secundario.....	45
8.9.5. Revelado de proteínas.....	46
8.10. Inmunofluorescencia indirecta.....	46
8.11. Análisis estadístico.....	47
9. Resultados.....	48
9.1. E6 y E7 del VPH16 aumentan los niveles de ERE a través del marcador GRP78.....	48
9.2. E6 del VPH16 induce la activación de CREB3.....	49
9.3. CREB3 presenta una localización nuclear en presencia de E6 de VPH16.....	51
9.4. Las proteínas blanco de CREB3 (HERP y CHOP) aumentan en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH16.....	52
9.5. Niveles de CREB3, HERP y CHOP incrementan en ausencia de E6/E7 en la línea celular positiva a VPH16.....	56
9.6. CREB3 interactúa con la Oncoproteína E6 de VPH16.....	59
10. Discusión.....	60
11. Sumario.....	71
12. Conclusiones.....	72
13. Futuras direcciones.....	73
14. Referencias bibliográficas	74
15. Anexos	84
15.1. Anexo 1: Bibliografía (Tablas).....	84
15.2. Anexo 2: Soluciones y medios de cultivo.....	84
15.3. Anexo 3: Mapa de vector de expresión.....	85
15.4. Anexo 4: Resultado presentado en congreso.....	86

Lista de figuras.

Índice

- Figura 1. Características de una célula cancerosa.
- Figura 2. Estructura y genoma del VPH.
- Figura 3. Esquema representativo del genoma de VPH 16.
- Figura 4. Entrada del virión a capa basal.
- Figura 5. Ciclo del VPH.
- Figura 6. Representación esquemática de la oncoproteína E6.
- Figura 7. Algunas de las dianas moleculares de oncoproteína E6.
- Figura 8. Representación esquemática de la oncoproteína E7.
- Figura 9. Algunas de las dianas moleculares de oncoproteína E7.
- Figura 10. Progresión hacia cáncer mediada por la E6 y E7.
- Figura 11. Activación de proteína sensores de la UPR.
- Figura 12. Estructura de CREB3.
- Figura 13. Estrés del Retículo Endoplasmático (ERE).
- Figura 14. CREB3 como factor regulador del ERE.
- Figura 15. Antecedentes.
- Figura 16 Diseño experimental.
- Figura 17 Expresión de E6 y E7.
- Figura 18 E6 y E7 del VPH16 aumentan los niveles de ERE.
- Figura 19 E6 del VPH16 activa a la proteína CREB3.
- Figura 20. Localización nuclear de CREB3 en presencia de E6.
- Figura 21. E6 y E7 del VPH16 aumentan los niveles de HERP.
- Figura 22. Localización nuclear de CHOP en presencia de E6.
- Figura 23. Representación vía de CREB3 en la transfección de HaCaT.
- Figura 24. Modelo de silenciamiento en la línea celular CaSki.
- Figura 25. GRP78 disminuye al silenciar a E6/E7 y aumenta niveles de CREB3.
- Figura 26. Esquema de modelos celulares empleados.
- Figura 27. E6 del VPH16 interacciona con el factor CREB3.
- Figura 28. Niveles de ERE en el momento de infección por VPH.
- Figura 29. Niveles de ERE en el contexto de integración viral y cáncer.
- Figura 30. ¿Cuál sería el papel de E6/E7 en la regulación de CREB3 para la progresión metastásica?
- Figura 31. Modelo de la interacción entre el trímero E6, E6AP, p53 y CREB3, E6 y p53.
- Figura 32. Vía CREB3 y modelo de interacción CREB3, E6, p53.

Lista de tablas.

- Tabla 1.** Clasificación epidemiológica de los tipos de VPH.
- Tabla 2.** Patologías asociadas al VPH.
- Tabla 3.** Cáncer causados por el VPH.
- Tabla 4.** Principales funciones de las proteínas del VPH.

Abreviaturas

bZIP	Región básica de la cremallera de leucina
BVDV	Virus de Diarrea Viral Bovina
CREB3	CAMP Responsive Element Binding Protein 3
DENV	Virus del Dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
dsDNA	DNA de doble cadena (del inglés <i>double strain DNA</i>).
EBV	Virus de Epstein-Barr
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico (del inglés <i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (del inglés <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
ERE	Estrés del retículo endoplásmico
E6AP	E6 associated protein
HSPG	Proteoglicanos de sulfato de heparán
HSV-1	Virus del herpes simple 1
IARC	Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (del inglés <i>International Agency for Research in Cancer</i>).
LCR	Región larga de control
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocítica
MCV	poliomavirus de células de Merkel
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells
pRb	Proteína de retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico.
SFV	Virus del bosque Semliki
TULV	TULA virus
UPR	<i>Respuesta a proteínas desplegadas (Unfolded protein response)</i>
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VPH	Virus del Papiloma Humano (<i>HPV, Human papillomavirus</i>).
VPH-AR	Virus del Papiloma Humano de alto riesgo.
VPH-BR	Virus del Papiloma Humano de bajo riesgo.
VZV	Virus Varicela Zóster.

RESUMEN

El Virus de Papiloma humano (VPH) se considera el agente de transmisión sexual más común en todo el mundo. Uno de los principales mecanismos que hacen tan prevalente a este virus, es su capacidad de promover una infección productiva y persistente que en algunos casos produce la integración del genoma viral al genoma celular. Dicho evento de integración representa un paso clave en el establecimiento del cáncer, puesto que genera la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7, que son las responsables de interactuar con una plétora de proteínas y perturbar el control del ciclo celular y promover la transformación celular. Estudios recientes han propuesto que estas oncoproteínas son capaces de generar estrés del retículo endoplásmico (ERE). Hasta la fecha, esta poco esclarecido si dichas oncoproteínas son capaces de generar ERE en la historia natural del cáncer inducido por dicho virus.

Una de las vías que responde al ERE es la vía de CREB3, la cual está conformada por la proteína del mismo nombre, la cual es escindida y activada proteolíticamente para llevar la activación de genes específicos río abajo y así responder al ERE generado por diversos agentes, incluyendo infecciones virales. Si el ERE no es resuelto, las células activan diferentes mecanismos de muerte celular, incluyendo autofagia y apoptosis. Dos de los genes blanco de CREB3: HERP y CHOP, regulan la autofagia y apoptosis. Por todo esto es que nos interesamos en determinar la capacidad de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 para modular el ERE a través de CREB3 y sus genes blanco: HERP y CHOP. Encontramos que E6 y E7 son capaces de modular los niveles de CREB3 en un modelo de expresión transitoria aumentando los niveles de HERP y CHOP. Con lo que respecta en el modelo de silenciamiento en la línea celular CaSki HERP y CHOP se ven disminuidos. También encontramos mediante el ensayo de PullDown que la oncoproteína E6 es capaz de interactuar con CREB3. Concluyendo que E6 y E7 del VPH16 son capaces de modular los niveles de CREB3 según el contexto celular.

Palabras clave: *infección persistente, activación proteolítica, ERE, autofagia.*

Abstract

The human papillomavirus (HPV) is considered the most common sexually transmitted agent in the world. One of the mechanisms that make this virus so prevalent is its ability to promote a persistent infection and, in some cases, the integration of the viral genome into the cellular genome. This integration mechanism is a key step in the overexpression of E6 and E7 oncoproteins, which are responsible for interacting with a plethora of proteins and disturbing cell cycle control and promoting cell transformation.

Recent studies have proposed that these oncoproteins can generate endoplasmic reticulum stress (ERE). To date, it is not clear whether these oncoproteins can generate ERE in the natural history of cancer induced by HPV.

One of the pathways that responds to the ERE is CREB3: this pathway is made up of the CREB3 protein, which is proteolytically cleaved and activated to bring about the activation of specific genes downstream to respond to the ERE generated by E6 and E7 in the cell. If the ERE is not resolved, the cells activate different survival mechanisms, such as cell death, including autophagy and apoptosis.

Interestingly, it has been reported that two of the CREB3 target genes: HERP and CHOP, regulate autophagy and apoptosis. For all these reasons, we are interested in determining the capacity of the E6 and E7 oncoproteins of HPV 16 to modulate the ERE through CREB3 and its target genes: HERP and CHOP. We found that E6 and E7 are capable of modulating CREB3 levels in a transfection model and silencing model in the CaSki cell line, we also found by PullDown assay that the E6 oncoproteins can interact with CREB3. Concluding that E6 and E7 of HPV 16 are capable of modulating CREB3 levels according to the cellular context.

Keywords: *persistent infection, proteolytic activation, ERE, autophagy.*

1. INTRODUCCIÓN

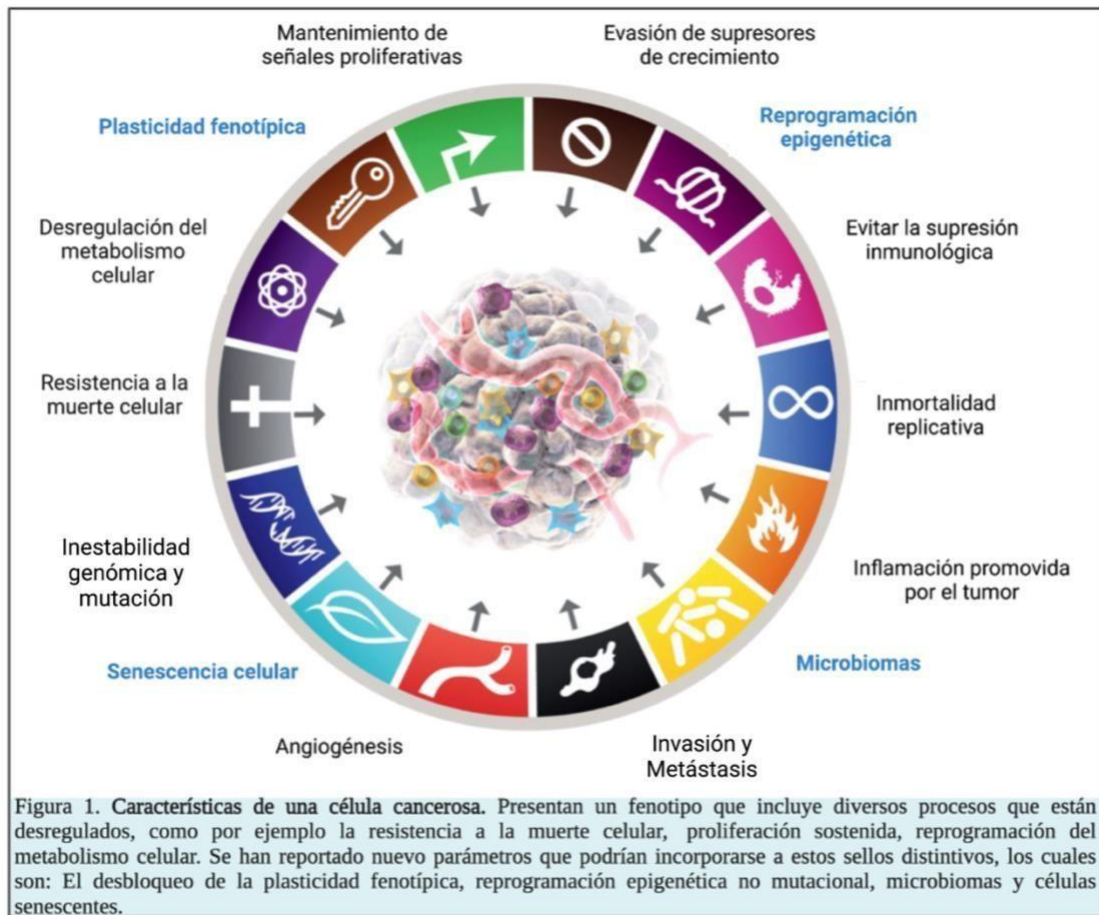
1.1 *Cáncer y agentes infecciosos.*

El cáncer es una de las causas de morbilidad y mortandad en México y en el mundo, debido a su elevada frecuencia desde hace varios años, representa uno de los principales problemas de salud pública en nuestro país, así como consecuencias perniciosas para el bienestar económico y social^{1,2}. El cáncer es un término amplio que se utiliza para referirse a el conjunto de enfermedades que se caracteriza por la acumulación de una serie de cambios que permiten adquirir nuevas funciones y otras capacidades a la célula, se puede originar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo, su principal característica es el crecimiento y proliferación celular descontrolado, sobrepasando sus límites habituales invadiendo partes adyacentes del cuerpo y propagándose a otros órganos^{3,4}. Se ha descrito que el cáncer surge como el resultado de la interacción de múltiples factores, como pueden ser factores genéticos y tres categorías de agentes externos, a saber: carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioletas e ionizantes; carcinógenos químicos, como el amianto, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) y el arsénico (contaminantes del agua y bebida), y los carcinógenos biológicos, como determinados virus, bacterias y parásitos⁵.

Estos agentes pueden promover la expresión de oncogenes o la inhibición de genes supresores de tumores, que regulan múltiples vías de señalización celular involucradas en la proliferación; proporcionando ciertas características y estableciendo el fenotipo crucial de las células tumorales, alterando el ciclo celular, promoviendo la resistencia a la muerte celular, reprogramando el metabolismo celular, activando la invasión y metástasis, entre otros procesos, favoreciendo a un entorno denominado carcinogénesis (*figura 1*)⁶. Cabe mencionar que la carcinogénesis consta de tres etapas: iniciación, promoción y progresión. Esta última es exclusiva de la transformación maligna e implica la capacidad de invadir tejidos a distancia^{7,8}.

Ciertos gérmenes infecciosos, pueden causar cáncer o aumentar el riesgo de que se desarrolle, aumentando las cifras de cáncer con una etiología infecciosa en todo el mundo⁹. La Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer (IARC) ha demostrado que de los 11 patógenos

infecciosos clasificados como carcinógenos del grupo 1, los cuatro más importantes son *Helicobacter pylori*, el **Virus del Papiloma humano (VPH) de alto riesgo**, el Virus de la Hepatitis B (VHB) y el Virus de la Hepatitis C (VHC), en conjunto representan más del 90% de los cánceres relacionados con infecciones en todo el mundo⁴.



Tomado de Hanahan, D 2022.

1.2 Virus oncogénicos.

Actualmente los virus que se sabe causan cáncer en humanos son: VHB, VHC, VPH, poliomavirus de células de Merkel (MCV), virus del herpes humano-8 (HHV-8), Virus de Epstein-Barr (EBV) y el virus linfotrópico de células T humanas-1 (HTLV-1)¹⁰. Los siete tipos de virus oncogénicos (oncovirus) antes mencionados, están implicados en aproximadamente el 12% de todos los cánceres humanos, particularmente en países menos desarrollados y para personas con sistemas

inmunológicos comprometidos¹¹. De manera interesante, la mayoría de los humanos se infectan con al menos uno de los virus oncogénicos conocidos durante su vida. Las células infectadas pueden adquirir características cancerosas, particularmente tras la inmunosupresión o la exposición a estímulos co-cancerígenos¹². Es interesante, el hecho de que los virus oncogénicos causan infección y se transmiten sin que la mayoría de las personas infectadas desarrollen neoplasias, por lo que no inducen el desarrollo de tumores como parte de sus ciclos de replicación viral, curiosamente el cáncer inducido por estos virus es considerado meramente un accidente biológico y, en el curso natural de la enfermedad, las neoplasias resultantes son tan mortales para el virus como lo son para sus huéspedes¹². De todos ellos, el VPH es el causante de la infección de transmisión sexual más prevalente a nivel mundial, y casi el 90% de los cánceres inducidos por el VPH ocurren en mujeres¹³. Por ello la importancia del desarrollo y disponibilidad de nuevas tecnologías y herramientas para la detección temprana de la infección por VPH, así como la implementación de vacunas profilácticas.

1.3 Virus del Papiloma Humano (VPH).

Los papilomavirus (PV) se clasifican taxonómicamente dentro de la familia *Papillomaviridae*, su origen parece estar ligado a cambios en el epitelio de su huésped ancestral, ya que los primeros reptiles surgieron hace unos 350 millones de años¹⁴. Desde entonces, han coevolucionado con sus respectivos huéspedes encontrándose ahora en aves, reptiles, marsupiales y mamíferos. Los virus que evolucionan lentamente con sus huéspedes de esta manera suelen causar infecciones crónicas¹⁵. La diversificación de las variantes y prevalencia de cada tipo viral de los PV, esta relacionada con la migración y el estilo de vida del humano: hombres y mujeres están involucrados en la cadena epidemiológica, siendo acarreadores asintomáticos y transmisores de la infección por este virus¹⁶. Los papilomavirus son una familia de virus pequeños, no envueltos que tienen tropismo por los estratos basales de epitelios cutáneos y de mucosas. La caracterización de los PV implica la secuenciación del genoma viral y la comparación con genomas conocidos, por lo tanto los PV se clasifican en genotipos, cada genotipo difiere de otro en al menos un 10% de secuencia en la región del gen L1 altamente conservada¹⁷. Se han agrupado en 53 géneros, de los cuales 5 géneros incluyen PV que infectan a humanos: **α** (Alfa), **β** (Beta), **γ** (Gamma), **μ** (Mu) y **ν** (Nu) que

actualmente incluyen más de 240 genotipos según lo reportado Papillomavirus Episteme (PaVE)¹⁷. Los tipos virales incluidos en los géneros **β**, **γ**, **μ** y **ν** infectan epitelios cutáneos, ocasionando la aparición de lesiones benignas proliferativas persistentes (verrugas comunes y plantares). En particular para los VPH- **β**, se han identificado más de 50 tipos, asociándose con el desarrollo de cáncer de piel no-melanómicos bajo ciertas condiciones preexistentes como la inmunosupresión y la exposición continua a rayos ultravioleta (UV)¹⁸. Con lo que respecta al género **α**, contiene 64 tipos de VPH que infectan principalmente a los epitelios de las mucosas, aproximadamente 40 de ellos pueden infectar el tracto anogenital¹⁹. Los VPH- **α** se clasifican como de alto o bajo riesgo según la probabilidad de que una infección por el VPH pueda conducir al desarrollo de cáncer. Hasta el momento se ha reportado que 80% de la población experimentará una infección anogenital por VPH- **α** durante su vida, de ahí su relevancia en salud pública¹⁸.

Los tipos virales que tienen un bajo potencial oncogénico, son denominados como VPH de bajo riesgo (VPH-BR) (Tabla 1), donde se encuentran los tipos **6** y **11** los cuales están asociados al desarrollo de verrugas genitales y casos de papilomatosis respiratoria recurrente (PRR), por otro lado 14 tipos virales se han denominado VPH de alto riesgo (VPH-AR) que son capaces de producir cambios celulares que conducen al cáncer, siendo los más importantes los tipos **16** y **18** (Tabla 1). Hay tres tipos de VPH probable alto riesgo: 26, 53 y 66 que se asocian con el cáncer del cuello uterino, vagina y vulva^{20,21,22}.

Tabla 1 . Clasificación epidemiológica de los tipos de VPH que infectan las mucosas.

<i>Grupo</i>	<i>Tipos de VPH</i>
De alto riesgo establecido u oncogénico	16, 18 , 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 68, 73, 82
De bajo riesgo establecido	6, 11 , 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108
Probablemente de alto riesgo	26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 85 y 97

Tomado de Graham S et al., 2017.

Los VPH 16 y 18 son los tipos virales encontrados con mayor frecuencia en neoplasias malignas, se ha reportado que están asociados al desarrollo de cáncer de cuello uterino, ano, vagina/vulva, pene, orofaringe, cavidad oral/laringe y ciertos tumores de cabeza y cuello, siendo el tipo 16 en todos estos casos el más prevalente^{23,24,25} (Tabla 2).

Tabla 2. Patologías asociadas al VPH.

<i>Enfermedad</i>	<i>Patología</i>	<i>Asociación con tipos de VPH</i>
Papilomatosis respiratoria recurrente	Papilomas en las vías respiratorias	6, 11
		6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 89
Verrugas anogenitales	Verrugas externas	6, 11
	Papilomas del cuello uterino	
Precánceres y Cánceres anogenitales	Grupo 1: Carcinogénicos para los humanos	16 , 18, 31, 33, 45, 51, 52
	Grupo 2A: Probablemente Carcinogénicos para los humanos	68
	Grupo 2B: Posiblemente Carcinogénicos para los humanos	26, 53, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 73, 82
Lesiones orales	Papilomas orales	2, 6, 7, 11, 16, 18, 32, 57
	Papilomas Laríngeos	6, 11
	Carcinoma orofaríngeo	16 , 18

Tomado de Nuñez- Troconis et al., 2022.

Normalmente las infecciones por VPH se resuelven sin ninguna intervención a los pocos meses de infectarse, alrededor del 90% de estas infecciones desaparecen en 2 años, sin embargo, si la infección persiste y hay fallas en la respuesta del sistema inmune para eliminar los VPH-AR, se puede promover el desarrollo de cáncer²⁶(Tabla 3).

Tabla 3. Cáncer causados por el Virus de papiloma humano.

Sitio del cáncer	Casos	Atribuidos al VPH	Fracción atribuible	Hombres	Mujeres
Cuello uterino	528 000	528 000	100%	-	528 000
Ano	40 000	35 000	88%	17 000	18 000
Vagina/vulva	49 000	20 000	41%	-	20 000
Pene	26 000	13 000	51%	13 000	-
Orofaringe	96 000	29 000	31%	24 000	6 000
Cavidad oral/laringe	358 000	9 000	2.4%	7 000	2 000
Total	1097 000	634 000	58%	61 000	574 000

Tomado de Doorbar, J et al., 2020

1.3.1 Estructura del VPH.

Los VPH son virus pequeños que presentan una cápside icosaédrica con un tamaño aproximado de 55 nm de diámetro, comprende 360 copias de la proteína mayor (L1), organizada en 72 capsómeros de dos tipos diferentes: 60 pentámeros hexavalentes y 12 pentámeros pentavalentes. Así como un monómero de la proteína menor (L2) que está asociado con cada pentámero L1 del virión, en su interior contiene al genoma circular de DNA de doble cadena de aproximadamente 8,000 pb (Double-stranded DNA, por sus siglas en inglés dsDNA) (figura 2)^{27,28}.

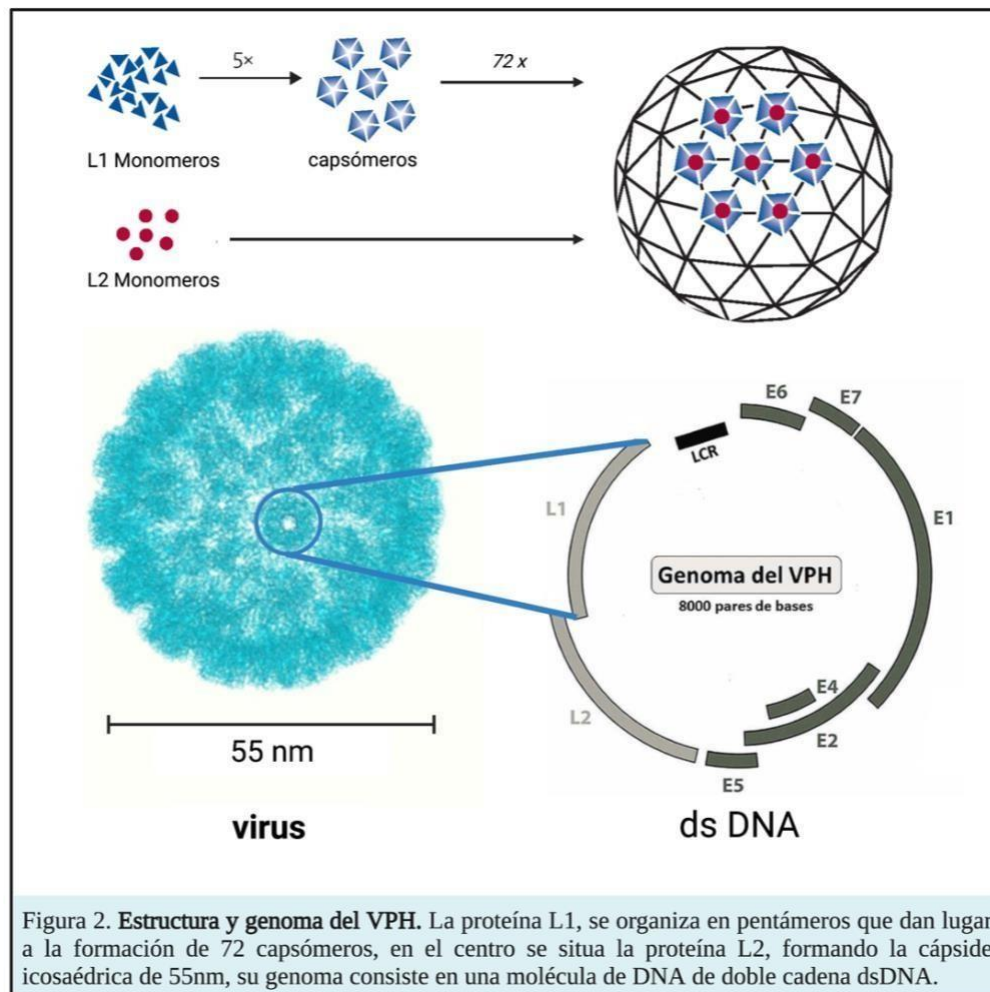
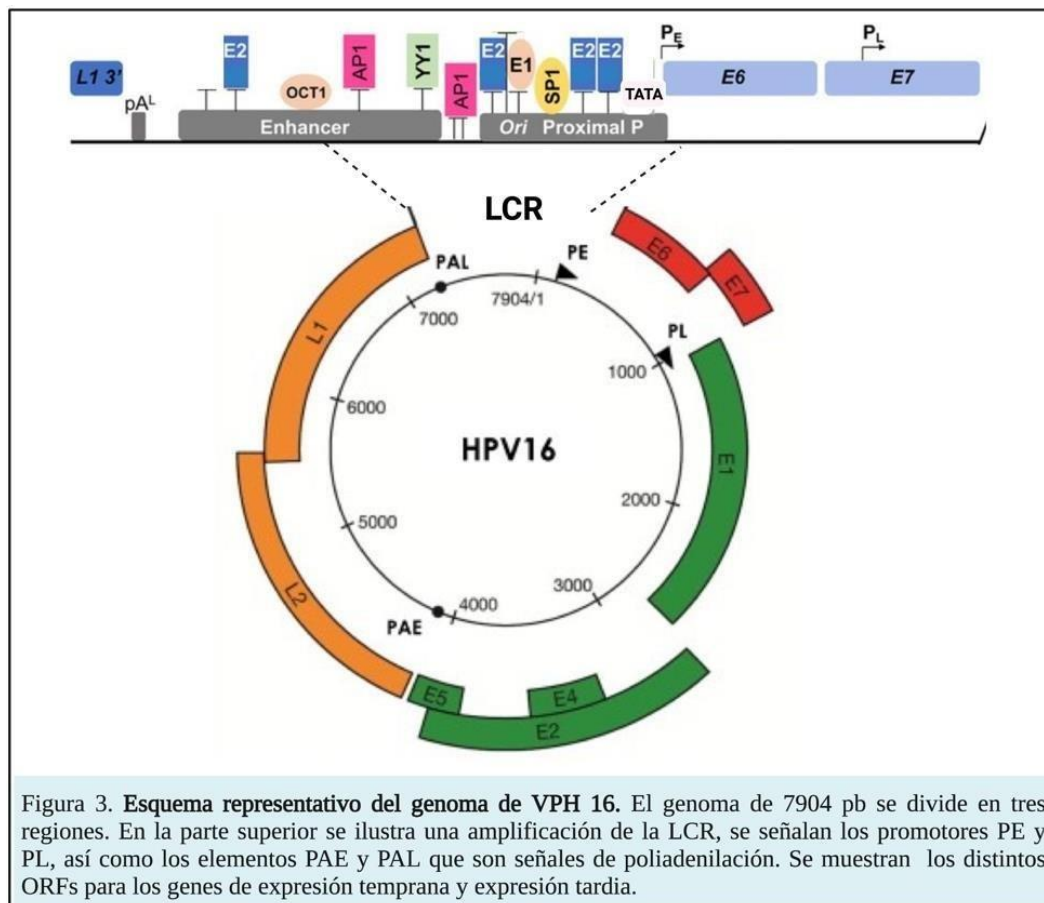


Figura 2. Estructura y genoma del VPH. La proteína L1, se organiza en pentámeros que dan lugar a la formación de 72 capsómeros, en el centro se sitúa la proteína L2, formando la cápside icosaédrica de 55nm, su genoma consiste en una molécula de DNA de doble cadena dsDNA.

Tomado y modificado de John Doorbar, 2020.

La organización del genoma del tipo 16 es similar a los demás tipos de VPH, y como sigue siendo uno de los más prevalentes a nivel mundial, se procederá a su descripción específica para este trabajo²⁹. Su genoma es de doble cadena circular de 7904 pb, está dividida en tres regiones

funcionales: **1)** región no codificante larga de control **LCR** (por sus siglas en inglés) también llamada URR (región reguladora río arriba o “*untranslated regulatory región*”) que contiene el origen de replicación viral (Ori) y los elementos necesarios para la replicación y transcripción de los genes virales (promotor, enhancer); así como sitios de unión para factores de transcripción celulares: AP1, SP1, Oct1, de manera particular se ha determinado que el VPH16 tiene dos elementos promotores conocidos como PE o promotor temprano (también denominado p97) y PL o promotor tardío (también denominado p670) que regulan la expresión de mRNA empalmados diferencialmente durante la diferenciación epitelial (posición 97 y 670 en el genoma de VPH16 sitio 5’cap/sitio de iniciación del RNA de las transcripciones virales)³⁰ (*figura 3*) **2)** región de genes tempranos (**E: early**) codifica para las proteínas no estructurales E1, E2, E4, E5, E6 y E7; y **3)** región de genes tardíos (**L: late**), que codifica para las proteínas estructurales mayor L1 y menor L2 que componen la cápside, las cuales se expresan en la fase final del ciclo viral, cabe



destacar que la proteína L2 tiene una interacción directa con el DNA viral, lo cual se describe más adelante^{31,32}.

1.3.2 Ciclo replicativo del VPH.

Los VPH muestran tropismo por el epitelio escamoso, el ciclo viral depende de la diferenciación del epitelio escamoso del huésped, infectan los queratinocitos en la capa basal de epitelios que quedan expuestos como resultado de pequeñas microlesiones³³. La proteína L1 facilita la unión de los viriones a la superficie celular, que se unen inicialmente a las cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) de los proteoglicanos de sulfato de heparán (HSPG), también puede unirse a la matriz extracelular (ECM) a través de interacciones con HSPG y laminina-332. (figura 4)^{34,35,36}.

Posteriormente inicia el proceso de endocitosis, en el cual el endosoma formado (endosoma temprano) comienza un proceso de maduración (endosoma tardío) fusionándose finalmente con los lisosomas, en este punto se lleva a cabo el desensamble del virión y el rescate del episoma mediado por la proteína L2, formándose el complejo L2-DNA viral, las vesículas con L2/vDNA salen de la red trans-Golgi (TNG) y se asocia con microtúbulos. Se postula que L2 interactúa con ciertas proteínas nucleares como Hsc270, para facilitar el transporte del genoma viral del citoplasma al núcleo, por otro

lado también se sugiere que L2 puede interactuar con los cromosomas condensados utilizando su dominio de unión a cromatina para asegurar que las vesículas L2/vDNA permanezcan en el huso mitótico^{37,38,39,40}. Una vez que el genoma viral se encuentra dentro del núcleo, se mantiene de manera episomal, enseguida el promotor de

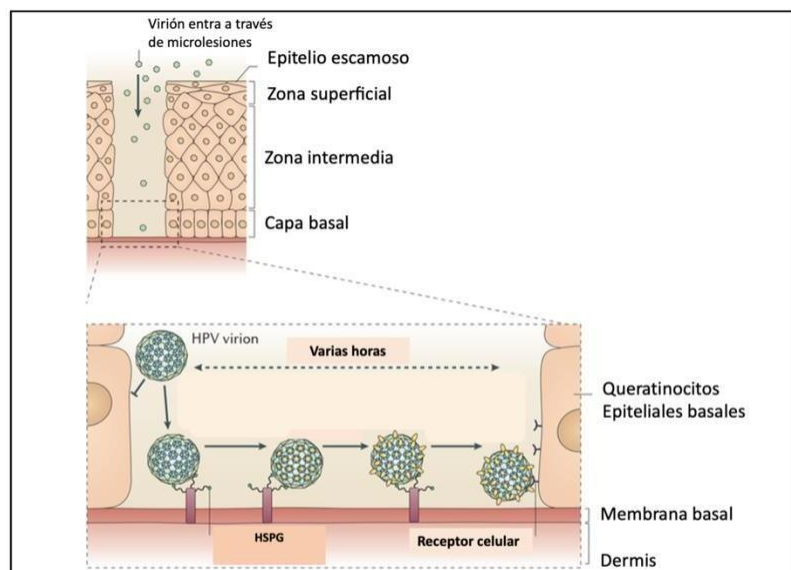


Figura 4. Entrada del virión a capa basal. Accede a través de microlesiones, la proteína L1 cargada positivamente facilita la unión del virión a la MEC la cual contiene HSPG cargados negativamente, se une a HSPG o laminina 332, lo que genera cambios conformacionales en la cápside viral, el extremo N de L2 queda expuesto, el cual contiene un sitio de escisión de furina, el N terminal es escindido, permitiendo la unión a un receptor secundario (EGF, EGFR, integrina $\alpha 6$, vimentinas).

transcripción temprana se activa en las células basales⁴¹. Las proteínas virales E1 y E2 son de las primeras en expresarse, E1 participa en el mantenimiento del material genético viral episomal (no integrado al genoma celular), aproximadamente 10-100 número de copias por célula, mientras que la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 se encuentra parcialmente reprimida por E2 debido a que algunos factores de transcripción, incluido Sp1, así como las proteínas de unión a la caja TATA, tienen secuencias de unión que se superponen en los sitios de unión de E2, lo que da como resultado una regulación negativa de la transcripción a través de la competencia⁴².

E1 y E2 forman un complejo para reclutar la maquinaria de polimerización celular y factores accesorios para la replicación del genoma^{43,44}. Tras la diferenciación, la transcripción de los genes virales cambia del promotor temprano regulado por E2 al promotor tardío independiente de E2, lo que da como resultado altos niveles de transcripción de E1 y E2 que conducen a la amplificación viral. A medida que los queratinocitos se van diferenciando, migran de la membrana basal hacia la

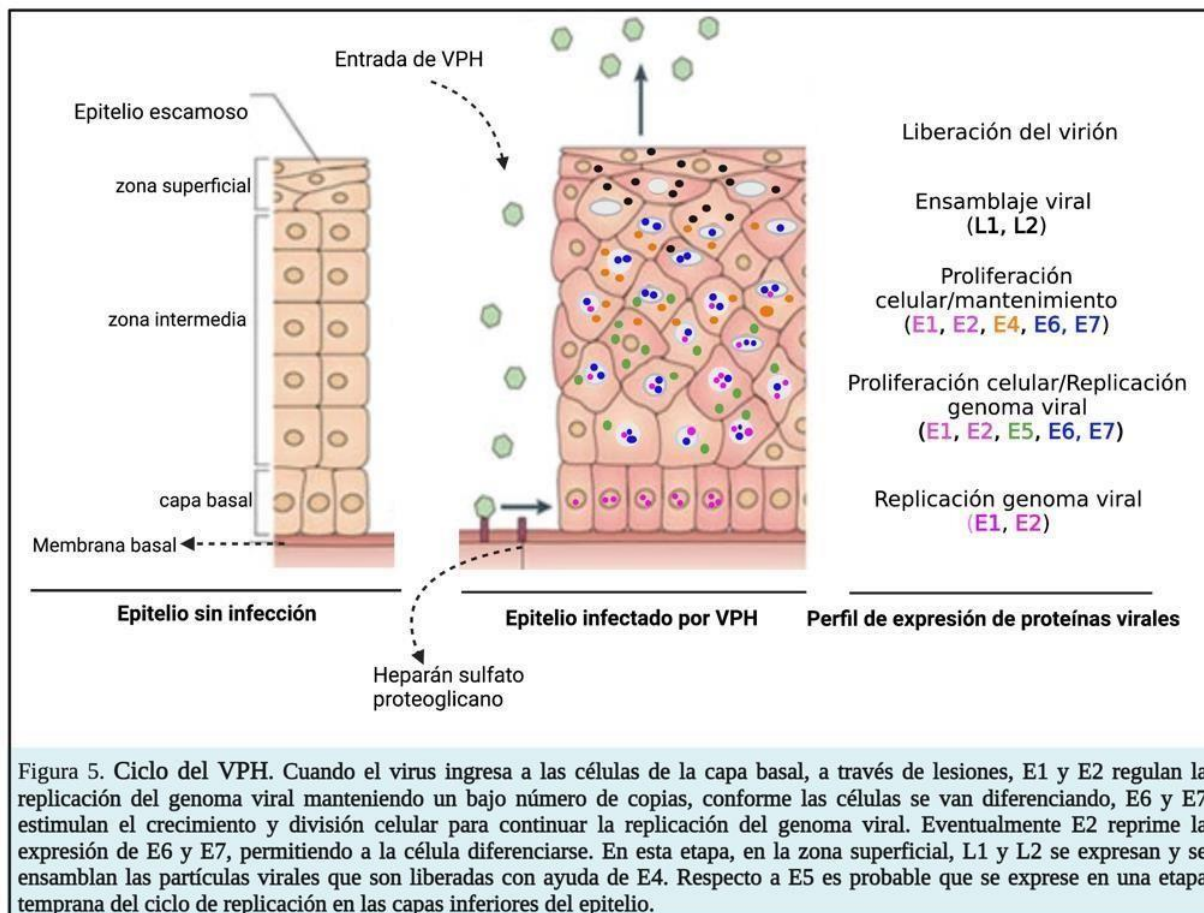


Figura 5. Ciclo del VPH. Cuando el virus ingresa a las células de la capa basal, a través de lesiones, E1 y E2 regulan la replicación del genoma viral manteniendo un bajo número de copias, conforme las células se van diferenciando, E6 y E7 estimulan el crecimiento y división celular para continuar la replicación del genoma viral. Eventualmente E2 reprime la expresión de E6 y E7, permitiendo a la célula diferenciarse. En esta etapa, en la zona superficial, L1 y L2 se expresan y se ensamblan las partículas virales que son liberadas con ayuda de E4. Respecto a E5 es probable que se exprese en una etapa temprana del ciclo de replicación en las capas inferiores del epitelio.

superficie del epitelio y dejan de dividirse, en ese momento el promotor dependiente de diferenciación se activa conduciendo al incremento en la expresión de E6 y E7, reactivando la síntesis de DNA celular e inhibiendo la apoptosis, retardando la diferenciación y promoviendo la proliferación celular, este proceso está regulado por E2⁴⁵.

Una vez establecida la infección, las células comienzan a diferenciarse permitiendo que se expresen otros genes como E5 el cual promueve proliferación celular y evade al sistema inmune al inducir la pérdida de la expresión de MHC I en las células infectadas, evitando la presentación de antígenos virales a las células T efectoras. La oncoproteína E5 se une e inhibe la actividad de la subunidad de 16kDa de la V-ATPasa, alterando la acidificación endosomal, EGFR requiere acidificación endosomal para la disociación de su ligando del receptor y la subsiguiente degradación. La unión de E5 a V-ATPasa interrumpe la acidificación y como resultado, aumenta la activación de EGFR^{46,47}. Así mismo, E5 contribuye a la amplificación del genoma a través de su capacidad para estabilizar y mejorar la señalización del EGFR⁴⁸.

Por otro lado, la proteína E4 presenta la capacidad de unión a la queratina y una capacidad de reorganizar la red de citoqueratina en la periferia provocando el colapso de las redes de queratina. La acumulación de E4 en o alrededor del inicio de la amplificación del genoma, coincide con la activación del promotor (p670 en VPH16). Como consecuencia se generan miles de copias del genoma viral y se desencadena la expresión de los genes de la cápside L1 y L2 para el ensamblaje de los viriones que son liberados tras la muerte de las células que alcanzan la superficie, estos viriones están listos para infectar nuevas células^{49,50}.

En células persistentemente infectadas la sobreexpresión de E6 y E7 conduce a la acumulación de mutaciones que con otros factores favorecen la progresión hacia cáncer, estudios recientes han propuesto que estas oncoproteínas se acumulan en el RE^{51,52}. En la tabla 4 se resume las funciones de las proteínas tempranas y tardías del VPH en el ciclo viral, así como su actividad.

Tabla 4 . Principales funciones de las proteínas del VPH.

Proteína	Función en el ciclo viral	Actividad
E1	Replicación del genoma viral.	Actividad de unión a DNA, helicasa y ATPasa.
E2	Transcripción de genes virales Replicación del genoma viral Mantenimiento del genoma viral.	Transactivación/trans-represión, actividad de unión a DNA, segregación mitótica del DNA viral.
E4	Participa en la fase productiva del ciclo viral, se asocia al proceso de liberación de partículas virales.	Destrucción de la red de queratina e inducción de arresto del ciclo celular en fase G ₂ M.
E5	Involucrada en la proliferación e inhibición de la apoptosis.	Interviene en varias vías de señalización celular asociadas a factores de crecimiento.
E6	Reactivación de los mecanismos celulares de replicación, proliferación, inmortalización, inhibición de la apoptosis. Mantenimiento del genoma viral.	Interacción e inducción de la degradación de varias proteínas celulares como p53, E6AP, c-Myc, FADD, Caspasa 8 y proteínas con dominios PDZ.
E7	Reactivación de los mecanismos celulares de replicación, proliferación, inmortalización. Mantenimiento del genoma viral.	Interacción e inactivación con varias proteínas celulares como Rb, HDAC, E26F, p21, p27, CDK/ciclina, ATM, ATR.
L1	Principal proteína de la cápside.	Proteína mayoritaria que conforma los capsómeros.
L2	Proteína menor de la cápside.	Proteína minoritaria que conforma los capsómeros, además participa en la introducción del genoma viral dentro del núcleo y posteriormente en el encapsulamiento de este en las etapas tardías de la replicación viral.

Tomado y modificado de Egawa, N. 2017

1.4 Carcinogénesis inducida por VPH.

La infección con VPH de alto riesgo y las funciones de sus oncoproteínas son necesarias, más no suficientes, para la progresión hacia cáncer²⁴. Entonces, además de la infección persistente, existen otros factores que participan en la carcinogénesis, donde la integración del genoma viral

al genoma celular se ha postulado como un evento clave en este proceso⁵³. A la fecha, no se han identificado de manera específica sitios en los que se lleva a cabo la integración del genoma viral; sin embargo, se ha detectado que ocurre en sitios frágiles de regiones de inestabilidad genómica. En las etapas tempranas de la infección los genes E6 y E7 son reprimidos por la proteína E2, la integración viral conlleva al rompimiento del marco abierto de lectura de E2, por lo que se pierde la regulación negativa de los oncogenes virales E6 y E7, evento que resulta en un aumento en la expresión y estabilidad de los transcritos que los codifican⁵⁴.

En el proceso de la amplificación del genoma viral en queratinocitos diferenciados, el VPH altera los mecanismos de proliferación y de diferenciación celular en la que naturalmente la síntesis de DNA está inhibida, esto es posible por la interacción de las oncoproteínas con diferentes proteínas celulares⁵⁵. Los mecanismos celulares involucrados están controlados por varios factores, principalmente los miembros de la familia Rb. La proteína E7 del VPH se une a estos factores celulares y los marca para su degradación, liberando y activando el factor de transcripción E2F, de esta manera se inicia la expresión de los genes involucrados en la síntesis de DNA. Si bien todas las proteínas E7 de los diferentes papilomavirus se unen a miembros de la familia Rb, las proteínas E7 de los virus de alto riesgo se unen con mucha mayor afinidad. La unión de E7 a Rb puede conducir a la inhibición del crecimiento celular y apoptosis de manera dependiente de p53. Como resultado, las proteínas E6 de los virus de alto riesgo han evolucionado para marcar a p53 para su degradación, previniendo la inhibición del crecimiento celular. El efecto combinado de las proteínas E6 y E7 de los virus de alto riesgo para mantener la fase S en las células diferenciadas resulta en la supresión de los puntos de control del ciclo celular. En células persistentemente infectadas la sobreexpresión de E6 y E7 conduce a la acumulación de mutaciones que con otros factores favorecen la progresión hacia cáncer. La carcinogénesis asociada al VPH es un proceso de varios pasos que involucra la acumulación de alteraciones genéticas en las células tales como: inestabilidad genética, inmunodeficiencia, mantenimiento de señales de proliferación celular, evasión de supresores del crecimiento, inmortalidad replicativa, resistencia a la muerte celular, desregulación de la energía celular, angiogénesis, invasión y metástasis^{56,57}.

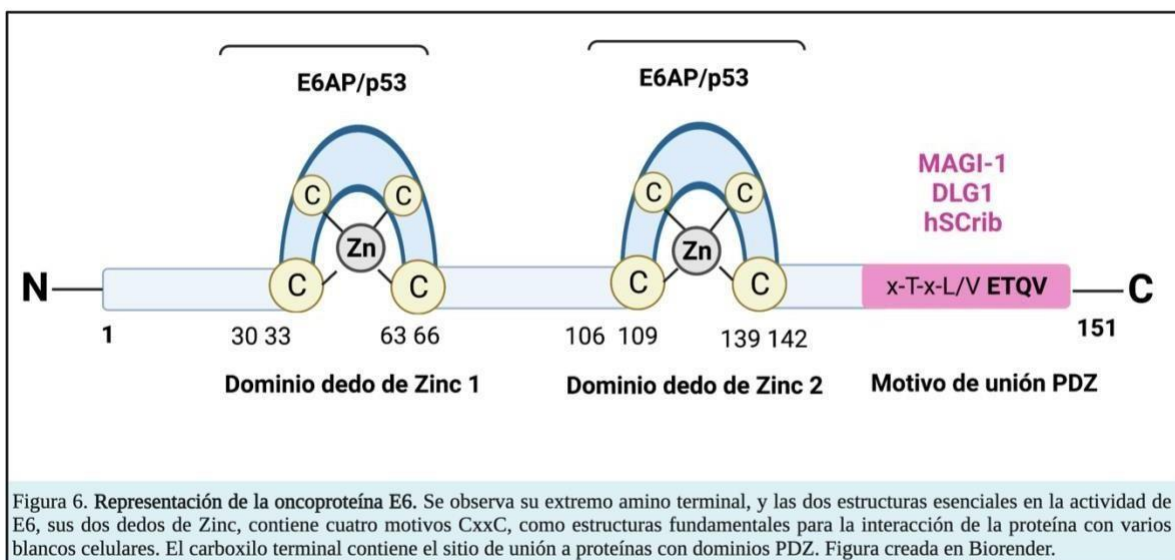
1.5 Oncoproteínas del VPH.

Las proteínas virales oncogénicas E5, E6 y E7 son capaces de modular la expresión de proteínas fundamentales que controlan la actividad de los mitógenos, el programa de diferenciación y los mecanismos de evasión inmunitaria que finalmente promueven el proceso de transformación celular. La oncoproteína E5 juega un papel clave en el crecimiento celular y altera varias vías de transducción de señales. Realiza actividades pro-carcinogénicas. También modula vías inmunitarias e inflamatorias de otras maneras, al interferir en la activación de EGF-R y la señalización de transducción, como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (Ras/Raf/MAO quinasa) y la fosfoinositida 23- quinasa (PI3K/Act)⁵⁸. Se ha demostrado que E5 coopera con E6 de alto y bajo riesgo para inducir coilocitosis⁵⁹. El principal mecanismo inmunitario interrumpido por la oncoproteína E5 es la presentación de antígenos, evitando su “cargamiento/loading” en el MHC para proteger a las células infectadas contra la citotoxicidad de NK y CTL; además la proteína E5 coopera con E6 y E7 para promover la hiperproliferación de las células infectadas debido a un aumento en la disponibilidad de receptores para factores de crecimiento, facilitando el proceso de transformación maligna. A pesar de que E5 está implicada en pasos fundamentales de la carcinogénesis, **el gen E5 generalmente se pierde** después de que el DNA viral se integra en el genoma del huésped, lo que sugiere que su actividad no es necesaria para la última etapa de transformación^{60,61,62}.

La **función de E6 y E7** da lugar a un interesante efecto complementario de la actividad transformante. Las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo son las principales mediadores de la carcinogénesis debido a sus interacciones con diversas dianas celulares. E6 y E7 son esenciales para el mantenimiento del fenotipo transformado, sin embargo, no son suficientes para transformar directamente las células^{63,64,24}.

1.5.1 Oncoproteína E6 y su contribución a la carcinogénesis.

El ORF de E6 codifica una pequeña proteína de aproximadamente 150 aminoácidos con un peso molecular de 16-18 KDa. La secuencia del LCR contiene una caja TATA y un sitio de unión a SP1 que activa el promotor de E6 el cual es responsable de la especificidad epitelial de la transcripción del VPH. Un potenciador se encuentra 400 pb corriente arriba del promotor E6 que inicia la transcripción.

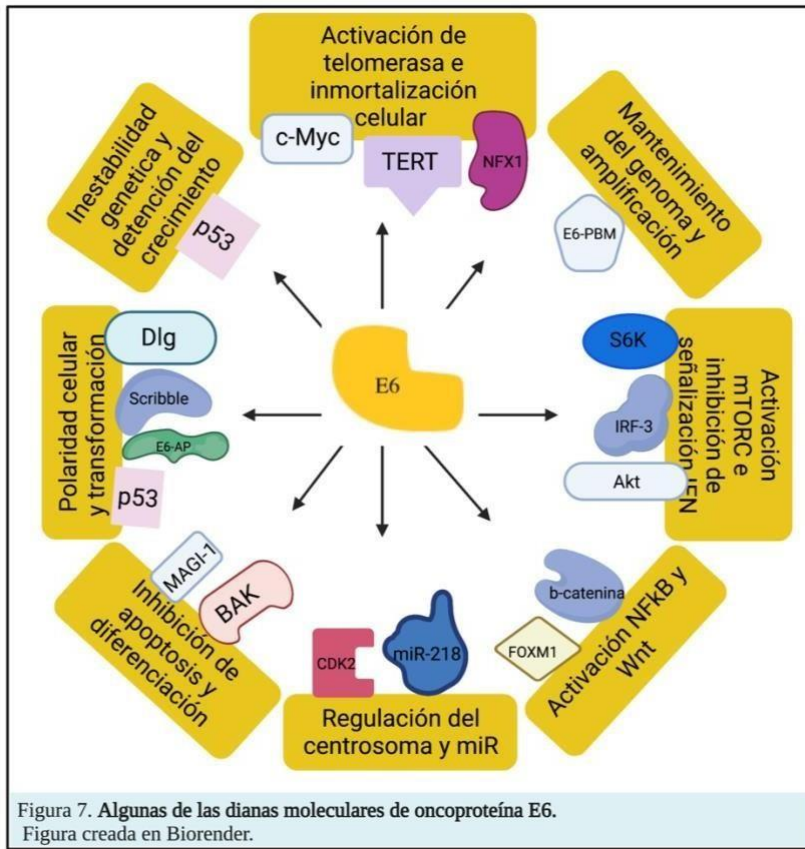


Las proteínas E6 contienen cuatro motivos CxxC, que son importantes en funciones como la activación transcripcional, transformación, immortalización y la asociación con proteínas celulares (figura 6). En el caso de los VPH que infectan la mucosa, el carboxilo terminal COOH contiene un motivo de unión P SD-95/ Dlg/ Z 01 (PDZ), su nombre deriva de las tres primeras proteínas que mostraron su presencia: Proteína de densidad postsináptica 95 (PSD-95), supresores de tumores grandes del disco de Drosophila (DlgA), y zónula ocludens-1 (Zo1), un ejemplo de los homólogos de esta última proteína en humanos es Dlg, estos motivos están involucrados en la interacción con varias proteínas que contienen este dominio PDZ, este motivo de unión a PDZ (PBM) está ausente en la mayoría de los tipos de virus de bajo riesgo⁶⁵. E6 de alto riesgo también interactúa con varios sustratos que contienen el dominio PDZ, incluidos Dlg y Scribble, lo que induce su degradación mediada por ubiquitina. Estos sustratos están implicados

en el control de la proliferación celular, la polaridad celular y la adhesión, lo que respalda además que las proteínas E6 contribuyen a la malignidad inducida por el VPH^{66,67}. En el caso de Dlg, E6 parece utilizar la interacción para promover una mayor invasión celular, mientras que en el caso de hScrib, esto parece ser necesario para mantener altos niveles de expresión de la proteína E6⁶⁸. E6 también regula la familia de proteínas NFκB e induce la caja Foxhead M1 (FOXO1) que se cree que media la progresión del tumor. E6 regula la vía Wnt / β-catenina afectando así la proliferación y diferenciación celular. E6 también puede afectar la expresión de varios miARN como miR 218 y miR23b y, junto con la interacción con CDK2, esto puede afectar la regulación del ciclo celular y el ciclo del centrosoma⁶⁹.

La función más estudiada de E6 de alto riesgo en el proceso carcinogénico es su unión al supresor de tumores p53, una proteína de unión al DNA expresada en respuesta al daño del DNA o la inducción no programada de la replicación del DNA, lo que da como resultado la detención del ciclo celular o la apoptosis. Dado que el VPH depende de la maquinaria de síntesis de DNA celular y debe estimular la progresión de la fase S para la replicación de su genoma, la sobreexpresión de p53 inhibe la replicación viral. E6 se une a la proteína p53 a través de una ubiquitina-ligasa celular mediado por la interacción de la proteína E6 con la proteína celular E6AP, mediante un bolsillo hidrofóbico cargado en E6, y un motivo peptídico en forma de hélice, en E6AP, llamado LxxLL por su alto contenido de leucinas⁷⁰. Un análisis cristalográfico de E6 del VPH16 muestra que los bucles de dedo de zinc de E6 y la región conectora entre ellos forman el bolsillo profundo, en el que encaja el dominio helicoidal LxxLL de E6-AP⁷¹.

El complejo de enzimas de ubiquitina es reclutado por E6AP, ubiquitinando lisinas en p53 promoviendo su proteólisis. Se forma un complejo tripartito de E6/ E6 AP/ p53. La degradación de p53 evita las señales de detención del crecimiento normal en los puntos de control G1 / S y G2 / M y es la causa principal de inestabilidad cromosómica, con consecuencias mutacionales para las células positivas al VPH y mejora de la integración de DNA extraño en el genoma de la célula huésped. Además, las oncoproteínas E6 inhiben la degradación de las cinasas de la familia SRC por E6-AP, estimulando la actividad mitótica²⁴.



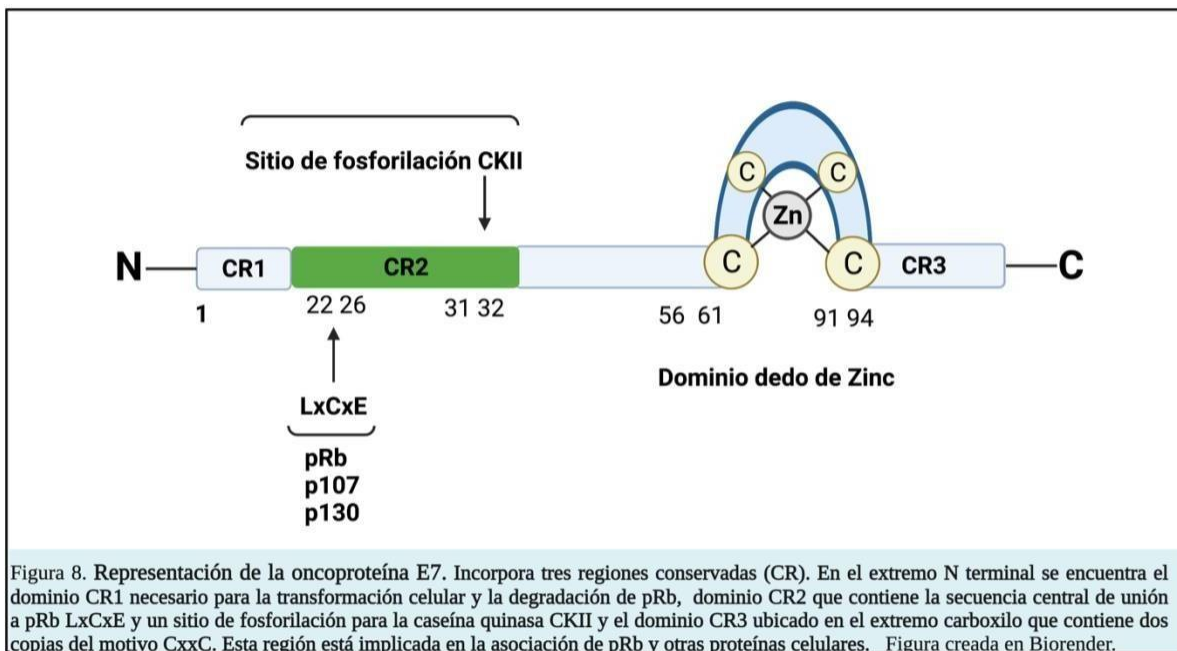
Además de sus efectos sobre la proteína p53, las proteínas E6 de alto riesgo activan la telomerasa, una enzima responsable de replicar el DNA telomérico en los extremos de los cromosomas. En las células somáticas normales, la actividad de la telomerasa está ausente y los telómeros se acortan a través de sucesivas divisiones celulares, iniciando la vía natural que conduce a la senescencia y la muerte celular. E6 puede regular al

alza la actividad de la telomerasa mediante la activación transcripcional del gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTert), que codifica la subunidad catalítica de la telomerasa, está inducción del promotor h TERT es a través de interacciones con proteínas c-Myc y NFX-1 y contribuye a la inmortalización celular^{72,73} (figura 7).

Como se ha descrito, E6 presenta la capacidad de interactuar con proteínas que albergan motivos LxxLL, el compañero prototipo que tiene este motivo es la ubiquitina ligasa E6AP, sin embargo en la actualidad se siguen reportando a otras proteínas que contienen estos motivos como lo es CREB3, una proteína sensor del Retículo Endoplásmico (RE)^{74,75}.

1.5.2 Oncoproteína E7 y su contribución a la carcinogénesis.

El oncogén E7 codifica una proteína de bajo peso molecular de aproximadamente 100 aminoácidos (10kDa). El dominio CR1 es necesario para la transformación celular y la degradación de pRB, pero no contribuye directamente a la unión de pRb. La región CR2 contiene una secuencia central de unión a pRb conservada LxCxE y un sitio de fosforilación de caseína quinasa II (CKII). El amino terminal consta de dos motivos CxxC separados por un espaciador de 29/30 aminoácidos. Esta región está implicada en la asociación de pRb y otras proteínas celulares del huésped y puede funcionar como un dominio de dimerización⁷⁶ (figura 8).

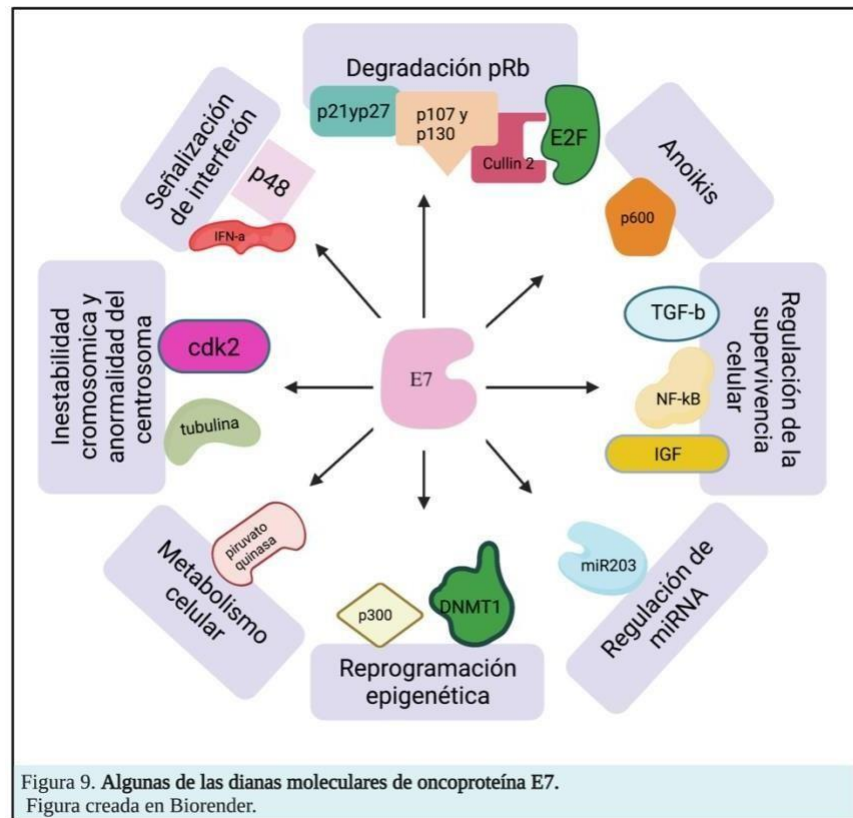


Las proteínas E7 se localizan principalmente en el núcleo, donde se asocian con el producto del gen de retinoblastoma (pRb) para facilitar la progresión hacia la fase S del ciclo celular. En células normales, pRb se hipofosforila en G1 temprano y se une a factores de transcripción E2F, formando complejos que funcionan como represores transcripcionales. Tras la fosforilación, estos complejos se disocian, lo que permite que E2F actúe como activador transcripcional. Al asociarse con pRb hipofosforilado, E7 evita su unión con E2F, promoviendo así la progresión del ciclo celular. Además, la degradación de pRb mediada por ubiquitina inducida por E7 parece ser esencial para superar eficazmente la detención del ciclo celular. Además de pRb, E7 interactúa

con otros dos miembros de la familia pRb, p107 y p130, que también regulan negativamente la transcripción de los genes activados por E2F^{24,77,78, 79} (figura 9).

La proteína E7 de los VPH de alto riesgo estimula los genes de la fase S, ciclina E y ciclina A, interactúa con los complejos ciclina-cinasa y anula las actividades inhibitoras de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina (CKI), como p21^{CIP-1 / WAF-1}. y p27^{KIP-1}⁸⁰.

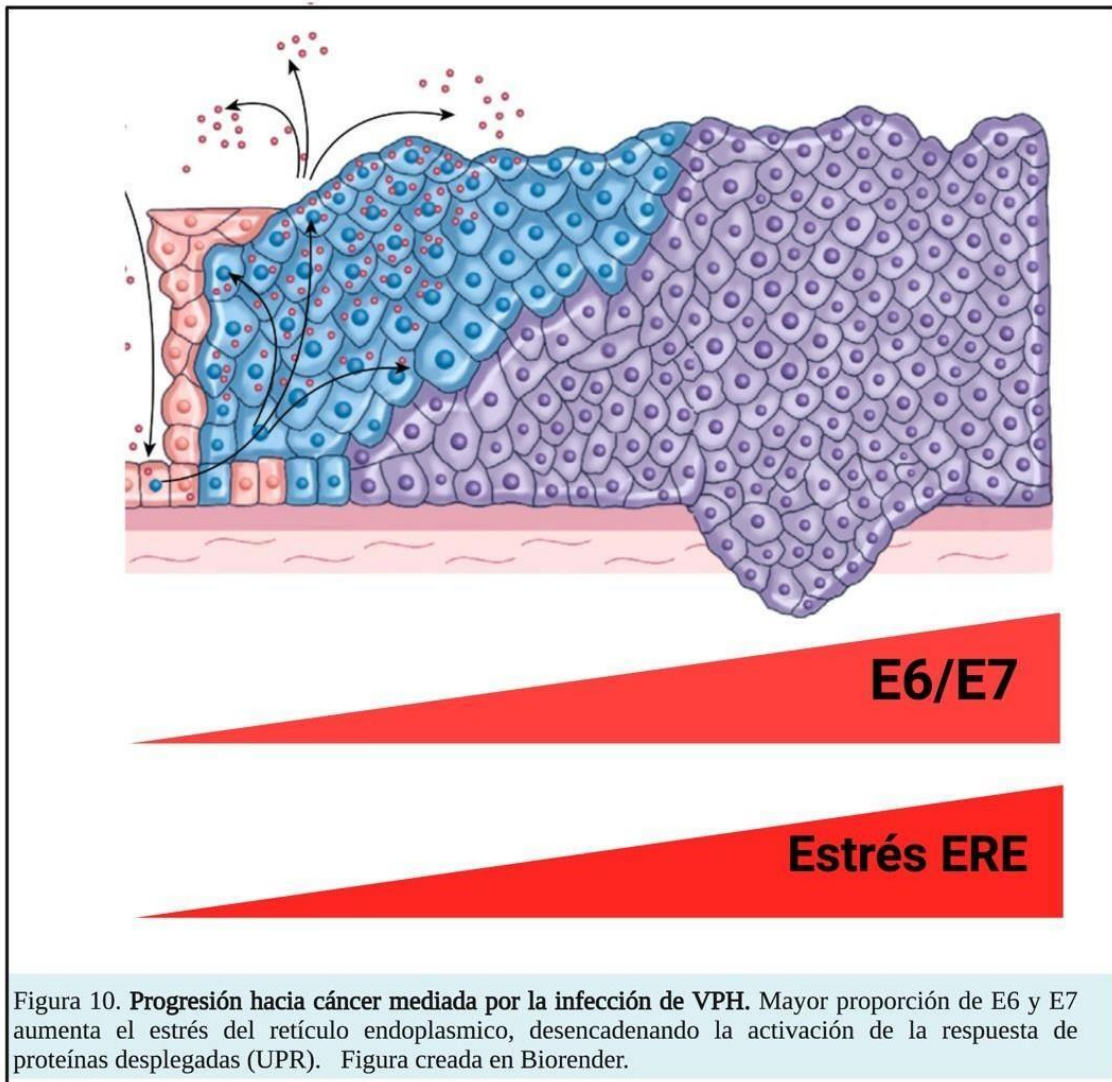
Estas interacciones son un factor importante en la estimulación del crecimiento de las células infectadas por VPH, desacoplando la actividad cinasa dependiente de ciclina de los CKI e interfiriendo con la capacidad de p53 para inducir la detención del crecimiento de G1 después de un daño en el DNA.



Las proteínas E7 del VPH6 y 11 de bajo riesgo se unen de manera menos eficiente a pRb por lo que sus efectos sobre la transformación celular son menores o ausentes⁸¹.

De lo anterior se desprende claramente que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH de alto riesgo afectan de diferentes formas a las vías reguladoras celulares, debido a su capacidad de interactuar con una gran variedad de proteínas celulares que alteran diversos procesos celulares. Estudios recientes han propuesto que estas oncoproteínas se acumulan en el Retículo

Endoplásmico, generando estrés de este, lo que proporciona evidencia sobre un nuevo mecanismo celular que puede favorecer al proceso de la carcinogénesis, siendo interesante al ser un mecanismo adicional a las alteraciones clásicas que ya se han determinado, proponiendo el Estrés del Retículo Endoplásmico (ERE) como un factor importante en el estableciendo del cáncer. A este respecto, se ha reportado que epitopes de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16, se acumulan en el retículo endoplásmico e inducen estrés del RE ^{51,52} (figura 10).



1.6 EL ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO COMO FACTOR PARA LA CARCINOGENÉISIS.

1.6.1 Estrés del retículo endoplásmico (ERE).

El RE es uno de los organelos más abundantes en las células, compuesto por un sistema continuo de membranas que incluye la envoltura nuclear (EN) y el RE periférico, definido por láminas planas, túbulos ramificados y sacos aplanados interconectados a través de un espacio cerrado llamado lumen que está separado del citosol por una membrana. La estructura del RE se puede dividir en un dominio de envoltura nuclear que está integrado en el RE rugoso, y un dominio para la síntesis de ribosomas⁸². La forma y distribución de estos dominios RE está regulada por una variedad de proteínas integrales de membrana e interacciones con otros orgánulos y el citoesqueleto. Estas interacciones son de naturaleza dinámica y reflejan cambios dentro de la célula, ya sea a través del ciclo celular, diferenciación celular, señales intracelulares o interacciones de proteínas⁸³. La estructura membranosa del RE tiene una serie de funciones como el plegamiento de proteínas recién sintetizadas, la síntesis de fosfolípidos y la regulación de las vías de señalización intracelular.

El RE permite principalmente el transporte e integración de proteínas, ayudándolas a plegarse y transportarse (membranas extracelulares o celulares), controla la homeostasis intracelular del Ca^{2+} siendo el principal reservorio de calcio en la célula, contribuyendo a la biogénesis de autofagosomas y peroxisomas, también es un sitio que realiza la glicosilación ligada a N y está estrechamente relacionado con las vías de señalización celular. Por otra parte, el transporte vesicular involucra el movimiento de moléculas de un compartimento celular hacia otro o bien su liberación hacia el entorno extracelular, el cual es crítico en gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos, en este proceso participa el RE en una manera ordenada y dinámica⁸⁴. Diversos estímulos, intrínsecos y extrínsecos, alteran la homeostasis del RE. Los cambios ambientales relacionados con el estado redox, los niveles de nutrientes y Ca^{2+} , la tasa de síntesis de proteínas, la aparición de patógenos o estímulos inflamatorios, alteran el plegamiento de las proteínas y en última instancia, promueven la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas. Esta condición se conoce como Estrés del Retículo endoplásmico (ERE)⁸⁵. Si las proteínas no se modifican correctamente, la falta de residuos de glucosa es reconocida por el RE

y las proteínas, incluida la UDP-glucosa: glicoproteína glucosiltransferasa (UGGT), en un intento de volver a glicosilar las proteínas. Si el proceso de plegamiento normal no se restablece, los residuos hidrófobos quedan expuestos y se unen a GRP78 (BIP), se produce la acumulación de estas proteínas y se activa la respuesta a proteínas desplegadas (UPR). La primera acción de la UPR es aumentar la abundancia del RE para adaptarse a las necesidades de las células para plegar adecuadamente las proteínas, lo que lleva a una expansión del RE a través de la generación de láminas y un aumento en la maquinaria de plegamiento⁸⁶.

1.6.2 Respuesta a proteínas desplegadas (UPR).

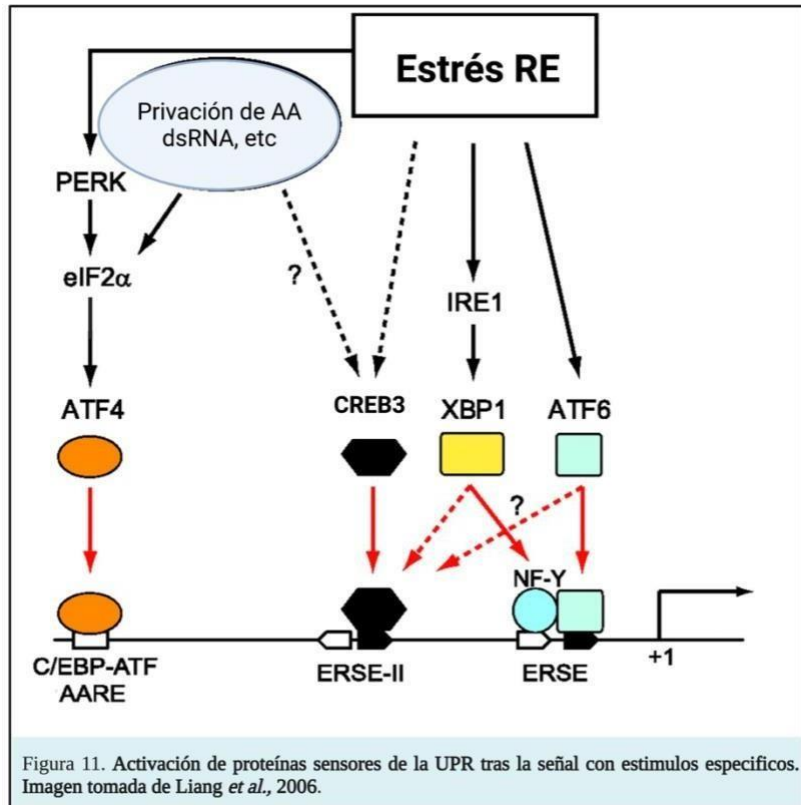
La capacidad de cada organelo en las células eucariotas está estrictamente regulada de acuerdo con las demandas celulares requeridas que se denominan autorregulación de organelos⁸⁷. Gran variedad de factores puede afectar la homeostasis y el funcionamiento del RE. La exposición de las células a condiciones ambientales adversas, como estrés salino⁸⁸, estrés térmico⁸⁹ y estrés hídrico⁹⁰, perturban los procesos que se llevan de manera normal en este organelo, lo que contribuye a la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el lumen del RE, si las proteínas mal plegadas se acumulan más allá de un umbral tolerable, los sensores residentes en el RE desencadenan una respuesta de proteína desplegada o mal plegadas (UPR) el cual es un mecanismo adaptativo capaz de restablecer la homeostasis del RE a través de múltiples estrategias que abarcan la reprogramación transcripcional y el decaimiento del mRNA, la atenuación traduccional, eliminación de proteínas mal plegadas a través del sistema de degradación de proteínas asociadas a ER (ERAD), reciclaje de proteínas mal plegadas y materiales celulares a través de la inducción de la autofagia⁹¹. La acumulación de proteínas en el RE es detectada por las moléculas sensoras que constituyen al mecanismo de respuesta de proteínas desplegadas o UPR y esto activa factores de transcripción específicos⁹². Como respuesta a este estrés se activan vías de señalización que involucran la comunicación entre el RE y el núcleo para asegurar el correcto plegamiento y ensamblaje de todas las proteínas que salen del retículo endoplásmico⁸⁷. Es por ello que la acumulación de proteínas, la sobrecarga de la replicación, síntesis de proteínas y lípidos, alteración de los nutrientes intracelulares, cambios en la arquitectura celular, infecciones

virales y el proceso carcinogénico, inducen la activación de mecanismos de protección celular culminando en la activación de vías de señalización de la UPR la cual involucra a los elementos: Pancreatic ER Kinase (**PERK**), Inositol-Requiring Enzyme 1 (**IRE1**) y Activating Transcription Factor 6 (**ATF6**), y una vía no clásica llamada **CREB3**, cada proteína sensor de la UPR presenta un mecanismo peculiar y genes objetivos diferentes, para desencadenar una respuesta específica^{93,94} (figura 11).

En condiciones normales estas proteínas transmembrana están unidas e inactivadas por una chaperona, la proteína 78 regulada por glucosa (Bip, también conocida como GRP78)^{92,95}.

Los resultados de la activación de la UPR incrementa el plegamiento adecuado de las proteínas, induce tráfico celular y promueve la degradación de proteínas

asociada al RE (ERAD) con la subsecuente atenuación en la síntesis de proteínas. Si el plegamiento de proteínas no es resuelto las células activan diferentes mecanismos de muerte celular incluyendo autofagia y apoptosis⁹⁶. Así mismo, el tráfico vesicular está regulado por diversos procesos como la endocitosis, exocitosis, reciclaje de proteínas, autofagia y ERE, los cuales responden una gran cantidad de señales intra e intercelulares y su desregulación está asociada al desarrollo de diversas patologías como Parkinson, Alzheimer, paraplejia espástica y cáncer⁹⁷; el mecanismo implicado en estos procesos aún sigue en investigación. A la fecha diversos trabajos han descrito el papel de las infecciones virales en la modulación del ERE, sin embargo,



los mecanismos en un proceso continuo como lo es la carcinogénesis permanecen poco claros, donde la transformación oncogénica impulsada por la pérdida de los supresores de tumores p53, PTEN, TSC1 o TSC2, aumentan drásticamente las tasas de síntesis de proteínas, lo que eventualmente lleva al ERE⁹⁸.

Las células cancerosas pueden adaptarse a los desafíos que implica el microambiente tumoral, pero a medida que los tumores se expanden, se encuentran con una serie de nuevas tensiones ambientales, que incluyen la privación de oxígeno y nutrientes, acidosis láctica y múltiples formas de intervención clínica, estos estímulos pueden interrumpir el plegamiento de las proteínas en el RE al limitar dos de las reacciones que ocurren en este orgánulo: O₂ y N-acetilglucosamina, o interrumpir directamente la función de chaperonas a través de la peroxidación de lípidos y formación de aductos covalentes⁹⁹. Los factores extrínsecos como la hipoxia, la privación de nutrientes y la acidosis alteran las funciones normales del RE, las tensiones intrínsecas a las que están expuestos los tumores sólidos como activación oncogénica, alteración en el número de cromosomas, y la capacidad secretora exacerbada causan una alta demanda para la producción de proteínas. Así mismo, la inestabilidad genómica, el aumento de la tasa de mutaciones y el desequilibrio redox perturban aún más la proteostasis global. Todos estos factores involucrados en la progresión del cáncer resultan en la acumulación de proteínas mal plegadas, y generando ERE¹⁰⁰.

1.6.3 ERE, UPR y Cáncer.

Las células han desarrollado mecanismos para lograr garantizar la autenticidad y la integridad de los procesos celulares que llevan a cabo. Cualquier perturbación anormal puede producir ERE, ya sea de forma directa o indirecta, y esta perturbación puede ser de naturaleza aguda o crónica, como ejemplos de estrés agudo, la hipoxia, el agotamiento de calcio y la privación de glucosa pueden conducir a una rápida activación de la UPR, en esas condiciones, la célula solo necesita tolerar tales tensiones, durante tiempos relativamente breves, de minutos a horas, promoviendo

el plegamiento de proteínas que se encuentren en el RE, que se haya acumulado en ese periodo de tiempo, lo que necesita una UPR que es de acción relativamente rápida y también fácilmente desactivada^{101,102}. Por el contrario, el estrés crónico requiere cambios casi permanentes en la función celular en general y en la función del RE en particular, las tensiones crónicas que activan la UPR pueden abarcar: mutaciones genéticas de chaperonas o sustratos de chaperonas que conducen a problemas persistentes de plegamiento incorrecto, infecciones virales que pueden cooptar la vía secretora para la producción de proteínas o incluso la diferenciación y el mantenimiento normal de la célula, cuyas funciones principales incluyen la producción y secreción de proteínas, como células inmunitarias. Una característica común entre estos factores estresantes crónicos del RE es que exigen un mecanismo por el cual el estrés del RE debe tolerar persistentemente en una escala de tiempo que va de días a años, en este contexto, incluso si la muerte celular ocurre en pequeña medida, la mayoría de las células deben finalmente sobrevivir y adaptarse al estímulo estresante¹⁰³.

La transformación oncogénica es un proceso de varios pasos que aprovecha el mecanismo de la UPR para superar diversas barreras. Por lo tanto la UPR funciona como un mecanismo de adaptación durante la progresión del cáncer¹⁰⁴. Actúa modulando mecanismos que desencadenan la transformación celular, mejoran la supervivencia y ajustan el estado metabólico de la célula. La iniciación y el desarrollo del cáncer requieren la inactivación de los supresores de tumores como la adquisición de mutaciones oncogénicas que desacoplan la proliferación de la regulación extracelular mediada por factores de crecimiento¹⁰⁵. El estado metabólico en el proceso carcinogénico es altamente proliferante en un microambiente anormalmente vascularizado, hipóxico y bajo en glucosa. En condiciones hipóxicas, la demanda de síntesis de proteínas en las células cancerosas es significativamente menor que la de las células normóxicas, lo que conduce a una disminución de la demanda de oxígeno y energía, por lo tanto existe una disminución del trifosfato de nucleósido de adenina (ATP), y una disminución en la tasa de traducción de proteínas, lo cuál es desfavorable para las células cancerosas¹⁰⁶. La demanda constante en los niveles aumentados con la transformación en la síntesis de proteínas a menudo abruma la capacidad de plegamiento de proteínas del RE. Las células cancerosas en

proliferación requieren una rápida expansión del RE para su división y asignación a las células hijas¹⁰⁷. El crecimiento tumoral persiste pese a las condiciones adversas en un contexto carcinogénico, donde coexisten procesos como: proliferación sostenida y desregulada, estrés oxidativo, privación de nutrientes y de lípidos, hipoxia, pH ácido extracelular. La progresión del ambiente tumoral requiere una adaptación frecuente, la transformación maligna mediada por la activación de oncogenes y la pérdida de la función supresora de tumores, lo que impone intensas demandas biosintéticas y bioenergéticas sobre los recursos celulares disponibles, desencadenando el estrés inicial del RE. Las adaptaciones beneficiosas que surgen en el microambiente tumoral se deben en gran medida por la respuesta al estrés del RE y los procesos biológicos celulares fundamentales, como la autofagia y la difonía entre el RE y otros organelos. Las células cancerosas invasivas requieren autofagia mediada por la UPR para resistir anoikis, una forma de muerte celular provocada por el desprendimiento de la matriz extracelular (MEC), también limita la acumulación dañina de ROS ^{108,109}.

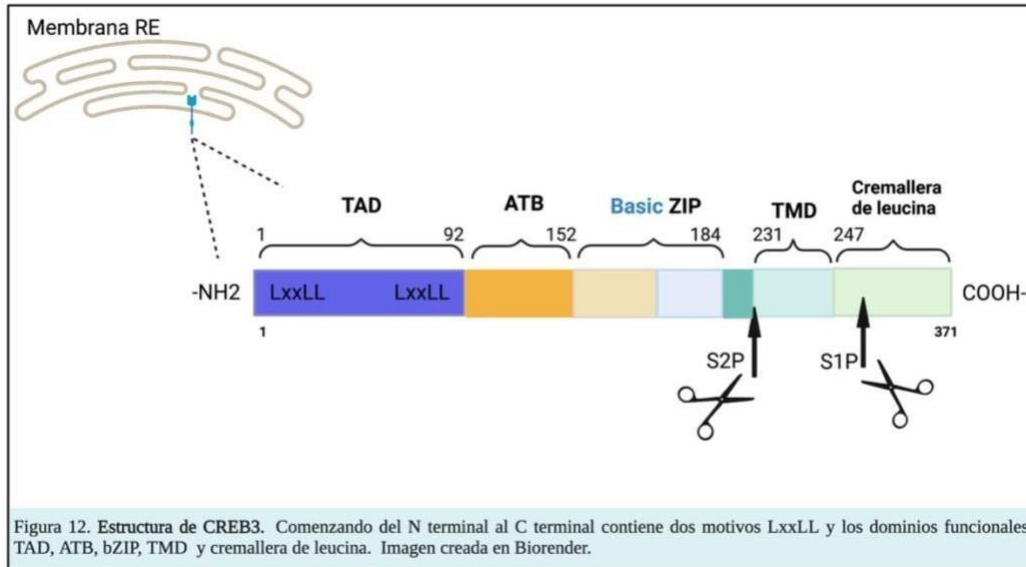
El alcance de la respuesta UPR depende de las condiciones de estrés y la gravedad de los factores desfavorables, la respuesta de la UPR se divide en dos tipos: para proteger a las células del daño, generando la supervivencia o inducir la apoptosis al no reparar el daño detectado¹¹⁰. El crecimiento y la supervivencia óptimos del cáncer se basan en vías de señalización de la UPR cuidadosamente equilibradas que interactúan con otros procesos celulares. Por lo tanto, actualmente se considera que la UPR desempeña un papel clave en la progresión tumoral, la metástasis, la tumorigénesis y la supervivencia ^{111,112}.

El mecanismo de la UPR estimula las células tumorales para que secreten metaloproteinasas que se unen a citocinas específicas, como los factores angiogénicos. Además de los factores intrínsecos, las propiedades altamente proliferativas de las células cancerosas pueden activar la respuesta UPR al interrumpir el plegamiento de las proteínas ER, lo que permite que las células cancerosas continúen creciendo en ambientes con deficiencia de nutrientes¹¹³. Para aumentar la capacidad de plegamiento de proteínas, la UPR expande el tamaño del RE a través de una mayor biogénesis de los componentes como proteína y lípidos, y regula al alza la transcripción de

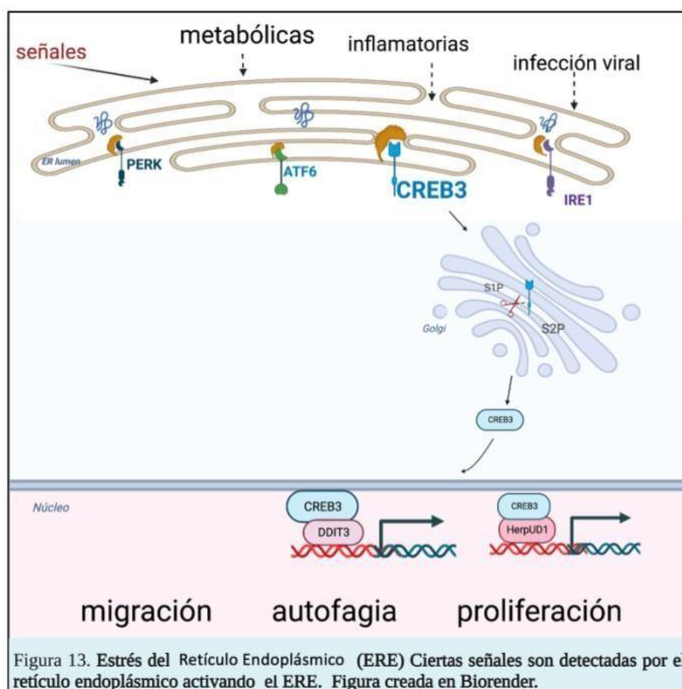
chaperonas del RE como lo es GRP78^{114,115}. Recientemente se ha identificado una vía en respuesta al estrés de RE en mamíferos: CREB3⁸⁷.

1.7 CREB3

CREB3 (CAMP Responsive Element Binding Protein 3) es un gen que codifica para un factor de transcripción que presenta un tamaño de 371 aminoácidos y una masa molecular de 41,379 Da, es un miembro de la familia de proteínas de unión a DNA de tipo cremallera de leucina (*leucine zipper*) que pertenecen a la familia bZIP, estas proteínas se localizan en el RE. CREB3 también es llamado LZIP o “luman” (en honor a un héroe legendario en la antigua China)¹¹⁶. CREB3 contiene dos motivos de unión al receptor nuclear (NR) LxxLL y presenta los siguientes dominios funcionales: el dominio de transactivación (**TAD**) que media la unión a DNA específica de secuencia, un dominio conservado de aproximadamente 30 residuos llamados **ATB** (Adyacente a bZIP), una región básica (b) junto al dominio de cremallera de leucina (Zip) llamados en conjunto **bZIP**, dominio de unión a DNA y un dominio transmembrana (**TMD**). Las proteínas CREB3 pueden actuar como homodímeros y/o heterodímeros a través de su dominio de cremallera de leucina en espiral, la dimerización selectiva es un determinante de la diversidad y especificidad de sus funciones^{117,118,74}. Es clasificada como una proteína de membrana tipo II, que es sometida a una proteólisis intramembrana regulada (RIP) en respuesta a señales celulares. Estas proteínas se unen al elemento de respuesta de cAMP (CRE) (consenso: ‘5-GTGACGT [AG][AG]-3’ y secuencias C/EBP presentes en muchos promotores para activar la transcripción de los genes. A su vez también se une a los sitios de secuencias de consenso del elemento de respuesta a proteínas desplegadas (UPRE) 5`-CCAC[GA]-3’ de ERSE II (5`-ATTGG-N-CCACG-3`), y regula la expresión de una gran variedad de genes, que juegan un papel en la supresión tumoral y la degradación proteica asociada al ERE. CREB3 está anclado al RE por un dominio transmembrana hidrofóbico, lo que sugiere que su extremo carboxilo rico en prolina permanezca en la luz del RE^{119,120, 121, 122} (*figura 12*). El dominio amino terminal resulta importante para la percepción del estrés, el cual se mantiene en un estado inactivo por interacción con la chaperona GRP78^{123,124}.



Después de un determinado estímulo, CREB3 es transportada del RE al aparato de Golgi donde es escindido proteolíticamente por la proteasa del sitio 1 (S1P) unida a la membrana de la familia de las subtilisinas, que genera un extremo N asociado a la membrana y se forma un extremo C luminal (*figura 13*). La forma N-terminal asociada a la membrana es procesada proteolíticamente por la proteasa del sitio 2 (S2P) una metaloproteasa de zinc incrustada en la membrana para liberar el fragmento N-terminal, a través de una proteólisis intramembrana regulada por RIP,



liberando la forma 3 de la proteína de unión a elementos sensible al AMPcíclico procesada transcripcionalmente activa¹¹⁶. El fragmento N-terminal liberado se traslada al núcleo donde se une a través de su dominio bZip. Una gran variedad de estudios y modelos sugieren que CREB3 posee una actividad fisiológica, ya que tiene funciones en la regulación del desarrollo, metabolismo, inmunidad innata y secreción (*figura 14*)

125,126,127,128,129

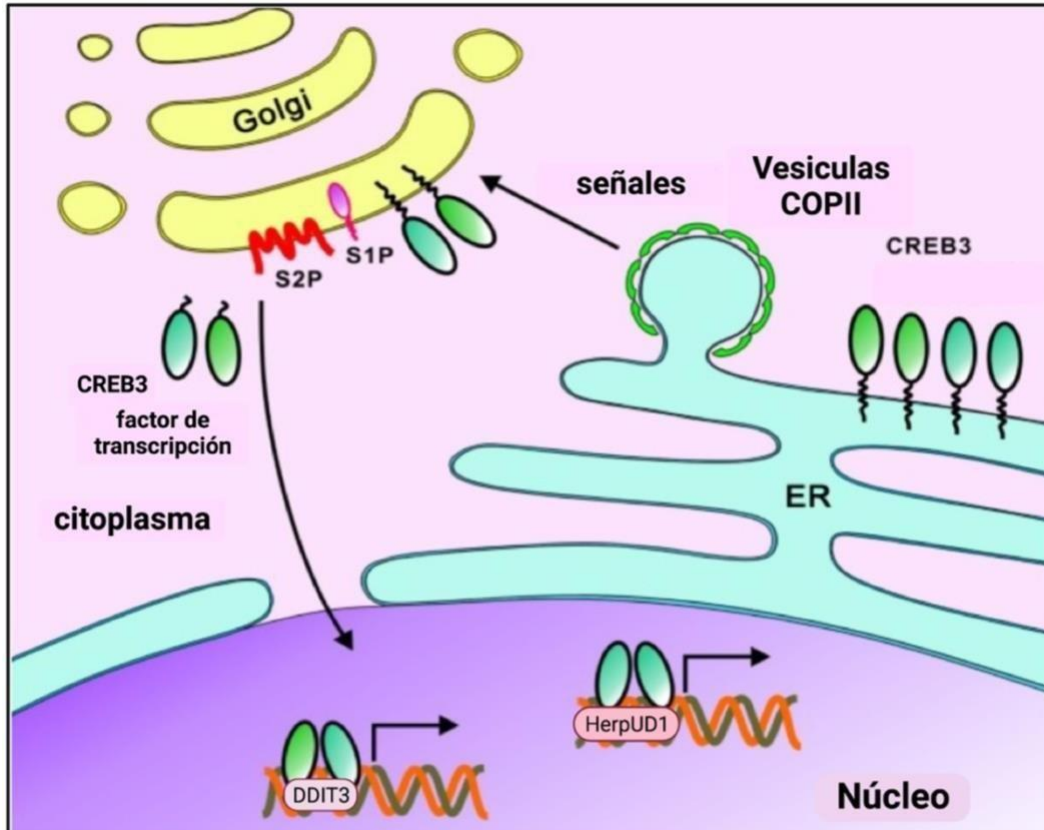


Figura 14. **CREB3 como factor regulador del ERE.** Cambios en las condiciones fisiológicas generan señales que disparan la activación proteolítica de las proteínas CREB3, que ocurre en el Golgi por el corte de S1P y S2P, el fragmento N-terminal liberado actúa como factor de transcripción, se traslada al núcleo para regular la expresión de genes blanco.

CREB3 activa la transcripción dependiente de CRE y regula la proliferación celular. Además se ha reportado que proteínas del tráfico RE-Golgi son reguladas por CREB3 y están asociadas con un fenotipo invasivo en un modelo de progresión metastásica en ratones¹³⁰. Esta evidencia señala la relevancia de la regulación de los componentes de la vía secretora, como el complejo de Golgi, por parte de la familia CREB3 en el entorno del proceso del cáncer.

Se ha descrito a CREB3 como centro de señalización para la regulación de la homeostasis del RE y el aparato de Golgi, integrando estímulos de múltiples fuentes para controlar la secreción, modificación y el tráfico post-traducciona de proteínas, según los perfiles de expresión específicos de tejidos, desempeñan el desarrollo, supervivencia, diferencian, autorregulación de orgánulos y secreción de proteínas y la proliferación celular¹¹⁶. También participa en la proliferación, migración y diferenciación celular, supresión de tumores y expresión de genes inflamatorios. Actúa como un regulador positivo de la señalización de quimiotaxis inducida por

LKN-1/CCL15¹³¹. Induce la activación transcripcional de los receptores de quimiocinas y la migración celular¹³². Se ha informado que en células de sarcoma osteogénico humano (HOS), CREB3 se une al receptor de quimiocinas CC1 (CCR1) y participa en la migración celular inducida por leucotactina-1 al mejorar la vía de activación de NF-κB, a su vez la expresión de CREB3 se ha relacionado con el cáncer de mama, se une específicamente a la histona desacetilasa 3 (HDAC3).

Por otro lado, ARF4, COPB1 y USO1 proteínas de tráfico de ER-Golgi son reguladas por CREB3 y están asociadas con un fenotipo invasivo, por lo tanto además de estar involucrado en un contexto fisiológico presenta una respuesta importante en un entorno patológico como el cáncer^{133,134,130}.

CREB3 media interacciones proteína-proteína que pueden regular directamente la transcripción, CREB3 presenta un motivo lineal que le permite interactuar con HCF, a su vez HCF, recluta factores de cromatina como las histonas H3 metiltransferasas, la desmetilasa (LSD1), o bien acetiltransferasas (ATAC/STAGA,MOF). HCF es particularmente interesante ya que es un regulador transcripcional del ciclo celular^{135,136}.

CREB3 se une a receptores de glucocorticoides (GR) a través del motivo LxxLL y altera la actividad de GR a través de esta interacción, además de unirse al elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), estos datos indican que CREB3 puede actuar como factor de transcripción y como cofactor que conduce a alteraciones en la actividad de receptores de glucocorticoides, debido a que en la respuesta al estrés celular y en ausencia o disminución de CREB3 las células son más sensibles al estrés celular, lo que conduce a una disminución de la capacidad secretora que lleva a una liberación alterada de glucocorticoides, así CREB3 juega un papel doble en la respuesta al estrés actuando tanto a nivel fisiológico como a nivel celular⁷⁴.

Durante infecciones virales se ha descrito la participación de CREB3 y su papel como factor de transcripción y cofactor, puesto que se ha identificado que la proteína core del virus de hepatitis

C (VHC) secuestra en el citoplasma a CREB3, inactivando su función y potenciando la transformación celular. Además, las actividades transcripcionales atribuidas a la proteína core del VHC podrían explicarse a través de su interacción con CREB3¹¹⁷. Hasta la fecha no se sabe porque los virus han evolucionado para depender de factores celulares en el inicio de sus ciclos de replicación.

Por otra parte, se ha explorado sobre el papel de CREB3 y el Virus del herpes simple tipo 1 virus (HSV-1), CREB3 reprime la transactivación mediada por VP16 al retener el factor 1 de la célula huésped (HCF-1) en la membrana del RE a través de la interacción directa HCF-CREB3. HSV-1 usa esta vía: CREB3, para el establecimiento de la latencia¹¹⁹.

CREB3 también interactúa con TMgp41 CD disminuyendo la estabilidad de CREB3. Curiosamente la sobreexpresión de la forma transcripcionalmente activa de CREB3 inhibe la expresión de la proteína VIH-1, conduciendo a la disminución en la liberación de viriones, estas interacciones se evaluaron mediante el uso de las técnicas de GST-pullDown, co-inmunoprecipitación y ensayo de doble híbrido¹³⁷. La adaptación de las células al estrés del ERE de manera crónica, en un contexto carcinogénico posterior a infecciones virales como el VPH, plantea la posibilidad de que las células puedan adaptarse al estrés persistente por la forma en que se controla la expresión de las moléculas efectoras corriente abajo de la UPR (CREB3) durante la exposición continua al estrés tolerable¹⁰⁶.

1.7.1 CREB3 y blancos moleculares

La proteína de RE inducible por homocisteína (HERP), que tiene un peso molecular estimado de 43 kDa, pero que migra como una proteína de 54 kDa durante la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), es una proteína integrada en la membrana del ER que actúa como componente de ERAD es un objetivo directo corriente abajo de CREB3¹²¹. En particular, el promotor de HERP contiene un sitio ERSE y ERSE-II (ATTGG-N-CCACG) que media la inducción de HERP tras el estrés de RE. CREB3 induce directamente la transcripción de HERP a través de ERSE-II¹²¹. La deficiencia de HERP acelera la apoptosis inducida por el ERE y suprime las reacciones

inflamatorias inducidas por el estrés del RE. La regulación negativa de la expresión de CREB3 o HERP en células IMR5¹³⁸. El estrés crónico del RE, en el que no se puede restaurar la homeostasis del RE, induce la apoptosis a través de efectores que incluyen CCAAT/CHOP. Este gen codifica a un miembro de la familia de factores de transcripción CCAAT/ proteína de unión potenciadora (C/EBP), también conocido como gen 153 de detención del crecimiento y daño del DNA (Gadd153), es inducido por una variedad de tensiones fisiológicas y farmacológicas, incluidas las condiciones que alteran el plegamiento de proteínas en el RE. Forma homodímeros y heterodímeros transcripcionalmente activos con factores de transcripción.

La proteína funciona como un inhibidor negativo dominante formando heterodímeros con otros miembros de C/EBP, alterando su especificidad de unión al DNA, y activando nuevos objetivos específicos del heterodímero¹³⁹. CHOP es un factor de transcripción multifuncional en la respuesta al estrés del retículo endoplásmico, desempeña un papel esencial en la respuesta a una amplia variedad de estímulos de estrés celular e induce la detección del ciclo celular en la fase G1/S. El promotor de CHOP contiene dos ERSE (ERSE-1 y ERSE-2), que responde a los agentes que activan la vía UPR de los mamíferos^{140,141}.

2. ANTECEDENTES.

Al día de hoy, la función del ERE y la UPR en el proceso carcinogénico asociado a la infección con VPH-AR ha sido poco explorada. La expresión de las proteínas E6 y E7 son clave en el establecimiento de la carcinogénesis viral, dichas oncoproteínas interactúan con una plétora de proteínas celulares, por lo que resultan relevantes los resultados que recientemente se reportaron¹⁴². Las células que sobreexpresan secuencias de antígenos de las oncoproteínas E6 y E7 se dirigen al RE produciendo ERE⁵¹. El mismo grupo de investigación demostró que el antígeno E7 de longitud completa, posterior a la transfección, es localizado en el RE e induce ERE⁵². Mediante ensayos de Western blot reportaron la sobreexpresión de GRP78 en células que fueron transfectadas con E7. Por otra parte, encontraron que la regulación positiva de GRP78 resulta solo en células transfectadas con E7, concluyendo que la inducción de una respuesta de ERE es limitada y localizada en lugar de sistémica. Mencionan que las construcciones de DNA que ellos utilizan podrían estar relacionadas con un estrés del RE transitorio.

Se han propuesto varios estímulos de la respuesta de proteínas desplegadas (CREB3), incluido la infección viral¹²¹. A su vez se ha propuesto que CREB3 es un factor novedoso que juega un papel en ERAD (Degradación de proteínas asociadas al RE) siendo un punto de convergencia para varias vías de señalización que se canalizan a través del RE. Así mismo, la vía CREB3, que conduce a la respuesta de ERE, induce la apoptosis a través de la activación transcripcional de ARF4 después del tratamiento con Brefeldin A. También se ha reportado que CREB3 regula numerosos genes involucrados en regular la proliferación y en la progresión del ciclo celular, así como en la capacidad de promover la metástasis, como lo reporta¹³⁰ donde identificaron a CREB3 como un regulador transcripcional de los genes de tráfico ER-Golgi: ARF4, COPB1 y USO1. Ellos demuestran que a mayor demanda de la capacidad secretora de las células metastásicas, se activa una respuesta de ERE y una regulación positiva de los genes ER-Golgi a través de mediadores que incluyen CREB3.

Eunsoo identificaron que el factor de transcripción CREB3 desempeña un papel en la expresión de c-Jun y en la migración e invasión de células de cáncer uterino a través de la regulación de

la transcripción de MMP-9. Se sabe que el factor de transcripción CREB3 está involucrado en la migración e invasión de células cancerosas, sin embargo sus funciones biológicas en el desarrollo del cáncer y los genes diana celulares aún se siguen comprendiendo¹⁴³.

Los datos indicados anteriormente parecen reunir una serie de eventos que se estarían alterando dentro de la célula posterior a la infección por VPH. La Figura 15 propone que tras la infección por el Virus del Papiloma humano de AR se genera una posible infección persistente y subsecuente integración del genoma viral al genoma celular, las oncoproteínas E6 y E7 se estarían sobreexpresando de manera prolongada y crónica, como resultado estas oncoproteínas son reconocidas como una señal de ERE para encender los mecanismos de la UPR, que talvez involucren la vía CREB3, y así promover su activación proteolítica y traslocación al núcleo para poder llevar a cabo su función como factor de transcripción. Por otra parte, la oncoproteína E6 podría ser capaz de interactuar con CREB3 mediante el reconocimiento de los dos motivos LxxLL que presenta CREB3. Para el caso de E7, la posible regulación podría ser de manera transcripcional. Al recabar los antecedentes antes mencionados, y situarlos bajo un contexto de infección/integración viral, podemos sugerir que las oncoproteínas E6 y E7 podrían modular el ERE mediante la vía CREB3, activando posiblemente distintos genes corriente abajo que son dianas moleculares de CREB3, asociados con procesos como proliferación, supervivencia, autofagia, metástasis, entre otros.

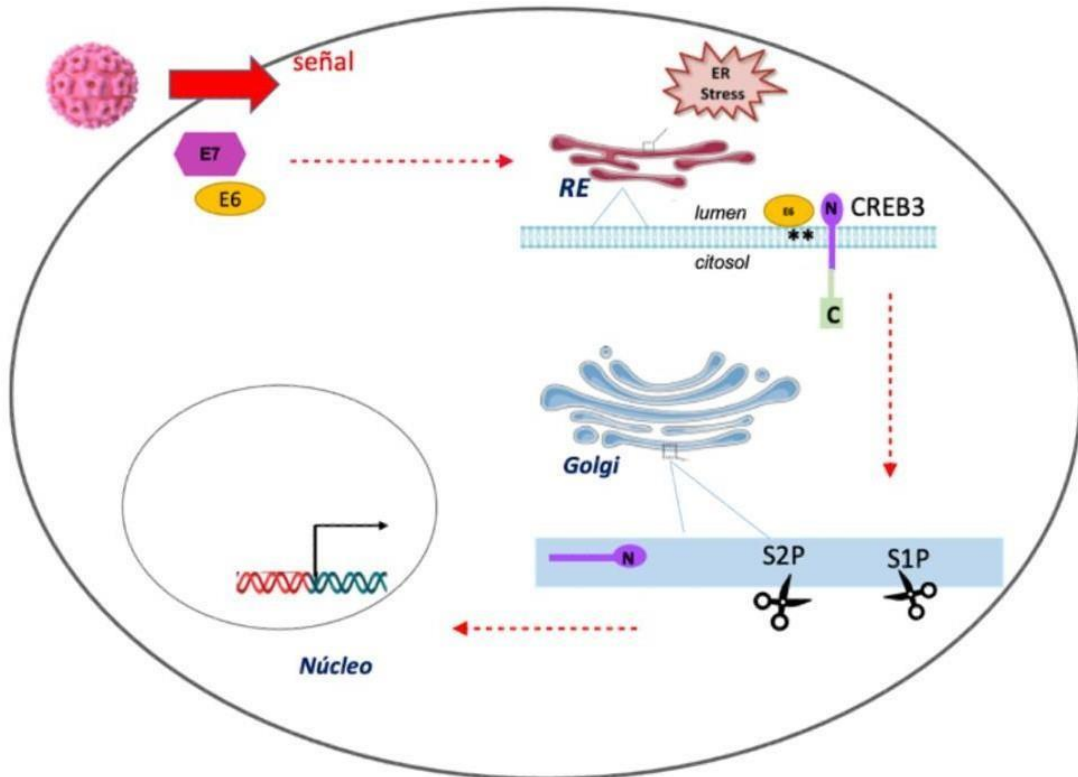


Figura 15. **Antecedentes.** Epítopes de E6 y E7 del VPH16 generan ERE, el cual es detectado por la proteína sensor del RE: CREB3, activando una respuesta mediante la activación de diversos genes relacionados con procesos celulares como lo son proliferación, autofagia y metástasis.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La prevalencia de cáncer asociado al VPH continúa siendo un problema de salud pública, especialmente en países en vías de desarrollo como México. El mecanismo oncogénico inducido por este virus involucra la desregulación de diversos procesos celulares donde E6 y E7 afectan distintas vías reguladoras celulares y como resultado perturban la homeostasis celular. Sin embargo, pocos estudios se han enfocado en demostrar la regulación del ERE en la carcinogénesis inducida por este virus a través de la activación de CREB3.

4. JUSTIFICACIÓN.

El ERE está asociado a la carcinogénesis sin embargo, aún se desconoce si el VPH, a través de la regulación de elementos de ERE impacta en dicho proceso.

El factor de transcripción CREB3 está involucrado en la respuesta al ERE, cuya activación sostenida juega un papel crucial en la oncogénesis. Por lo que la comprensión de la regulación de CREB3, sus activadores y sus efectos en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH podría brindar información sobre el papel del ERE en el cáncer inducido por este virus y en un futuro proporcionar nuevas opciones para la intervención terapéutica.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Son las oncoproteínas E6 y E7 del Virus del Papiloma Humano tipo 16 capaces de inducir estrés del retículo endoplásmico (ERE) y activar a CREB3? ¿Cuál es su aporte al proceso carcinogénico?

6. HIPÓTESIS.

Las oncoproteínas E6 y E7 del Virus del Papiloma Humano tipo 16 modulan el estrés del retículo endoplásmico (ERE) a través del factor transcripcional CREB3.

7. OBJETIVO GENERAL.

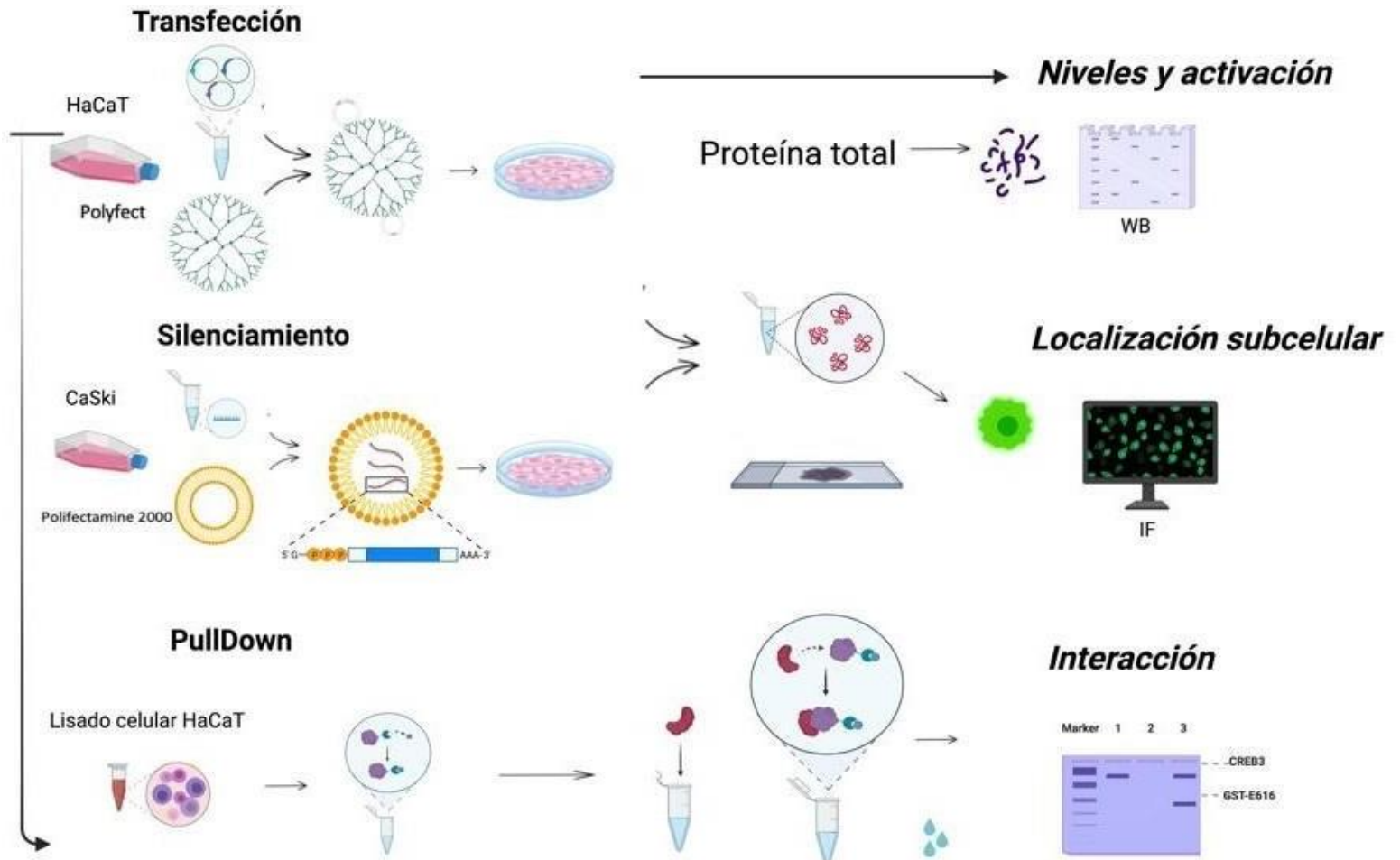
Determinar el efecto de las oncoproteínas del VPH16 sobre el estrés del retículo endoplásmico (ERE) y la activación del factor CREB3.

7.1 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de E6 y E7 del VPH16 sobre el estrés del del retículo endoplásmico (ERE) a través de los niveles del marcador de ERE: GRP78.
2. Determinar los niveles y localización subcelular de CREB3 en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16.
3. Evaluar la activación de CREB3 por las oncoproteínas del VPH16 mediante los niveles de HERP y CHOP (genes blanco de CREB3).
4. Determinar la capacidad de las oncoproteínas virales de interactuar con el factor CREB3 *in vitro*.

8. METODOLOGÍA

8.1 Diseño experimental



8.2 Maxipreparación: Aislamiento y purificación de DNA plásmidico

Los plásmidos para expresar a la proteína del E6 o E7 de VPH16 fueron obtenidos del banco del laboratorio y extraídos con el kit Maxi prep PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) basado en una lisis alcalina modificada, siguiendo las instrucciones del proveedor, brevemente: una colonia de las placas de selección positiva de transformación fue resembrada por estría aislada en placas con agar LB con ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C. De este cultivo una colonia aislada se seleccionó e inoculó en 20 mL de LB con ampicilina en agitación constante toda la noche. El cultivo inicial se agregó a 300 mL de LB estéril con ampicilina incubándolo a 37°C en agitación constante durante 3 hrs. Las bacterias fueron centrifugadas a 6,000 *g* por 10 min a 4°C, el botón celular se resuspendió en 10mL del amortiguador de resuspensión R3 con RNAsa A, posteriormente se añadieron 10 mL del amortiguador de lisis L7, mezclando cuidadosamente por inversión y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se añadieron 10 mL de amortiguador de precipitación (N3) mezclando por inversión. El lisado celular resultante se centrifugó a 12,500 *g* por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se vertió en una columna equilibrada con amortiguador EQ1, permitiendo que la solución se drenara por gravedad. Se añadieron 60 mL de amortiguador de lavado W8 a la columna, cuando todo el fluido se descartó, se añadieron a la columna 15 mL del amortiguador de elusión E4, permitiendo un flujo por gravedad en un tubo estéril. La solución eluida contiene el DNA purificado que fue precipitado con 10.5 mL de isopropanol, posteriormente se centrifugó el tubo a 12500 *g* durante 5 min a 4°C descartando el sobrenadante. El DNA se lavó una vez con 5 mL de etanol al 70%, descartando el sobrenadante. El botón de DNA purificado se resuspendió en amortiguador TE. Se determinó la concentración e índice de pureza y se almacenó hasta su uso a -20°C.

8.3 Líneas celulares

Se emplearon dos líneas celulares:

- La línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT, negativa a secuencias de VPH.
- La línea celular CaSki derivada de cáncer cervicouterino, positiva para la presencia de secuencias virales del VPH 16, tiene aproximadamente 600 copias integradas.

8.4 Cultivo celular

La línea celular HaCaT fue mantenida en medio Eagle de Dulbecco modificado (DMEM) enriquecido con suero bovino fetal (SFB) al 10% (Anexo 1.4) a 37°C en ambiente húmedo con CO₂ al 5%. La línea celular CaSki se mantuvo en medio RPMI (Gibco) suplementado al 10% con SFB en ambiente húmedo y CO₂ al 5%. Cuando los cultivos alcanzaron un 85% de confluencia se realizaron pases celulares de la siguiente manera: se aspiró el sobrenadante del cultivo y se lavó con PBS para después descartar esta solución de lavado. Se agregó una cantidad adecuada de tripsina al 0.5% (GIBCO®, 59418C), dejándola actuar durante 5 min hasta lograr el desprendimiento de las células. Luego se adicionó medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal para neutralizar la acción de la tripsina. La suspensión celular se centrifugó a 1,500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, para posteriormente eliminar el sobrenadante (solución de tripsina). Las células se resuspendieron cuidadosamente en medio fresco y se emplearon para los ensayos o bien se continuaron cultivando en medio.

8.5 Plásmidos

Se usaron dos plásmidos, pcDNA-HPV16E6 y pcDNA-HPV16E7 que expresan a la proteína E6 y proteína E7 del VPH16 bajo el control del promotor CMV y poseen el tag HA en su extremo amino terminal. El plásmido pCA se usó como plásmido control al carecer de secuencias codificantes.

8.6 Transfección

Para realizar la transfección del material genético a las células en cultivo, se empleó el método químico de dendrímeros activados en condiciones estériles utilizando el reactivo Polyfectamine (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para evaluar la expresión de proteínas, se sembraron 380,000 células HaCaT en placas de 60mm, se incubaron durante 24 horas para permitir adherencia y una confluencia del 70-80% aproximadamente. Se aspiró el medio y se añadieron 2mL de medio de cultivo nuevo, tras lo cual se transfectaron los plásmidos correspondientes: 2500 ng de cada uno de los plásmidos (pCA como control de transfección, pcD-VPH16E6 y pcD-VHP16E7), se incubaron durante 5 min con medio DEMEM -/- y posteriormente se les agregaron 8µl del reactivo Polyfectamine (Quiagen), se incubó por 25 min a temperatura ambiente y se agregaron 600 µl de medio DEMEM +/- . La mezcla final se agregó a las células. Después de 24 h el medio de cultivo fue retirado. Esta técnica se utilizó inicialmente para transfectar la línea celular HaCaT, de la cual se obtuvieron extractos proteicos que fueron utilizados para ensayos de Western blot (WB) en la evaluación de la expresión de E6 y E7.

8.7 Silenciamiento

Las células CaSki fueron transfectadas mediante la técnica de lipofección utilizando polifectamine 2000 siguiendo las instrucciones del fabricante, con los RNA de interferencia (siRNAs) para luciferasa o bien el siRNA dirigido al mensajero bicistrónico E6/E7. Las células fueron incubadas durante 72 hrs, término al cual se obtuvo un lisado celular empleando buffer laemli, para el análisis de las proteínas mediante inmunoblot utilizando los anticuerpos: Anti- CHOP (1:500) (Santa Cruz), Anti-CREB3 (1:1000) (Abcam), Anti-GRP78 (1:1000) (Santa Cruz), Anti- HERP (1:500) (Santa Cruz), Anti- p53 (1:500) (Santa cruz), Anti- α -actinina (1:1000)(Santa Cruz), este último usado como control de carga, o bien, las células fueron fijadas y procesadas para el análisis de inmunofluorescencia.

El siRNA contra E6/E7 fue el siguiente: UUA AAU GAC AGC UCA GAG G

8.8 Ensayos de PullDown

8.8.1 Purificación de proteínas de fusión: La producción de proteínas de fusión GST-VPH16E6, GST-VPH16E7 y GST fue inducida en bacterias *E. coli* DH5 α que contienen los plásmidos codificantes para las mismas. Se empleó isopropil- β -D-2-tiogalactopiranosido (IPTG) (1mM) como agente inductor. Posteriormente las bacterias fueron centrifugadas y lisadas empleando PBS/1% tritón. La fracción soluble, que contiene las proteínas de fusión, se obtuvo mediante centrifugación y fue incubada con perlas de glutatión sefarosa (Sigma Aldrich) durante 4 h.

Las perlas fueron lavadas tres veces con PBS/1% tritón y analizadas mediante corrimiento electroforético y tinción con azul de Comassie y así comprobar la presencia y pureza de las proteínas.

8.8.2 Ensayo de interacción *in Vitro*:

Se obtuvo un lisado de proteínas solubles de la línea celular HaCaT que contiene a las proteínas de interés. Cantidades iguales de estos lisados fueron incubados con las proteínas GST- VPH16E6, GST-VPH16E7 y GST, 10 % del lisado se utilizó para el input. Como control de interacción se evaluó la proteína hDlg (SAP97) la cual contiene un dominio PDZ que es reconocido por las proteínas E6 de los VPH de alto riesgo, así como pRb que es reconocida por la oncoproteína E7. Las muestras se analizaron mediante inmunoblot, utilizando los anticuerpos: Anti-CREB3 (1:1000), Anti-pRb (1:500) (Santa Cruz), Anti-SAP97 (1:1000) (Santa Cruz)

8.9 Western blot

Detección de los niveles de las proteínas E6, E7, CREB3 y sus blancos moleculares

Se realizaron ensayos de western blot utilizando proteínas totales de las células HaCaT 24 hrs postransfección y Células CaSki 72 hrs después de su silenciamiento.

8.9.1 Extracción de proteínas:

De la línea celular HaCaT o CaSki transfectadas se obtuvieron extractos proteicos totales, según las horas mencionadas anteriormente, se retiró el medio de cultivo y se procedió a lavar con 2

mL de PBS estéril. Posteriormente, las cajas con los cultivos se colocaron sobre hielo y se añadió directamente a las células 150 μ L de buffer de carga, que contiene Tris, SDS y β -Mercaptoetanol, se raspó de 10-15 veces, se lisó, pasando el raspado de 10-15 veces por una pipeta de 1000 μ L, se hirvió el lisado resultante y se conservó a -80 °C.

8.9.2 Electroforesis de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE):

Se realizó una electroforesis en medio desnaturizante con el fin de separar de acuerdo al peso molecular las proteínas presentes en las muestras. A cada muestra se le adicionó el volumen necesario de amortiguador de carga con una relación 1:1 (v:v). Se cargaron 20 μ L de proteína de cada muestra en geles poliacrilamida al 12% siguiendo el método de Laemmli, 1970. La electroforesis se llevó a cabo en un amortiguador de corrida 1x inicialmente a 80 V durante 30 minutos para permitir que las muestras se alinearan y posteriormente a 100 V hasta que el frente de migración salió del gel.

8.9.3 Transferencia:

Una vez que la electroforesis se completó, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de nitrocelulosa con poros de 0.2 μ m (Bio-Rad®), en una cámara X-Cell (Invitrogen) a 120V durante 1 h 20 min. Para verificar la correcta transferencia de las proteínas, la membrana se tiñó con una solución Rojo de Ponceau, el cual se une al extremo amino de las proteínas. Posteriormente, se lavó la membrana con TBS-T 1X hasta eliminar el colorante.

8.9.4 Bloqueo e incubación con el anticuerpo primario y secundario de interés:

La membrana se bloqueó durante 1 h a 37°C con leche al 10% en solución con TBS-T. Al terminar el bloqueo se realizaron 3 lavados con TBS-T 1X de 10 min cada uno en agitación. La membrana fue incubada con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C, seguido de tres lavados con TBS-T 1X en agitación durante 10min, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 h 30min a TA, posteriormente se lavó durante 10min tres veces con TBS-T. Los anticuerpos secundarios fueron

anti-conejo, anti-ratón (1:10,000) y anti-rata (1:20,000) acoplados a peroxidasa de rábano (HRP), los cuales se diluyeron en TBS-T 1X.

8.9.5 Revelado de las proteínas:

La detección se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia de alta sensibilidad, dónde el peróxido de luminol y un activador son sustratos de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario, las cuales al reaccionar, produce luminiscencia, permitiendo la detección mediante placas radiográficas, usando el reactivo Chemo Luminiscent (Bio-Rad) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

8.10 *Inmunofluorescencia indirecta*

Las células CaSki silenciadas o bien las células HaCaT transfectadas fueron cultivadas sobre cubreobjetos esterilizados. Transcurrido el tiempo de la transfección, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con una solución al 2% de paraformaldehído (PFA) en PBS durante 10 min a temperatura ambiente.

Después de 3 lavados con PBS, las células fueron permeabilizadas con una solución de tritón al 0.1% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente, tras lo cual se lavaron nuevamente tres veces con PBS. Las células fueron incubadas empleando los anticuerpos primarios Anti-CREB3 (1:200)(Abcam), Anti-CHOP (1:100)(Santa Cruz), Anti-HERP(1:100)(Santa Cruz), Anti-p53 (1:50), Anti-GRP78 (1:100) (Santa Cruz), en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Después de pasar toda la noche, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el respectivo anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa 488 (verde) o Alexa 555 (rojo), en una dilución 1:700 en PBS, en cámara húmeda por 30 min a 37°C cubierta de la luz. Transcurrido el tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS. Finalmente, para el montaje de las inmunofluorescencias, se retiró el exceso de agua de los cubreobjetos, se montaron sobre portaobjetos con una gota de medio de montaje con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, ProLong® Diamond Antifade Mountant with DAPI, Molecular Probes, P36962). Se guardaron a 4°C cubiertas de la luz hasta su análisis utilizando el microscopio de epifluorescencia EVOS FL (Thermo

Fisher Scientific). Las microfotografías fueron capturadas utilizando un objetivo 40X y analizadas mediante el software ImageJ (NIH).

8.11 Análisis estadístico

Para la comparación de resultados se realizaron análisis estadísticos aplicando la prueba *t*-student para determinar la significancia estadística de las condiciones probadas comparando con el control. Se realizaron 3 ensayos independientes, los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar ($\bar{x} \pm DE$).

9. RESULTADOS

9.1 E6 y E7 del VPH16 aumentan los niveles de ERE a través del marcador GRP78

Para el establecimiento del modelo de estudio, inicialmente se recuperaron los plásmidos de expresión de las proteínas de interés, luego de transformar bacterias *E. coli* DH5 α para obtener los plásmidos purificados y ser transfectados. Se estableció el modelo de estudio mediante la expresión de las proteínas E6 del VPH 16 (E6-16 en adelante) y E7 del VPH 16 (E716 en adelante) en la línea celular HaCaT. Para comprobar la expresión de los plásmidos transfectados se realizó un ensayo de inmuno blot. En este trabajo se emplearon proteínas recombinantes de E6 y E7 que en su extremo amino terminal tienen fusionada la etiqueta HA que permitió detectarlas mediante un anticuerpo anti-HA comercial, esto debido a la falta de anticuerpos eficientes que puedan reconocer a E6 y E7 del VPH16. En la [figura 17](#), se observa una banda de aproximadamente 17 kDa, correspondiente a E6 y E7 del VPH16 que indica la eficiente transfección de las células.

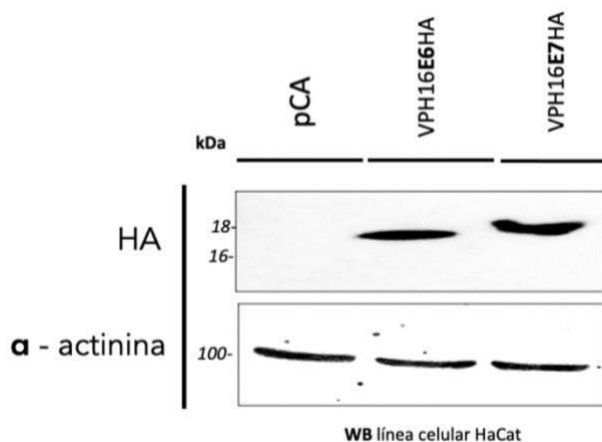


Figura 17. Expresión de los plásmidos E6 y E7 del VPH16.

Se observa la banda de E616 y E716 alrededor de los 17kDa detectadas mediante HA. La señal de HA se encuentra ausente en las células que fueron transfectadas con el vector vacío (primer carril). Se observa una banda a 100 kDa que corresponde a la α -actinina usada como control de carga.

Una vez comprobada la transfección se procedió a evaluar si las proteínas virales son capaces de inducir ERE, midiendo los niveles de GRP78, un marcador que se activa cuando hay ERE. Se encontró que las células que expresan las proteínas E6 y E7 del VPH16 aumentaron los niveles de ERE en comparación con el vector vacío ([figura 18](#)). De acuerdo con publicaciones recientes, las

oncoproteínas E6 y E7 del VPH 16 llegan al retículo endoplásmico, se acumulan y por ende son capaces de inducir estrés del retículo endoplásmico, esta inducción de ERE parece ser limitada y localizada. Los datos aquí obtenidos coinciden con aquellos publicados por Martínez-Puente en el 2020, quienes reportaron que epítopes de E6 y E7 llegan al RE se acumulan e inducen ERE. Siguiendo estos resultados, representamos la vía CREB3 que tras el estrés de ERE comenzaría su activación.

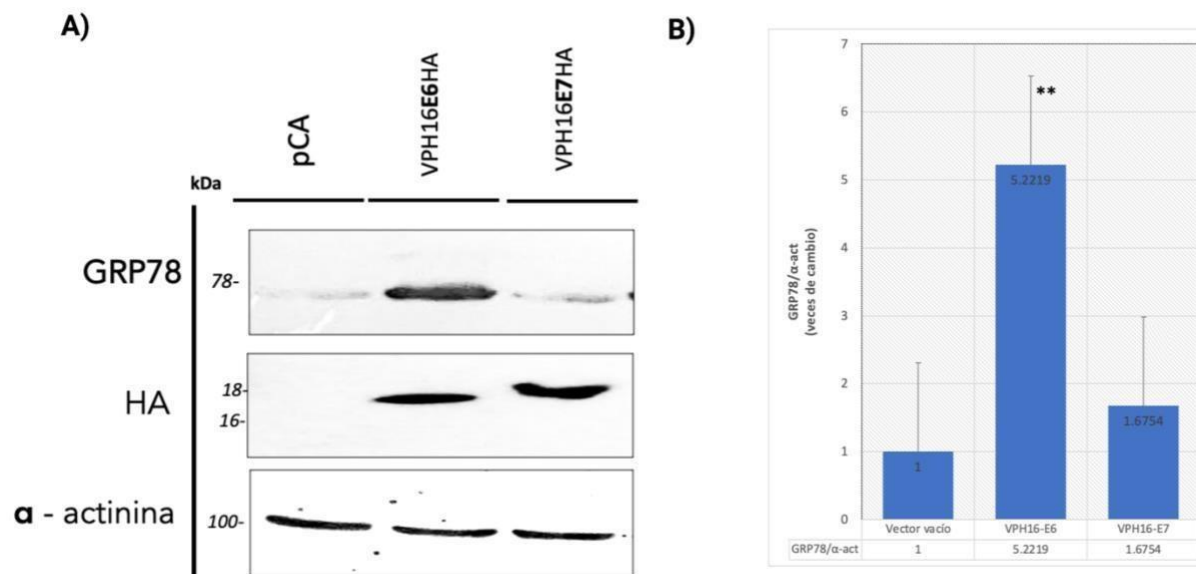


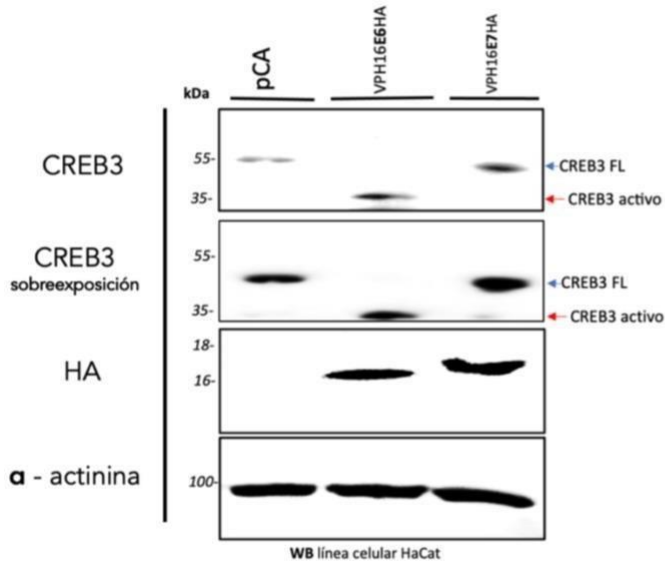
Figura 18. E6 y E7 del VPH16 aumentan los niveles del marcador de ERE GRP78.

A) Oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 aumentan los niveles de ERE a través del marcador GRP78. Inmunoblot representativo y B) densitometría donde se muestran los niveles de ERE (78KDa) en células HaCaT transfectadas de manera transitoria, como control de carga se empleo la proteína α -actinina (100KDa). Los datos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. Prueba t-student ** $p < 0.005$. $n=3$.

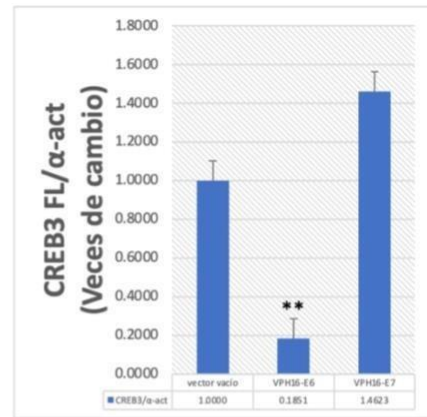
9.2 E6 del VPH16 induce la activación de CREB3.

Una vez identificado que E6 y E7 son capaces de promover ERE, evaluamos el efecto de las oncoproteínas sobre CREB3, encontrando que en presencia de E6 VPH16 los niveles de la proteína CREB3 completa disminuyen, pero existe un incremento en la forma activa de 35kDa reportada en la literatura como factor de transcripción (figura 19). A pesar de que pareciera que

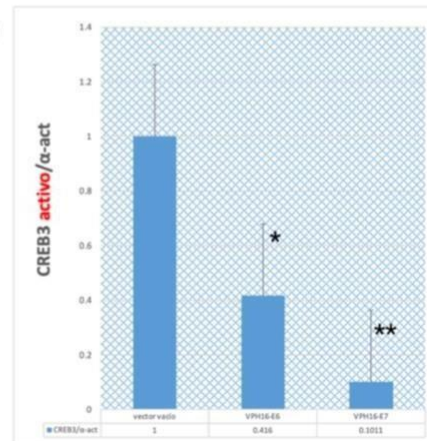
A)



i)



ii)



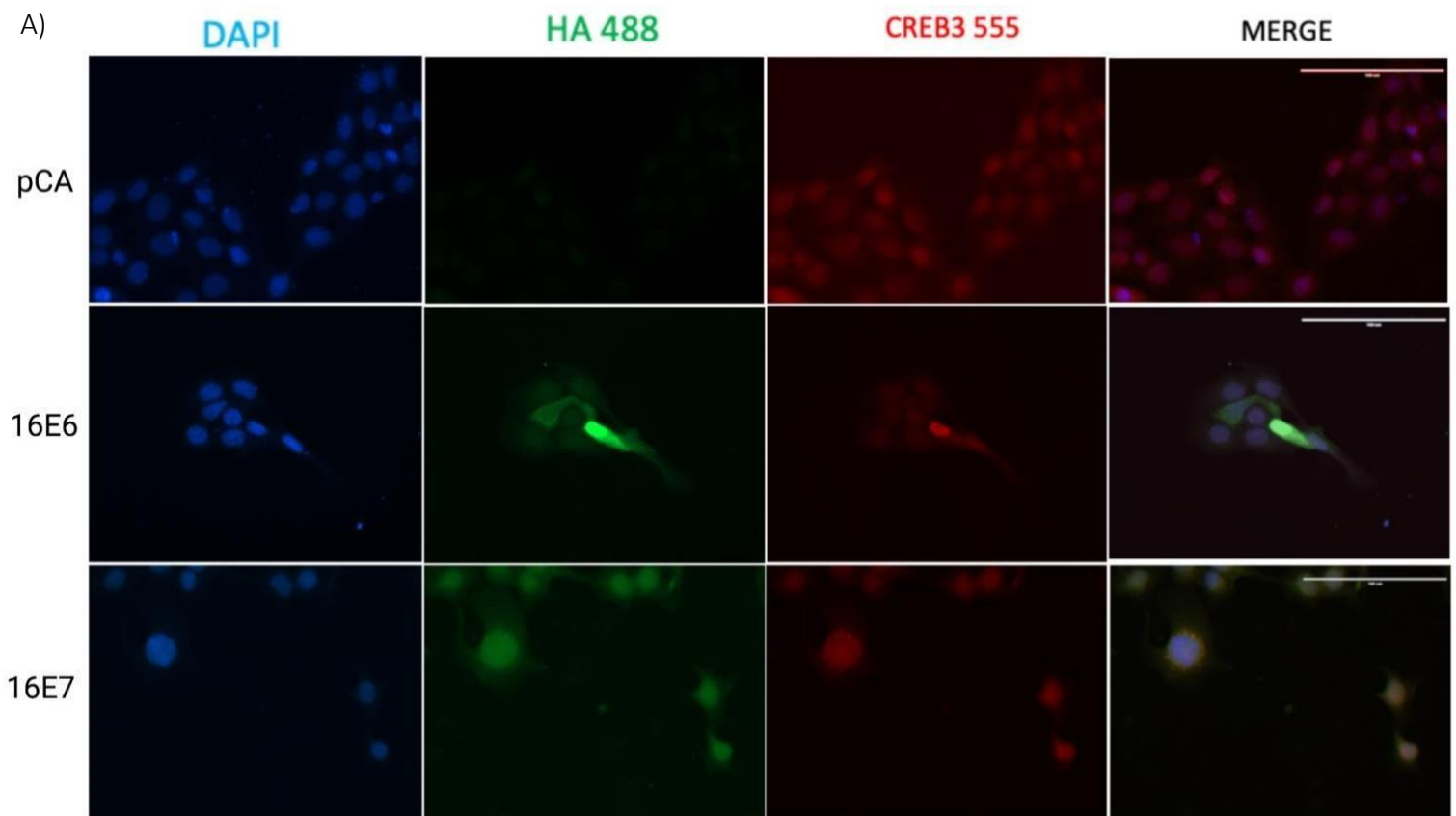
E7 de VPH16 no es capaz de promover la activación de CREB3, se observa una ligera banda en la forma activa cuando se sobre-expone la señal del inmunoblot. Esto indica que tal vez exista una activación de CREB3 por parte de E7 pero a un menor nivel que el realizado por E6.

Figura 19. Oncoproteína E6 del VPH16 activa a la proteína CREB3 en células HaCaT.

Inmunoblot y i), densitometría de los niveles de CREB3 en presencia de las oncoproteínas, ii) densitometría de los niveles de la activación de CREB3 por E6VPH16. Como control de carga se utilizó α -actinina (100KDa). Los datos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. Prueba t-student * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$. $n=3$.

9.3 CREB3 presenta una localización nuclear en presencia de E6 de VPH16.

Si bien los niveles de la forma activa de CREB3 se ven incrementados en presencia de E6, nos propusimos evaluar si estos logran ser traslocados al núcleo, lo cual permitiría evaluar de manera indirecta su función como factor transcripcional. Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta se evaluó el efecto de las oncoproteínas sobre la localización subcelular de CREB3. Primeramente se encontró que tanto E6 como E7 de VPH16 exhiben una localización mayoritariamente nuclear (señal verde). En el caso de CREB3 (señal roja), se encontró que existe una acumulación nuclear en presencia de E6 de VPH16, mientras que en presencia de E7, se observa señal perinuclear, lo cual podría indicar que se acumula en el RE (*figura 20*), dicho efecto se aprecia en la ampliación de la figura 20B.



B) Ampliación de la señal para el canal de CREB3 (Alexa 555)

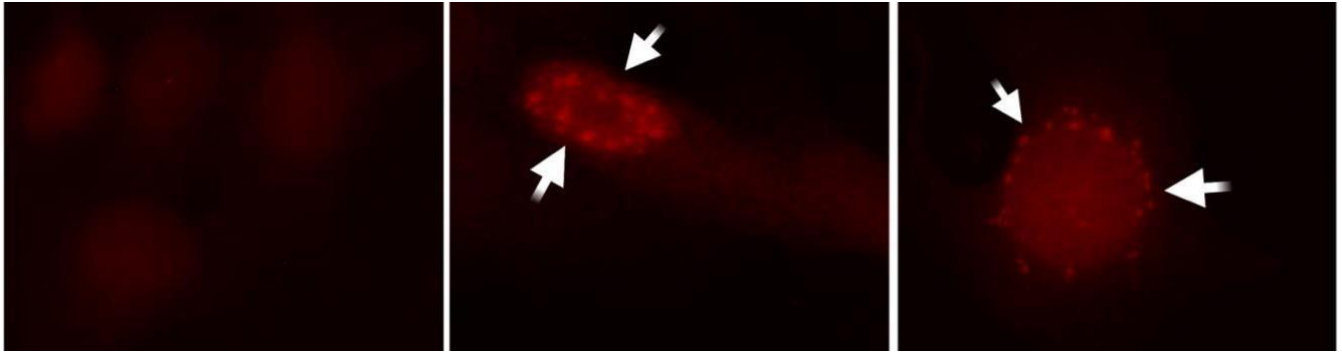


Figura 20. Localización de CREB3 en presencia de E6 y E7 del VPH16 en células HaCaT.

A) Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia, en la línea celular HaCaT transfectada con los plásmidos que expresan E6HA y E7HA del VPH16 B) Ampliación del tercer campo para CREB3 555 donde se señala la localización nuclear en presencia de E6 en comparación con el plásmido vacío pCA.

9.4 Las proteínas blanco de CREB3 (HERP y CHOP) aumentan en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH16.

Teniendo como base el incremento de CREB3 tanto por E6 como por E7, proseguimos a evaluar los niveles de las proteínas HERP y CHOP las cuales están descritas como blancos directo e indirecto de CREB3, respectivamente. Los niveles de estas proteínas fueron evaluados mediante western blot, encontrando que las oncoproteínas E6 y E7 aumentan significativamente los niveles de HERP y CHOP (*figura 21*)

Adicionalmente se procedió a evaluar la localización subcelular de CHOP para corroborar su activación, debido a que es un factor de transcripción. Mediante inmunofluorescencia indirecta, encontramos que CHOP presenta mayores niveles y una localización tanto nuclear como en el citoplasma en presencia de E6 VPH16 (*figura 22*) indicando que CHOP no solo incrementa sus niveles, sino que podría estar activa al encontrarse en núcleo (*figura 22B*).

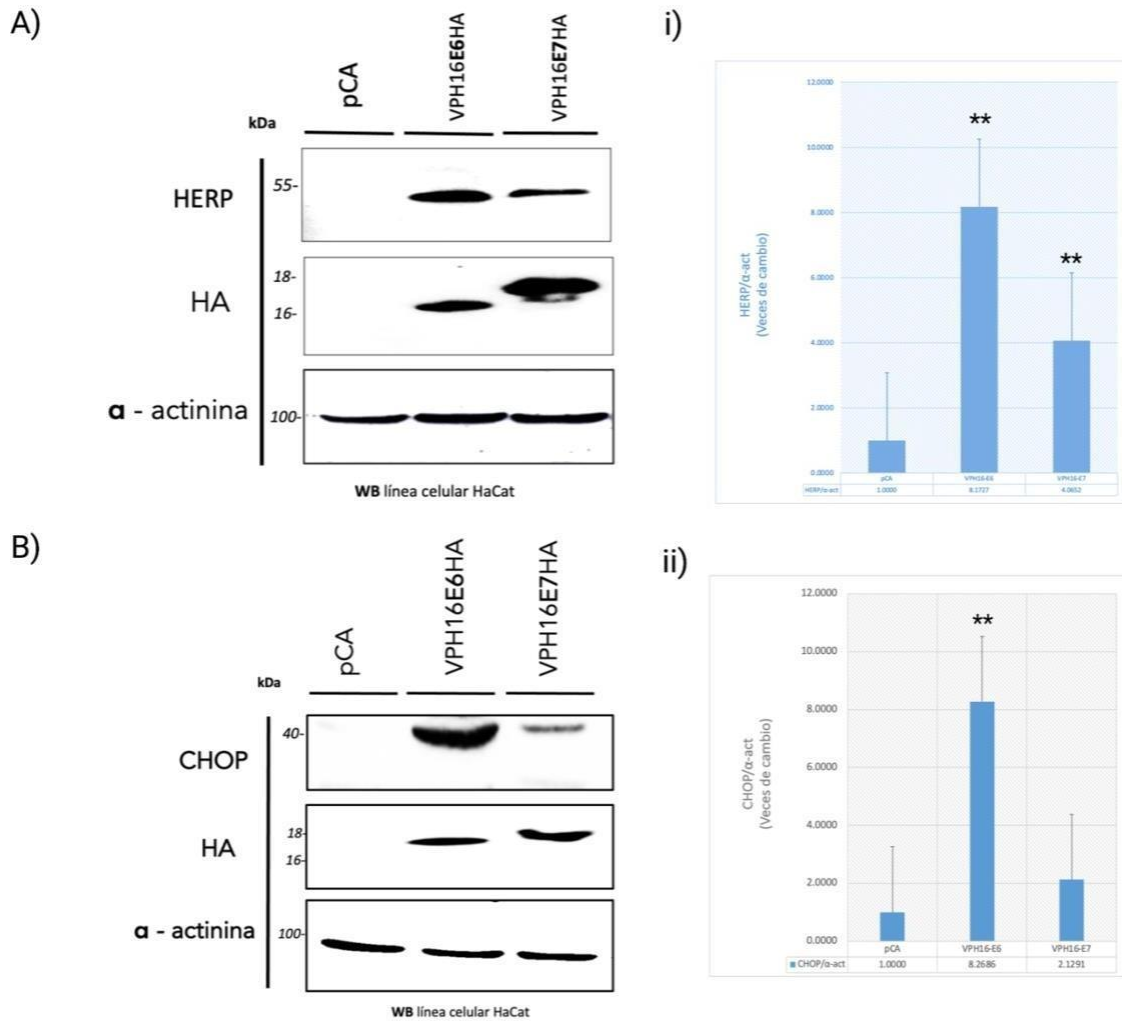
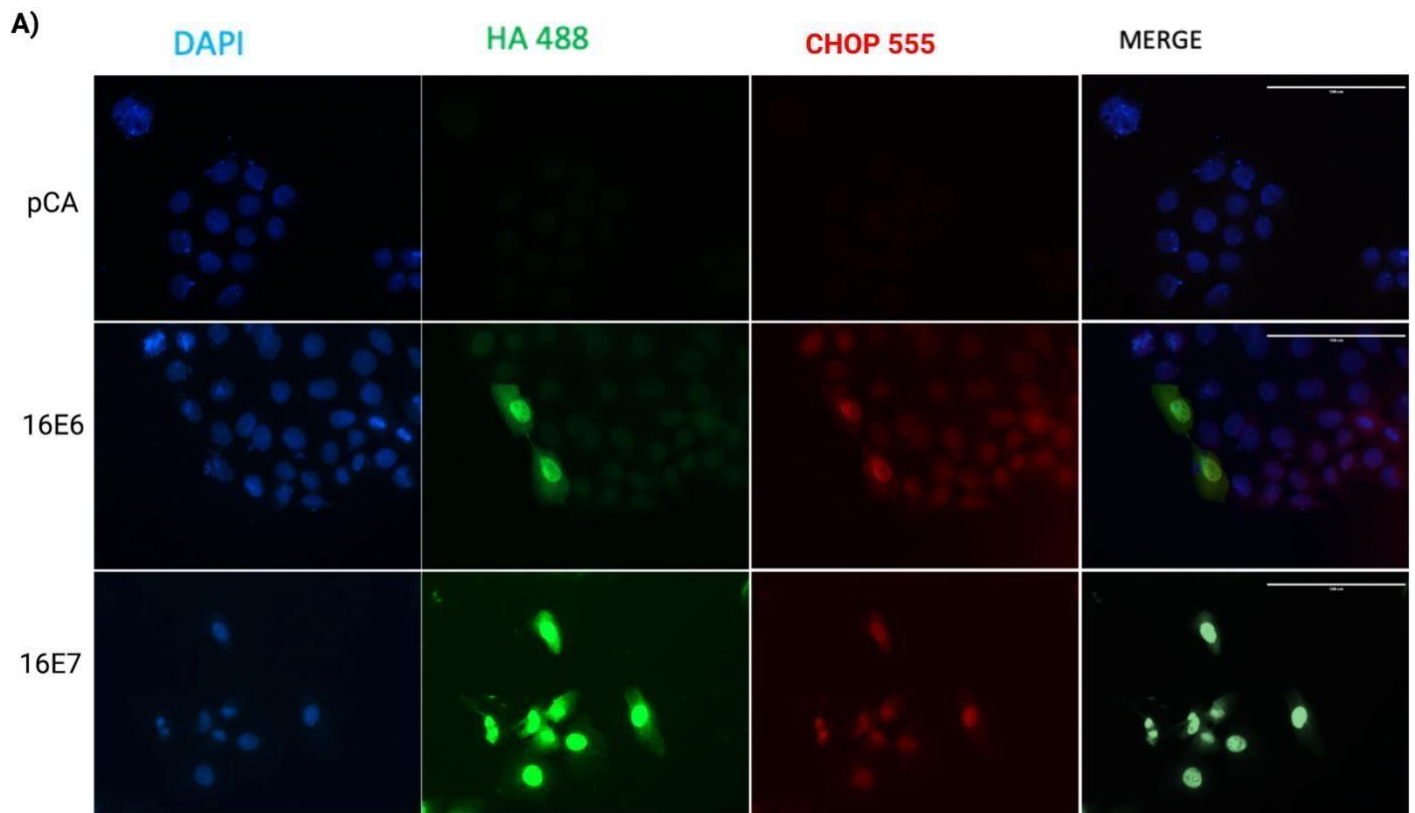


FIGURA 21. E6 y E7 del VPH16 aumentan los niveles de HERP y CHOP.

A) Immunoblot representativo de HERP i) densitometría donde se muestran los niveles de HERP (54KDa) B) Immunoblot representativo y ii) densitometría donde se muestran los niveles de CHOP (40KDa) en células HaCaT transfectadas de manera transitoria, como control de carga se empleó la proteína α -actinina (100KDa). Los datos se expresan como $\bar{x} \pm DE$. Prueba t-student * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$ n=3.



Ampliación de tercer canal: 16 E6 CHOP 555

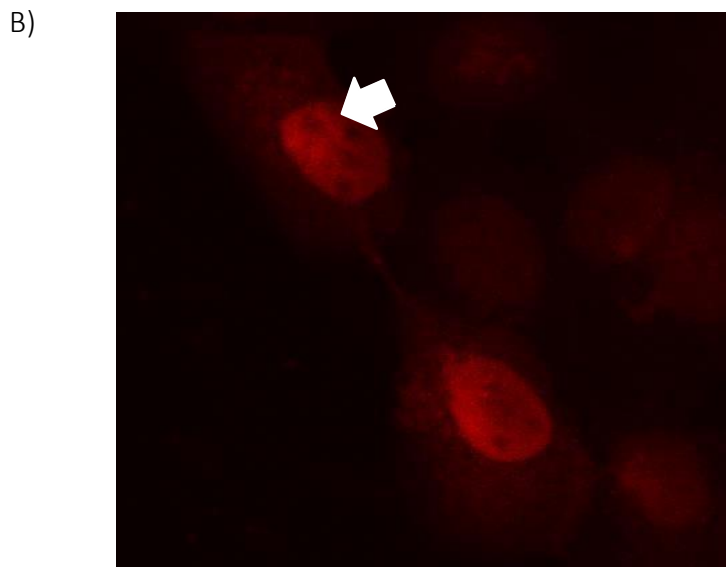


FIGURA 22. Localización nuclear de CHOP en presencia de E6. A) Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia, en la línea celular HaCaT transfectada con los plásmidos que expresan E6HA y E7HA del VPH16 B) Ampliación del tercer campo para CHOP 555 donde se señala la localización nuclear en presencia de E6 en comparación con el plásmido vacío pCA.

Vía CREB3 en función a los resultados obtenidos en la línea celular HaCaT transfectada con los plásmidos que expresan E6 y E7 VPH16HA.

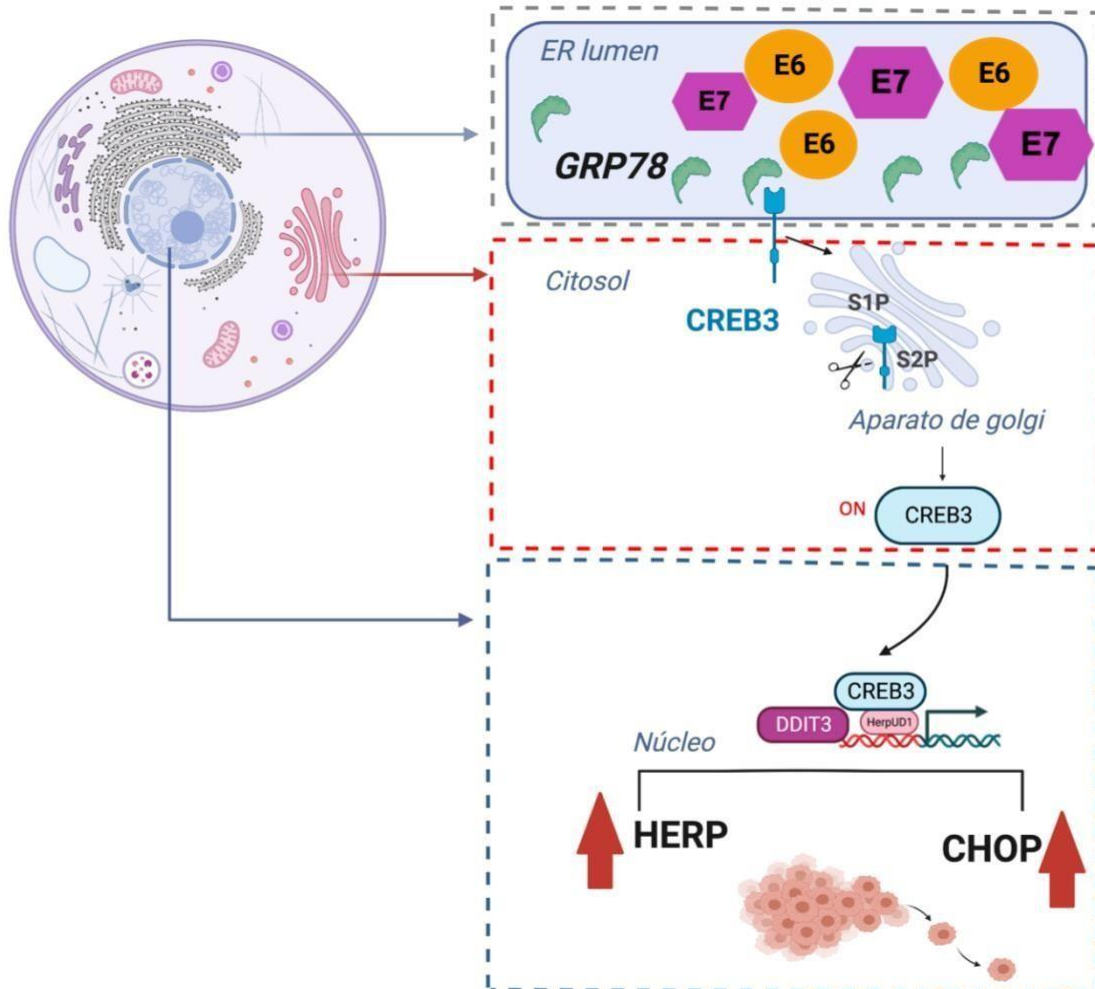


FIGURA 23. Vía de CREB3 posterior a la transfección de E6 y E7 del VPH16.

La línea gris hace referencia al evento donde la proteína GRP78 estaría acumulándose en RE en nuestro modelo de transfección transitoria en las células HaCaT con los plásmidos que expresan VPH16E6HA y VPH16E7HA. La línea roja hace referencia al momento donde la proteína CREB3 reconoce el ERE y es activada por VPH16E6HA según lo observado en los inmunoblot, por último, se representa con la línea color azul, el aumento de las proteínas HERP y CHOP que son blancos moleculares de CREB3.

9.5 Niveles de CREB3, HERP y CHOP incrementan en ausencia de E6/E7 en la línea celular CaSki (positiva a VPH16).

Con el fin de validar el efecto observado en la línea celular HaCaT, se procedió a silenciar la expresión de los oncogenes E6/E7 en la línea celular CaSki que es positiva para VPH16. Se silenciaron mediante el uso de siRNAs, encontrando que en ausencia de E6/E7 hay una recuperación de p53 con lo que se comprueba la efectividad del silenciamiento. De manera interesante, el abatimiento de E6/E7 provoca una disminución del estrés del retículo endoplásmico, al verse reducidos los niveles de GRP78 (*figura 24*). Así mismo, se determinó que los niveles de CREB3 se incrementan cuando se abate la expresión de E6/E7, indicando que estas oncoproteínas poseen la capacidad de disminuir a CREB3 en este modelo.

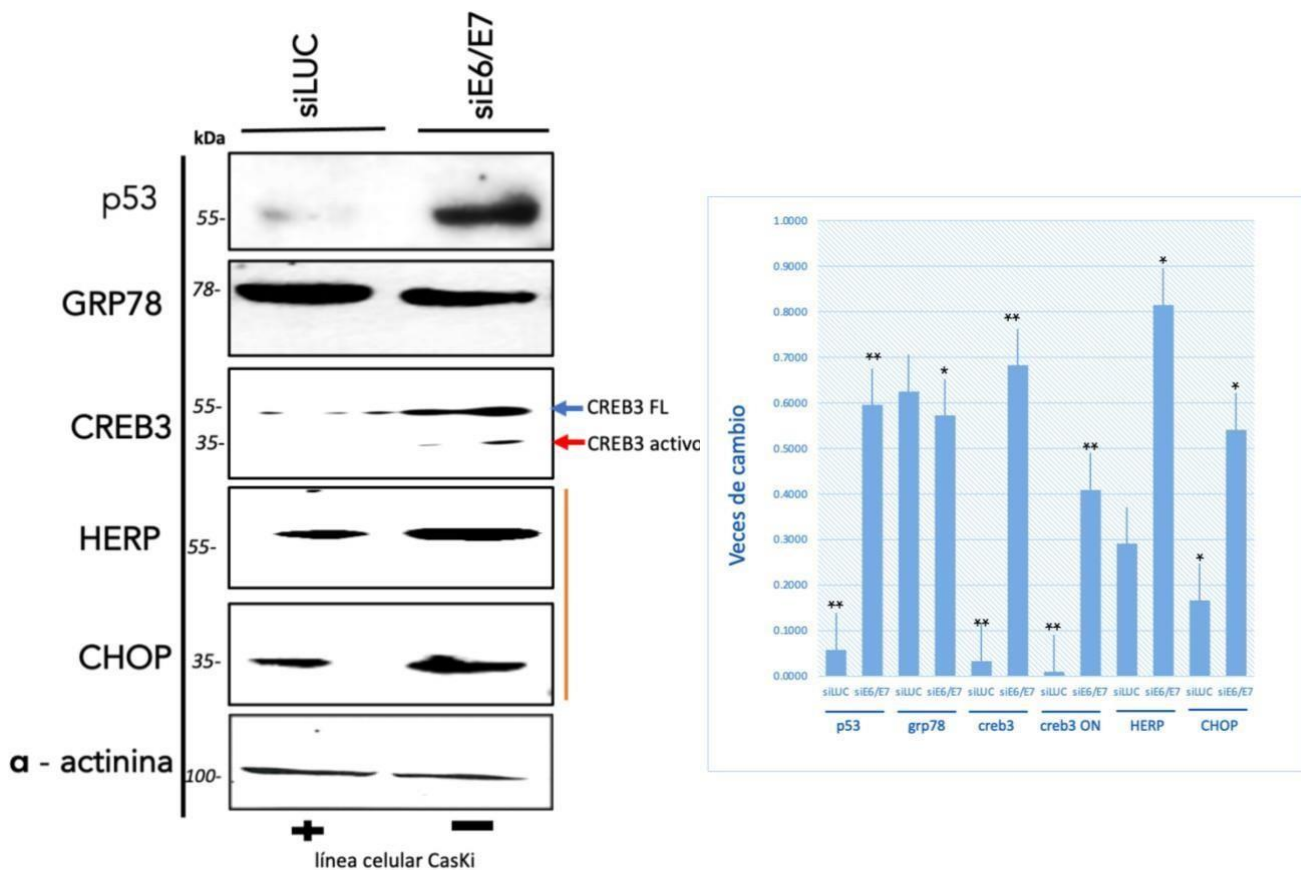
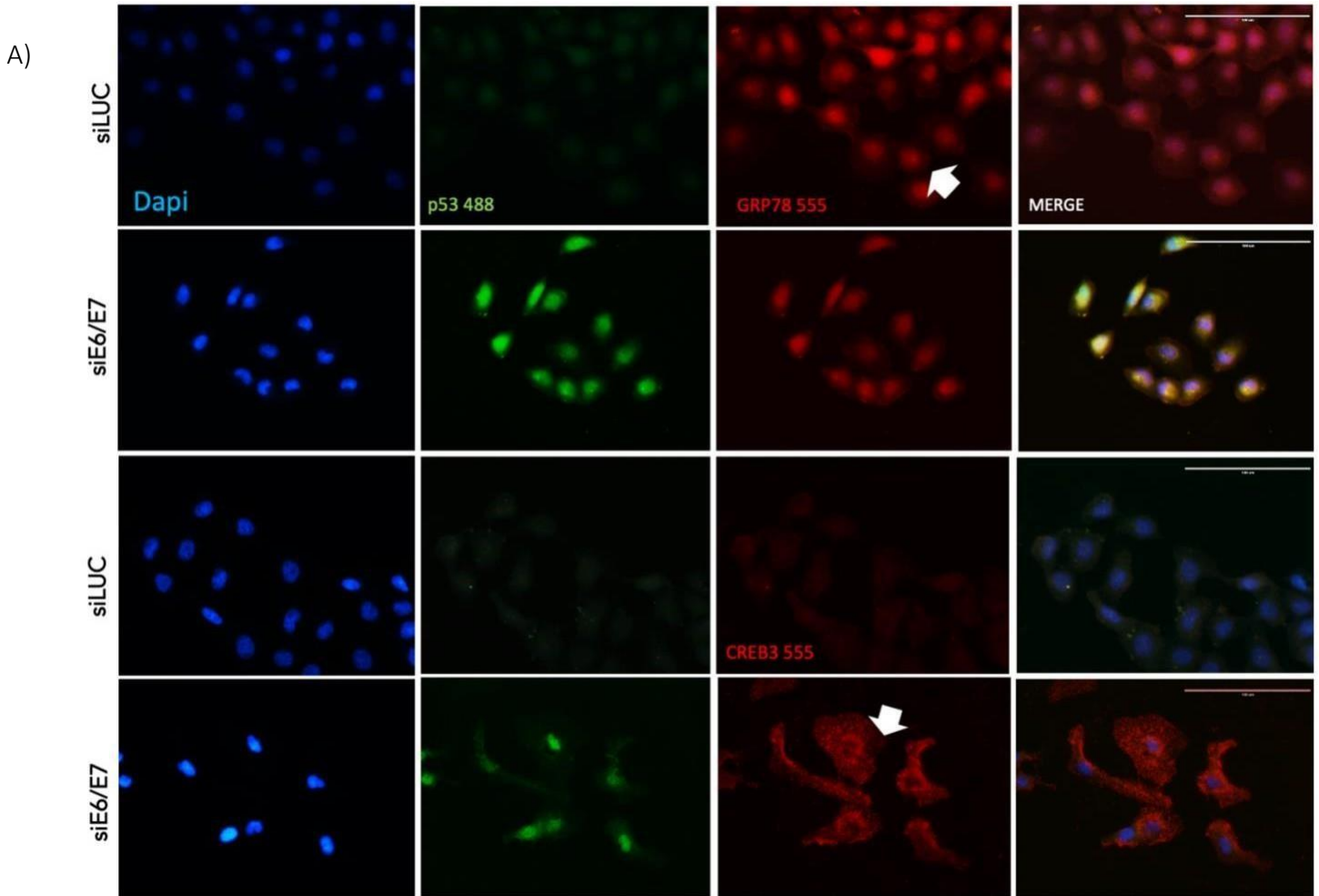


FIGURA 24. Modelo de silenciamiento en la línea celular CaSki positiva para VPH16, dónde mediante inmuno blot e inmunofluorescencia se evaluó los niveles y localización de GRP78, CREB3, HERP Y CHOP, utilizando a p53 como control de la técnica, los niveles de CREB3, HERP y CHOP fueron incrementados en ausencia de E6/E7

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante western blot también fueron evaluados mediante inmunofluorescencia encontrando que GRP78 disminuye y aumenta los niveles de CREB3 al silenciar a E6/E7 (*figura 25*).



Ampliación de tercer canal de siE6/E7: CREB3 555 y MERGE.

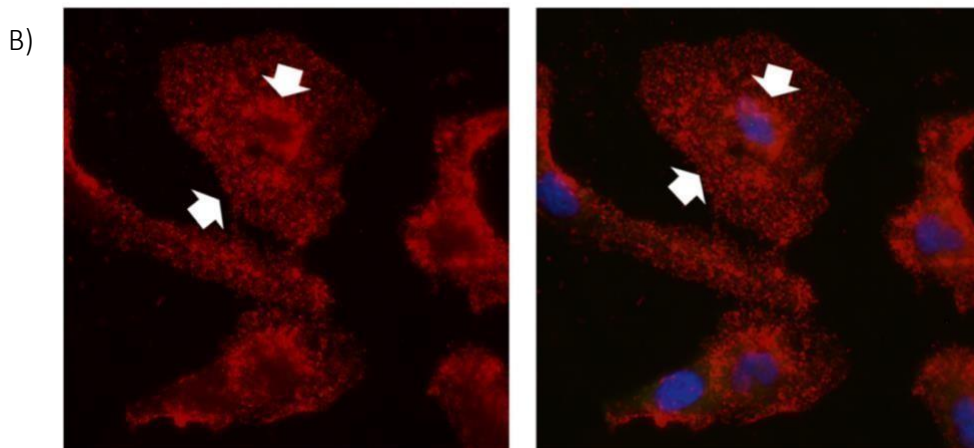


FIGURA 25. GRP78 disminuye al silenciar a E6/E7 y aumenta los niveles de CREB3

A) Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia, en la línea celular CaSki silenciada con siRNA E6/E7 B) Ampliación del tercer campo para CREB3 555 y el MERGE donde se señala la localización en el retículo endoplásmico de CREB3.

Respecto a las proteínas blanco de CREB3 (HERP y CHOP), estas mostraron niveles aumentados cuando silenciamos a E6/E7.

El siguiente esquema representa los dos modelos utilizados. **a)** Modelo de transfección transitoria en la línea celular HaCaT. En este modelo se realizó la transfección con los plásmidos que expresan a las proteínas E6 y E7, dicha transfección no permite que las secuencias de los oncogenes se integren al DNA celular, por lo tanto podemos inferir que se generó ERE agudo. Por otra parte, al emplear **b)** un modelo de silenciamiento en la línea celular CaSki, un carcinoma epidermoide positivo para VPH, el ERE evaluado resulta de un estímulo crónico. Con base en los datos obtenidos, inferimos que el silenciamiento de E6/E7 reduce el ERE crónico, el cual podría estar jugando un papel diferente en la regulación de la actividad de CREB3, presentando diferentes niveles en los inmunoblot mostrados, ya que ambos contextos celulares son diferentes, y por consecuencia alteran de forma diferente los niveles de las proteínas blanco de CREB3.

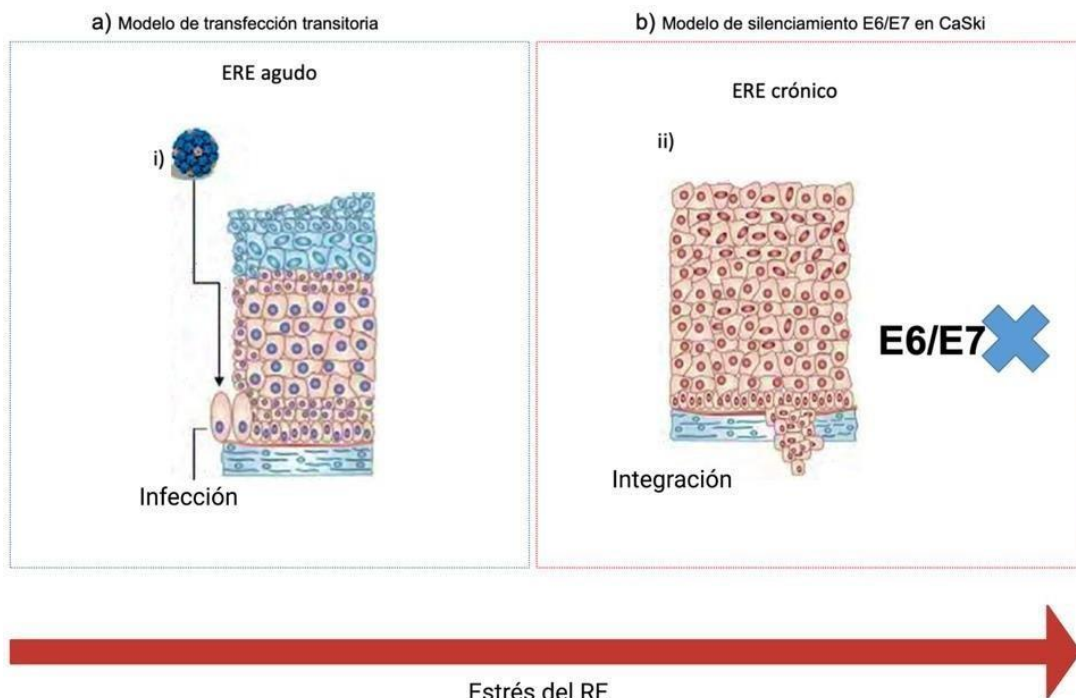
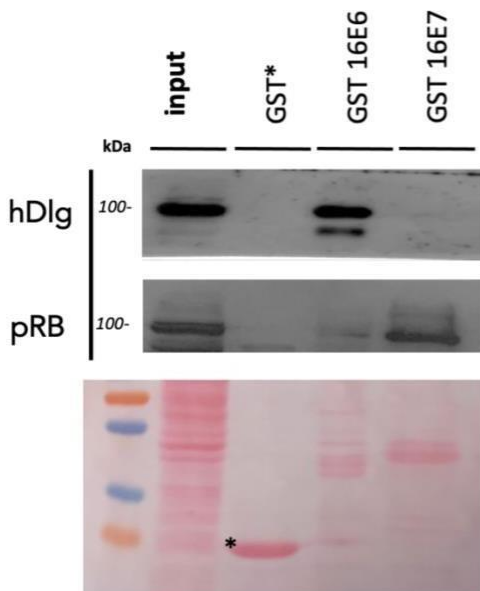


FIGURA 26. Esquema de los modelos celulares empleados. A) Modelo de transfección transitoria propuesta como un modelo que genera ERE agudo, al ser una transfección que no se integra al DNA celular. b) Modelo de silenciamiento en la línea celular CaSki positiva para VPH16 propuesta como ERE crónico al ser una línea celular derivada de un carcinoma epidermoide y presentar la regulación de oncogenes y regulación de vías celulares.

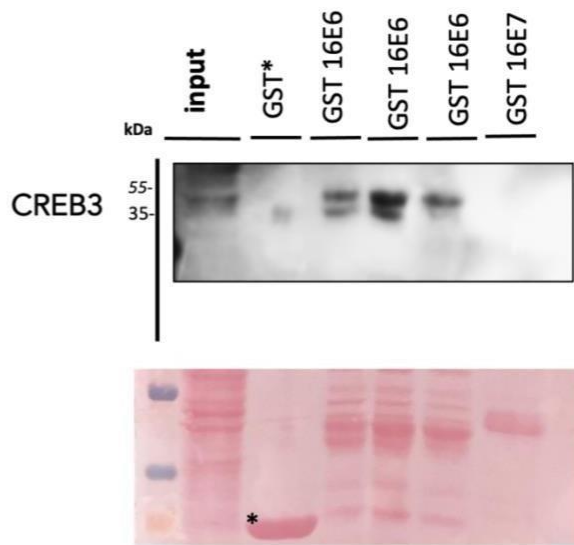
9.6 CREB3 interactúa con la oncoproteína E6 del VPH 16.

Es bien sabido que varios de los efectos de producidos por las oncoproteínas del VPH se basan en la interacción con blancos celulares. Con la finalidad de evaluar la potencial interacción entre CREB3 y las oncoproteína E6 y E7 de VPH16 se realizaron ensayos *de pull down*. Como control de interacción se evaluó la proteína hDlg (SAP97) la cual contiene un dominio PDZ que es reconocido por las proteínas E6 de los VPH de alto riesgo y para la proteína E7 se utilizó como control de interacción a la proteína pRb (*figura 27a*). Se determinó que las proteínas E6 de VPH16AR, son capaces de interactuar con CREB3 (*figura 27b*). Se observó que esta interacción es específica para las proteínas E6 y no para la oncoproteína E7, probablemente debido a la capacidad de interactuar con motivos LxxLL por parte de E6.

a) Controles de interacción para E6 y E7



b) CREB3 interacta in vitro con VPH16E6



c) Modelo de interacción in vitro

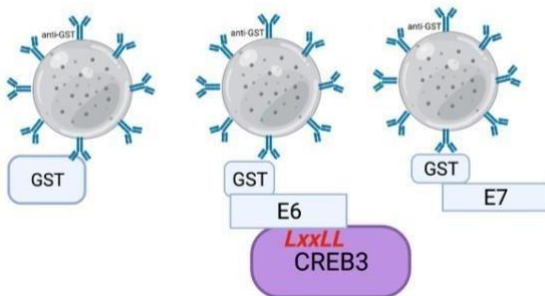


FIGURA 27. E6 del VPH16 Interacciona con el factor CREB3 in vitro.

Imágenes representativas de la técnica PullDown que se empleó para determinar la interacción entre las oncoproteínas E6 y E7 con CREB3 a) Controles de interacción: para E6 se utilizó hDlg y para la E7 el control fue pRb. b) La Oncoproteína E6VPH16 y CREB3 están interaccionado de manera in vitro en la línea celular HaCaT c) Modelo de interacción entre E6 del VPH16 y CREB3, el cuál podemos sugerir que sería posible mediante el reconocimiento de los motivos LxxLL que presenta CREB3 en su extremo N-terminal.

10. DISCUSIÓN

Diversos estudios muestran que ante el estrés del RE, las células activan una serie de mecanismos adaptativos como la respuesta de proteínas desplegadas (UPR). Cuando las células sufren estrés del RE irreversibles, el mecanismo de UPR elimina las células dañadas por apoptosis, lo que indica la existencia de sensores que integran información sobre la duración y la intensidad de los estímulos de estrés. Esta información nos hace preguntarnos, ¿qué es lo que sucede cuando el estrés del retículo endoplásmico persiste y se vuelve crónico? Y ¿de qué manera las proteínas sensoras pueden regular la respuesta de RE para atenuar el estrés, y si, ¿las células pueden sobrevivir a estos estímulos que se están generando de forma constante (crónica)? Además, ¿Qué ocurre si todo esto sucede en un contexto donde en primer instancia hay una infección por el Virus del Papiloma humano? y dicha infección es de los casos que logra persistir.

En este escenario, la UPR integra un marco de señalización dinámica para mantener la homeostasis de los orgánulos en un entorno de una red dinámica y flexible de eventos de señalización que está respondiendo a un entorno pro-carcinogénico de la célula hasta llegar al cáncer debido a la infección persistente del VPH-AR. En dicho contexto, los tumores prosperan en condiciones adversas, como hipoxia, falta de nutrientes y estrés oxidativo, ajustando su capacidad de plegamiento de proteínas a través de las vías de respuesta al estrés del RE.

Es importante hacer énfasis que el estrés del RE dicta el destino de la célula según el contexto y la intensidad de la señal que está recibiendo¹⁰⁶. La activación de UPR en diferentes fases de la progresión del cáncer es mucho más compleja de lo previsto, a este respecto, diversos estudios muestran que la intensidad y la atenuación de la UPR determinan los niveles fisiológicos de estrés que las células experimentan, en las que la señalización de UPR puede perpetuarse por un tiempo indefinido. En particular, se ha mostrado que diversos virus activan la UPR tras la infección, uno de los más notables es VHC, que puede generar una infección latente o progresar a hepatitis crónica, cirrosis o carcinoma hepatocelular. Sin embargo, aún no se comprende bien cómo la infección viral persistente conduce a estos destinos alternativos, aunque el proceso se ve

afectado por el mecanismo de la UPR, un posible factor sería si el VHC y otros virus presentan mecanismos como secuestrar la UPR para provocar la supervivencia y la adaptación celular y así favorecer el desarrollo de carcinomas^{106,144}. Evento que sería importante en el caso del cáncer provocado por VPH.

Historia natural del cáncer y CREB3.

De manera interesante, los virus desencadenantes de ERE suelen ser los que tienen efectos citopatogénicos o de virulencia. Los virus modulan de manera diferencial la UPR en diferentes etapas de la infección, por ejemplo DENV¹⁴⁵, la infección por DENV temprana induce la fosforilación de Eif2a mediada por PERK pero después suprime esa vía. Se hace referencia a la infección viral, puesto que nuestro primer modelo que utilizamos el cual consiste en la tranfección transitoria de los plásmidos E6 y E7 de VPH16, estaría siendo análogo a este proceso de infección y ERE agudo, ambos escenarios se ilustran en la [figura 28](#). Por lo tanto, suponemos que el VPH así como otros virus oncogénicos podrían desencadenar niveles altos de ERE, posterior a la tranfección en un modelo *in vitro*, a su vez, también se estaría generando niveles altos de ERE *in situ*, posterior a la infección. No lo sabemos, pero podemos inferirlo basándonos en nuestros resultados y la literatura aquí citada. Ya que se ha reportado que durante la etapa temprana de algunas infecciones virales, solo se induce la proteólisis de ciertas proteínas que están río abajo de las proteínas sensores de la UPR, (ATF6), a medida que avanza la infección por el virus, las proteínas sensores de la UPR activadas son totalmente abortadas debido a otras proteínas virales, como por ejemplo VHS e ICP27 que degradan ciertos mRNA celulares¹⁴⁶. Un mecanismo similar podría ocurrir entre el mRNA de la proteína CREB3 y las oncoproteínas del VPH16. Por otro lado, un segundo mecanismo por el cual se regula temporalmente la UPR (CREB3) está asociado con la estabilidad de las proteínas virales, por ejemplo herpes virus reprime la transactivación mediada por VP16 mediante la interacción directa HCF-CREB3, en estecaso particular es para establecer la latencia de la infección por HSV¹⁴⁷.

En nuestros resultados sobre CHOP en el modelo de transfección ([figura 21](#)) se observan niveles elevados de la proteína en la presencia de E6 y E7, a este respecto podemos sugerir que se debe

porque en el comienzo de la infección, las células inician la apoptosis, lo que puede facilitar la liberación de partículas virales de las células huésped^{148,149,150}. Por lo que podemos sugerir que en el segundo modelo (*figura 24*) empleando la línea celular CaSki derivada de cáncer, los niveles de CHOP están disminuidos, recordando que CHOP desencadena la apoptosis al inducir la transcripción del receptor de muerte 5 (DR5)¹⁵¹. En consecuencia podemos sugerir que VPH podría estar regulando el mecanismo de apoptosis de forma indirecta a través de CHOP que es un gen río abajo de CREB3 con el fin de permitir la supervivencia celular (*figura 28*).

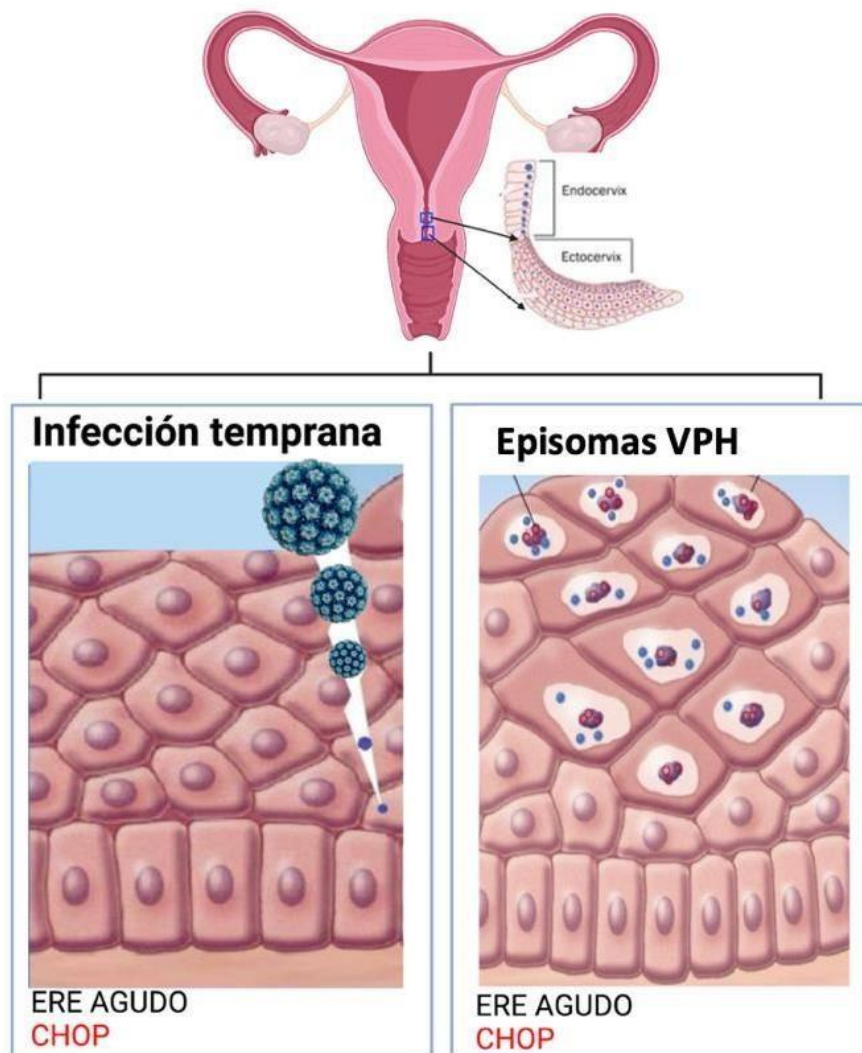


Figura 28. Niveles de ERE en el contexto de infección por VPH. En este trabajo sugerimos que el ERE es diferente según el evento en el que se encuentre la infección, integración del virus o en el contexto de cáncer. Imagen modificada de Goodman, A y Wilbur, DC en Biorender.

De manera interesante se ha reportado que la regulación a la baja de la transcripción de CHOP, puede ser un mecanismo para prevenir la muerte de la células huésped en infecciones virales^{152,153}. También se ha reportado que las proteínas del virus EBV: EBNA 3A y 3C suprimen la expresión de la proteínas Bim y Noxa relacionadas con la disminución de CHOP. Además se ha informado que las proteínas del los virus HCV (NS2, NS5A), SV5 (V, SH), SARS-CoV E y RSV (NS1, NS2) inhiben la apoptosis a través de mecanismo desconocidos^{154,153}. Esto podría ser un mecanismo empleado por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH para disminuir la muerte celular (CHOP) en un contexto carcinogénico como lo es la línea celular CaSki empleada en nuestro segundo modelo y donde observamos niveles disminuidos de CHOP, a este respecto Galindo y colaboradores mencionan que la regulación a la baja de CHOP puede ser un mecanismo para prevenir la muerte de las células¹⁵².

Posterior a la infección viral, los niveles del ERE debería ser leve o nulo en especial en aquellos virus que son carcinogénicos, puesto que para llegar a promover el proceso carcinogénico es necesaria la infección persistente por varios años, por lo que a través del tiempo y la permanencia crónica de la infección, es necesario poder permanecer replicándose sin causar niveles elevados de ERE, ya que si la célula se encuentra bajo un estrés de ER intenso o sin resolver, durante todo este periodo de tiempo las células no lograrían recuperar la homeostasis del RE, y en cambio, iniciarían las cascadas apoptóticas intrínsecas. Hay distintos mecanismos descritos de cómo los virus regulan el ERE, uno de ellos es que logran modificar el retículo endoplásmico para crear un compartimento adecuado para la replicación, se ha demostrado que DENV, VZV y JEV estimulan la proliferación del RE y se ha informado que el VHC altera la estructura del ERE^{155, 156, 157} por otro lado se ha reportado que las proteínas virales que se sintetizan, procesan o se ubican en el RE tienden a desencadenar el ERE, incluidos PXV TGBp3, pedv (E, N), las glicoproteínas de los virus (SFV, LCMV, TULV, BVDV, DENV, JEV, VZV, HSV-1 y proteínas transmembrana o ancladas a la membrana ER HCV (NS4B, E2) y las oncoproteínas nucleares: **E6, E7 del VPH16** como nuestros resultados indican (*figura 18*) así como los de Hernandez-puente y cols⁵² demostraron, son capaces de inducir ERE en las células. Por lo tanto, la evidencia indica que una gran cantidad de virus son capaces de provocar estrés en el RE durante su infección (*figura 29*). Sin embargo,

nuestra atención recae en aquellos que presentan un mecanismo donde la infección e integración puede llegar a desencadenar eventos pro-carcinogénicos, como lo es VHC, VHB y por supuesto, el **VPH**. A este respecto se ha publicado que algunas proteínas virales funcionan como un pseudosustrato de PERK para secuestrar su actividad, como las proteínas VHC E2¹⁵⁸. También se ha reportado que los replicones subgenómicos del VHC y la infección por el HCMV suprimen la vía IRE1-XBP1 al inhibir la actividad transcripcional de las XBP1, así como la inducción transcripcional de EDEM, para mejorar la síntesis de sus proteínas virales y que la infección sea persistente, algo similar podría ocurrir con el VPH-AR. Queda por estudiar si los virus modulan la vía RIDD que es mediada por CREB3 para su activación transcripcional. Las ramas de la UPR son inhibidas por MHV y HCMV, ya que suprimen la activación de sus genes objetivos río

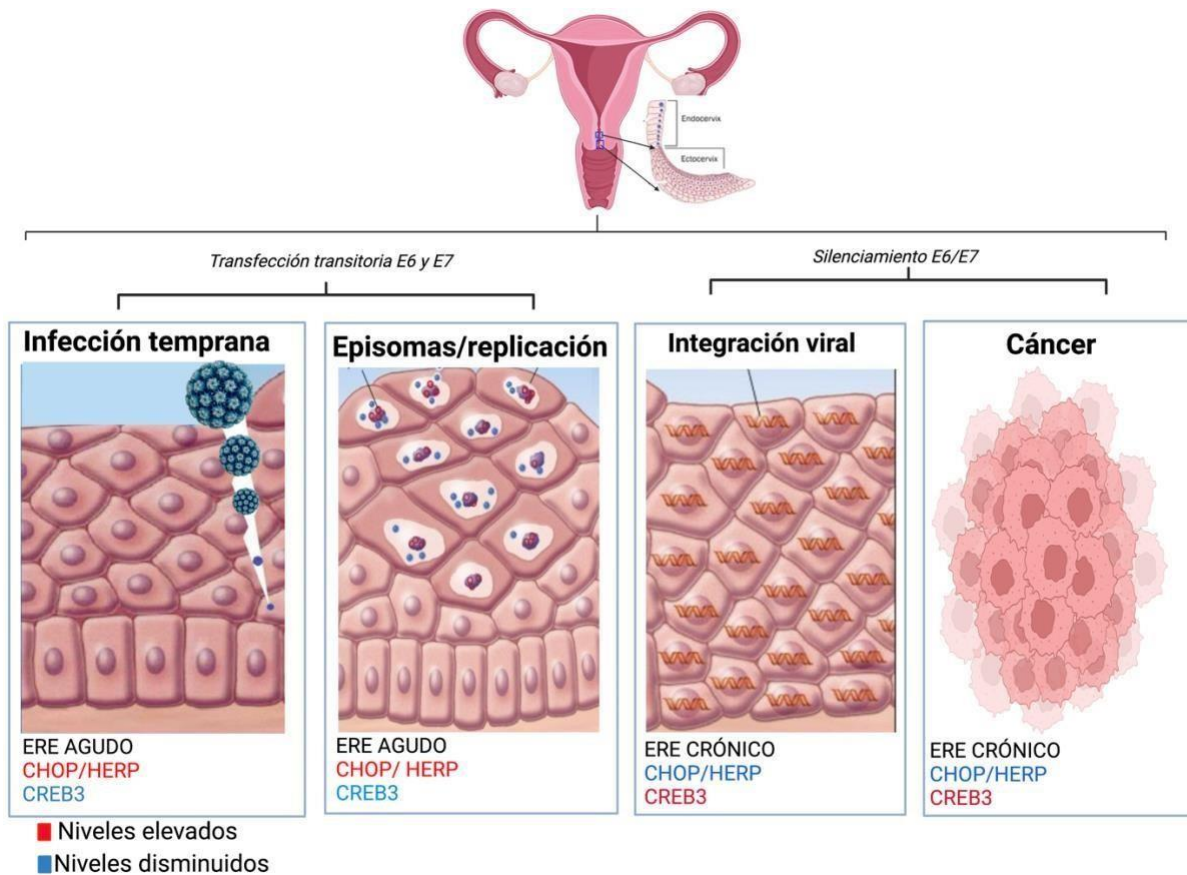


Figura 29. Niveles de ERE en el contexto de integración viral y cáncer. En este trabajo sugerimos que el ERE es diferente según el evento en el que se encuentre la infección, integración del virus o en el contexto de cáncer. Imagen modificada de Goodman, A y Wilbur, DC en Biorender

abajo^{159,160,161}.

Se puede inferir sobre las características de los mecanismos mediante el cual los virus y las proteínas virales que desencadenan el ERE, pueden estar regulando los niveles de distintas proteínas, lo cual podría ser útil para predecir el resultado de la infección por virus y revelar mecanismo patogénicos subyacentes. Ya que por ejemplo se ha reportado que durante las infecciones virales algunos virus secuestran el aparato de traducción del huésped para producir una gran cantidad de proteínas virales acumuladas en la luz del RE. Algunos utilizan el RE como sitio de replicación, como el VHC¹⁶².

Los virus de DNA que son capaces de desencadenar ERE (ASFV, EBV, HCMV, VPH) tienden a proteger a las células infectadas de la apoptosis. Varios tipos de células adaptan la capacidad del RE para diferentes propósitos y en consecuencia pueden responder de manera diferente a los estímulos exógenos:^{163,164}. Esto explicaría porque vemos los niveles de CHOP disminuidos en nuestro modelo de silenciamiento (*figura 24*) y por ello sugerimos que el ERE y los niveles de CHOP, HERP y CREB3 son diferentes según el evento en el que se encuentre la infección, integración del virus o en el contexto de cáncer (*figura 26*). Es interesante fijar nuestra atención en estos eventos porque la progresión desde la infección hasta la historia natural del cáncer podría permitir el monitoreo de esta enfermedad que es inducida por VPH-AR.

La sobreexpresión de CREB3 sensibiliza a las células para llevar a cabo la apoptosis¹⁶⁵. Los resultados obtenidos en el modelo de silenciamiento de las células CaSki, indican que existe una inactivación de CREB3, además de que los niveles de CHOP se ven incrementados cuando se abate la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, por lo que podemos inferir que en esa condiciónno aumentan los genes proapoptóticos como CHOP, puesto que al ser una línea celular derivada de cáncer, los mecanismos de la UPR promueven la adaptación en este contexto carcinogénico prolongado.

Retomando nuestro modelo de silenciamiento de E6/E7 donde observamos niveles de HERP disminuidos (*figura 24*) sugerimos que el agotamiento de HERP, podría estar inhibiendo la muerte celular, al estar regulando la autofagia¹⁶⁶. Para hacer una conclusión al respecto, sería

necesario explorar más a fondo. A detalle esta sugerencia, empleando marcadores de autofagia. Con los datos obtenidos hasta este punto, podemos inferir que los niveles de CHOP se ven de igual manera disminuidos en este modelo de silenciamiento de E6/E7 ya que en esta línea celular que es derivada de cáncer, los niveles de muerte celular deberían ser mínimos¹⁶⁷.

Entre los principales eventos que una célula detecta para aumentar los niveles de autofagia se encuentran el mal plegamiento de proteínas. La activación de la autofagia es esencial para la supervivencia celular en condiciones contra diferentes formas de estrés celular, la vía autofágica degrada el RE y atenúa el efecto nocivo. A su vez se ha reportado que el agotamiento de HERP aumenta el flujo autofágico a través de la regulación positiva de Beclin-1. Por lo que observar niveles disminuidos de HERP en nuestros resultados, podría postular que existe mayor supervivencia celular, que esta siendo regulada por la autofagia, y este mecanismo de supervivencia mediado por CREB3, ya que recordemos que HERP es uno de sus genes blanco directo. Sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar estas suposiciones, donde podamos evaluar supervivencia celular, marcadores de muerte celular y marcadores de autofagia en ausencia de las oncoproteínas virales puesto que la autofagia es necesaria para la tumorigénesis, así como para la propagación de los focos metastásicos¹⁶⁶.

Respecto a la metástasis y CREB3

Se ha identificado a CREB3 como un regulador transcripcional de los genes de tráfico ER-Golgi promoviendo un fenotipo metastásico *in vitro*¹³⁰, esto es posible a través de la activación del factor de transcripción CREB3, regulando al alza la expresión de ARF4, COPB1 y USO1. La expresión de estos genes, regulados por CREB3 impulsan la progresión maligna y metástasis en un modelo de cáncer de mama. Por otra parte, el factor de transcripción CREB3 aumenta la transcripción de c-Jun al unirse directamente a la región CRE en el promotor de c-Jun, conduciendo a la transcripción de MMP-9 (Matrix metaloproteinada-9), por lo que se puede inferir que CREB3 juega un papel importante en la progresión del cáncer de cuello uterino a través de c-Jun/mmp9 y además está involucrado en el fenotipo maligno de cáncer de próstata ^{168,120}.

Otros mecanismos asociados a la activación de CREB3 han sido estudiados, por ejemplo Yizheng *et al*¹⁶⁹, identificaron que el RNA circular circTADA2A promueve la progresión y la metástasis de osteosarcoma (OS) al regular la expresión de CREB3. Estos resultados proponen a CREB3 como un objetivo directo de miR-203a y lo consideran un oncogén en osteosarcoma. Estos autores concluyen que al mejorar la actividad transcripcional de CREB3 se promueve la progresión metástasica en OS. Otros estudios han validado a CREB3 como factor de transcripción que promueve la metástasis. Esto al unirse a los objetivos posteriores, como el receptor de quimiocinas CC 1 (CCR1) y la histona desacetilasa 3 (HDAC3), lo que induce a la tumorigénesis. De acuerdo a estos hallazgos, Gang W y cols¹⁷⁰ confirman que CREB3 se une a la región promotora de ZFAS1, para activarlo e impulsar la metástasis del carcinoma de tiroides. Por todo esto, se ilustra el posible escenario donde CREB3 sea capaz de promover la metástasis (figura 30).

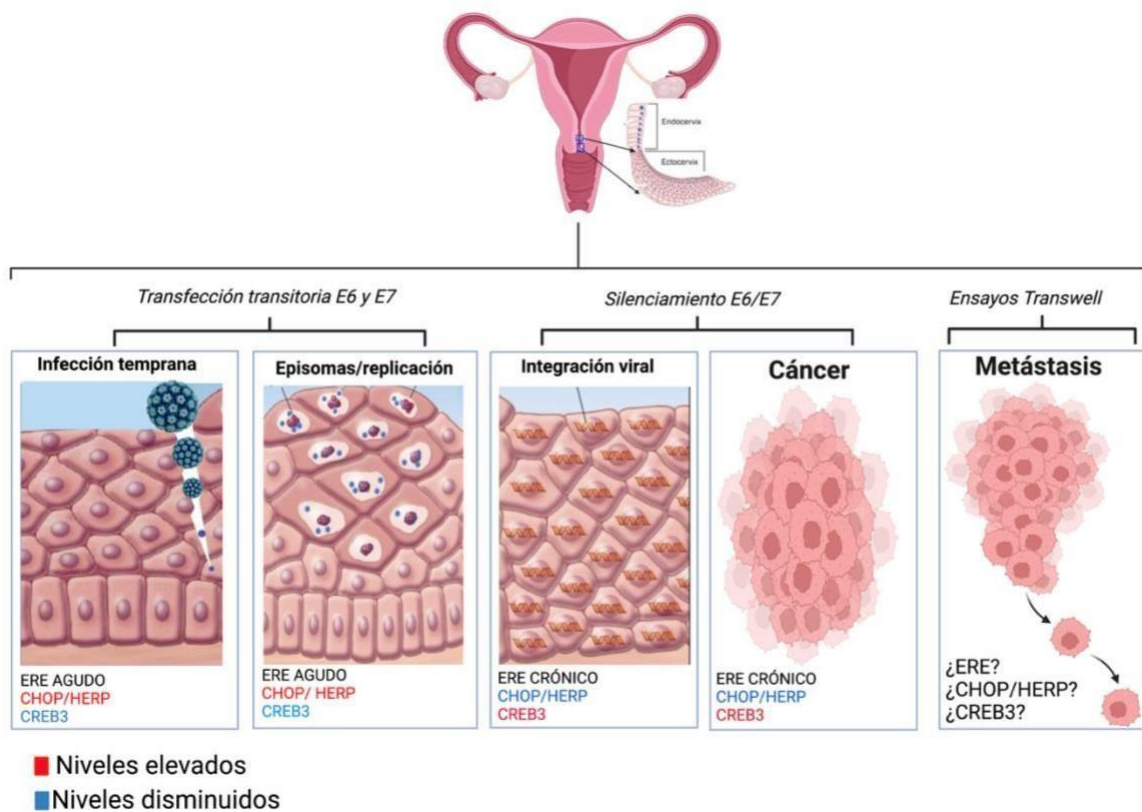


Figura 30. ¿Cuál sería el papel de E6/E7 en la regulación de CREB3 para la progresión metástasica?. Un futuro ensayo para responder esta pregunta sería mediante ensayos Transwell y poder evaluar el siguiente evento en la progresión carcinogénica que sería la metástasis. Imagen modificada de Goodman, A y Wilbur, DC en Biorender

Potenciales efectos de la interacción E6/CREB3.

La estrategia de transformación celular de los virus oncogénicos como VPH, está basada en la capacidad de las oncoproteínas virales para interactuar con diversas proteínas celulares, destacando los supresores de tumores como p53 y pRb¹⁷¹. Las proteínas pueden interactuar durante un periodo de tiempo para formar parte de un complejo proteínico; o pueden transportar a otra proteína (por ejemplo, desde el citoplasma al núcleo o viceversa en el caso de las importinas de los poros nucleares), pueden interactuar brevemente con otra proteína para modificarla. Las interacciones proteína-proteína son eventos críticos para muchos procesos celulares que se extienden desde la formación de estructuras macromoleculares y complejos enzimáticos, hasta la regulación y la transducción de señales. Comprender estas interacciones en detalle, proporciona información útil sobre el mecanismo molecular del funcionamiento de la célula. El análisis cristalográfico de un VPH16 E6 recombinante unido a un péptido que contiene el motivo LxxLL (ELTLQELLGEER) muestra que los dos bucles de dedo de zinc de E6 y la región conectora entre ellos forman un bolsillo profundo, en el que encaja el dominio alfa helicoidal LxxLL de E6AP.

En el modelo de silenciamiento que empleamos en nuestro estudio, utilizamos a p53 como control de la técnica, observamos que al realizar silenciamiento de E6/E7, los niveles de p53 se recuperan, y por ello confirmamos que la técnica fue exitosa. Curiosamente, los niveles de CREB3 parecen estar ausentes y podemos sugerir que la vía no está activa en presencia de E6/E7 (*figura 21*). De manera interesante encontramos un incremento en los niveles y activación de CREB3 posterior al silenciamiento de E6/E7, al igual que los genes blanco de este factor. Si bien se esperaba el efecto contrario, diversos reportes han vinculado a p53 con la vía de CREB3. Un ejemplo de ello es Walia M y cols¹⁷² este grupo de investigación encontró que los niveles de AMPc y la señalización a través de CREB1 son característicos de los osteoblastos con deficiencia de p53. Reportaron que es esencial la pérdida de p53 para el inicio y establecimiento de osteosarcoma mediado por: PTHrP→cAMP→CREB1¹⁷² también demostraron que esta vía era necesaria para la supervivencia de los osteoblastos que se volvieron deficientes en p53. Recordemos que la

estrategia de transformación celular de los virus como VPH, está basada en oncoproteínas virales que interactúan con el producto de dos genes supresores de tumores como p53 y pRb.

Es evidente que los niveles de p53 se encuentran regulados por las oncoproteínas E6/E7 del VPH16 en nuestros modelos. No lo sabemos, pero podría ser que al disminuir p53 en la línea celular CaSki, CREB3 no este activo, y posiblemente se este generando un complejo trimérico similar al complejo trimérico que se forma entre E6, E6AP (LxxLL) al inicio de la infección y establecimiento del cáncer, sin embargo, una vez que el carcinoma está establecido, CREB3 ya no esta activo y sus niveles son regulados según en el punto que se encuentre en el proceso de la historia natural del cáncer. Para poder determinar si hay una activación de la vía al inicio del establecimiento del cáncer, convendría realizar un mayor número de ensayos que nos permita identificar esta posible respuesta, por otro lado, también se puede explorar mediante construcciones de vectores que contengan los dominios funcionales y de interés de CREB3 como por ejemplo los motivos LxxLL, que nos permitan interpretar de mejor manera el posible papel que tiene CREB3 en la historia natural del cáncer.

A la fecha se sabe que E6 es capaz de interactuar con proteínas celulares, en nuestros resultados, observamos que esta oncoproteína del VPH interactúa con CREB3 *in vitro* mediante ensayos de PullDown ([figura 27](#)). De manera interesante y retomando el modelo de silenciamiento, vemos activación de CREB3 y disminución de p53 en presencia de E6/E7 (siLuc). Lo que ya se ha reportado es que E6 de los VPHAR disminuyen los niveles de p53, por lo que podríamos sugerir que la interacción vista en nuestros resultados entre CREB3 y E6 estaría contribuyendo a la disminución de p53 y de forma indirecta desfavoreciendo la señalización y activación de CREB3 ([figura 31](#)). Es importante hacer énfasis, que este escenario sería al inicio del establecimiento del cáncer, y una vez que el proceso carcinógeno ha comenzado puede que ya no sea necesario.

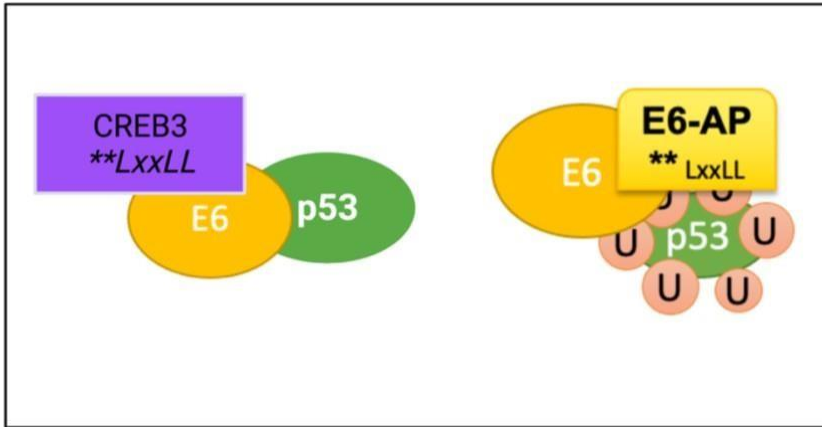


Figura 31. Modelo de la interacción entre el trímero E6, E6AP, p53 y CREB3, E6, p53. Al inicio del establecimiento del cáncer este complejo trimérico puede ocurrir. Una vez que el proceso carcinogénico ha comenzado puede que ya no sea necesario. Y los niveles y activación de CREB3 cambian según el punto específico de la historia natural del cáncer.

Seguir investigando estas interacciones podría permitirnos entender mejor el proceso carcinogénico promovido por VPH, ya que posiblemente representen un papel importante en la malignidad (figura 32).

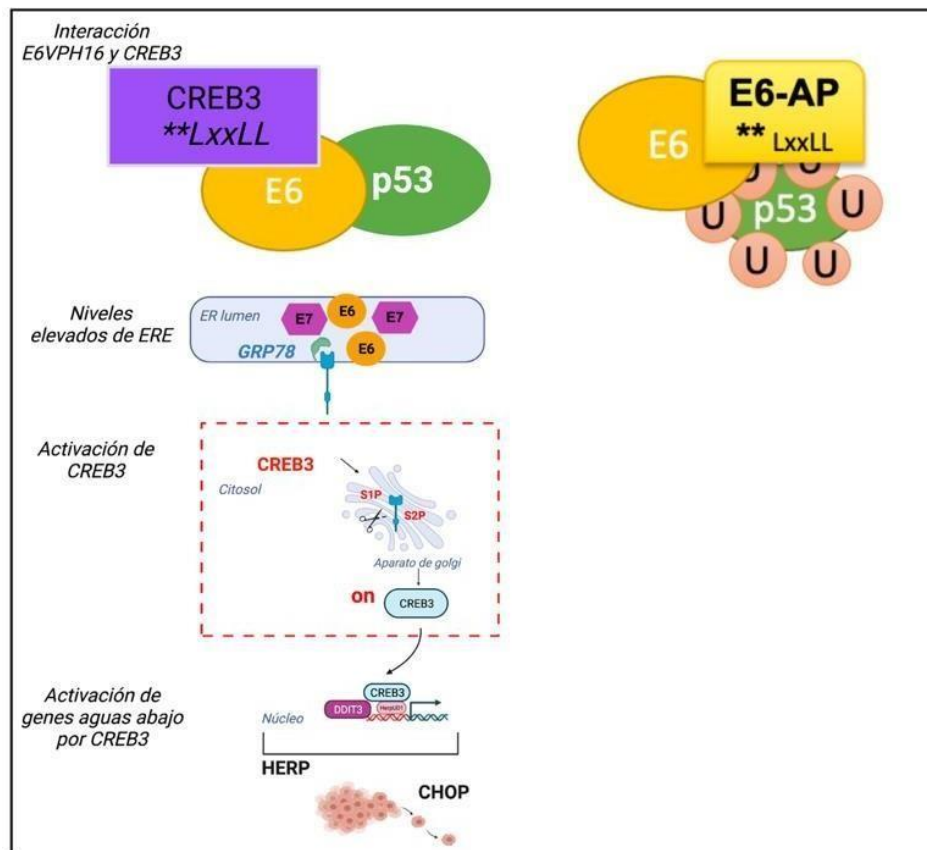


Figura 32. Modelo de la interacción entre el trímero E6, E6AP, p53 y CREB3, E6, p53.

Se describe el alcance de la vía CREB3, tomando como ejemplo los datos observados de Waila y cols (2016), donde reportan que la pérdida de p53 es esencial para la activación de CREB1, dicha activación proporciona la supervivencia y establecimiento del osteosarcoma.

No se han realizado estudios sistemáticos de interactoma para los sensores de estrés UPR, varios laboratorios han identificado socios de unión que modulan la actividad de componentes proximales específicos de UPR. Sería de gran importancia llevar a cabo más investigación sobre el estrés del retículo endoplásmico y su relación con los diferentes tipos de cáncer en específico aquellos que son promovidos por virus oncogénicos. Ya que por ejemplo se ha descrito de aquellas proteínas virales que inducen UPR y generan un gran impacto en las vías de señalización de la apoptosis, como lo son VHC (E1, E2, core). Estos avances son significativos en el desarrollo de antivirales o vacunas contra estas proteínas, a la fecha se ha estudiado clemizol para HCV, pero existen otros fármacos candidatos, y potenciales vectores de vacunas para HSV y VPH. Por otra parte, los estudios epidemiológicos y de biología molecular han establecido que el DNA de los VPH 16 y 18 están asociados con más del 90% de los casos de cáncer por este virus, sin embargo, si miramos en retrospectiva el escenario actual, no se ha desarrollado un fármaco que puede inhibir las oncoproteínas del VPH de AR.

Aún quedan datos por descubrir en el estudio de proteínas virales que desencadenan ERE, ya que podrían convertirse en un futuro en objetivos para terapia antiviral específica.

11. SUMARIO

- E6 y E7 del VPH16 aumentan los niveles del marcador de ERE: GRP78 en la línea celular HaCaT.
- Las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 activan al factor CREB3 en la línea celular HaCaT.
- Los niveles de HERP y CHOP aumentan en presencia de E6 y E7 en la línea celular HaCaT.
- Los niveles de HERP y CHOP disminuyen al silenciar de E6/E7 en un contexto carcinogénico en la línea celular CaSki.
- CREB3 interactúa con la oncoproteína E6 del VPH16.

Los resultados obtenidos bajo las condiciones de este proyecto podrían apuntar a una relación interesante entre CREB3 y la historia natural del cáncer promovida por VPH.

12. CONCLUSIONES

- Existe una modulación de la vía de CREB3 por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 que posiblemente esté asociada al mantenimiento del fenotipo maligno.
- E6 y E7 del VPH16 en la línea celular HaCaT aumentan los niveles del marcador de ERE: GRP78.
- Oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 en la línea celular HaCaT disminuyen los niveles de CREB3.
- E6 del VPH16 activa la vía CREB3 en la línea celular HaCaT.
- Los niveles de HERP y CHOP aumentan en presencia de E6 y E7 en la línea celular HaCaT.
- Los niveles de HERP y CHOP disminuyen en la línea celular CaSki.
- CREB3 se activa por siE6/E7 en la línea celular CaSki.
- CREB3 interactúa con la oncoproteína E6 del VPH16.

13. FUTURAS DIRECCIONES

1. Determinar el mecanismo por el cuál E6 y E7 regulan los niveles de CREB3.
2. Caracterizar el comportamiento de CREB3 a lo largo de las diferentes etapas de la carcinogénesis.
3. Evaluar el posible papel de CREB3 de promover metástasis a través de la regulación por E6/E7.
4. Evaluar genes blanco de CREB3 relacionados con procesos de supervivencia y metástasis.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Reynoso-Noverón, N., & Torres-Domínguez, J. A. (2017). Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual/Latin American Journal of Behavioral Medicine*, 8(1), 9-15.
2. Marzo-Castillejo, M., Vela-Vallespín, C., Bellas-Beceiro, B., Bartolomé-Moreno, C., Melús-Palazón, E., Vilarrubí-Estrella, M., & Nuin-Villanueva, M. (2018). Recomendaciones de prevención del cáncer. Actualización PAPPS 2018. *Atención primaria*, 50(Suppl 1), 41.
3. Ni, J., & Zhang, L. (2020). Cancer cachexia: definition, staging, and emerging treatments. *Cancer management and research*, 12, 5597.
4. Organización Mundial de la Salud, Weltgesundheitsorganisation, World Health Organization, & European Centre for Environment. (2021). *WHO global air quality guidelines: particulate matter (PM2.5 and PM10), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide*. World Health Organization.
5. Ostry, V., Malir, F., Toman, J., & Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin research*, 33(1), 65-73.
6. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46.
7. Pearce, N., Blair, A., Vineis, P., Ahrens, W., Andersen, A., Anto, J. M., ... & Zahm, S. H. (2015). IARC monographs: 40 years of evaluating carcinogenic hazards to humans. *Environmental health perspectives*, 123(6), 507-514.
8. Vincent, T. L., & Gatenby, R. A. (2008). An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *International journal of oncology*, 32(4), 729-737.
9. Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, 4(9), e609-e616.
10. Béziat, V., & Jouanguy, E. (2021). Human inborn errors of immunity to oncogenic viruses. *Current Opinion in Immunology*, 72, 277-285.
11. Warowicka, A., Nawrot, R., Broniarczyk, J., Węglewska, M., & Goździcka-Józefiak, A. (2020). Oncogenic viruses and cancer. *Postepy Biochemii*, 66(4), 336-355.
12. Chang, Y., Moore, P. S., & Weiss, R. A. (2017). Human oncogenic viruses: nature and discovery. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1732), 20160264.
13. Schiller, J. T., & Lowy, D. R. (2021). An introduction to virus infections and human cancer. In *Viruses and Human Cancer* (pp. 1-11). Springer, Cham.
14. Van Doorslaer, K. (2013). Evolution of the papillomaviridae. *Virology*, 445(1-2), 11-20.
15. Bravo, I. G., de Sanjosé, S., & Gottschling, M. (2010). The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends in microbiology*, 18(10), 432-438.
16. Lizano-Soberón, M., Carrillo-García, A., & Contreras-Paredes, A. (2009). Infección por virus del papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Cancerología*, 4, 205-16.
17. PaVE: The papillomavirus episteme, 2021.
18. Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F55-F70.
19. Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B., & Gissmann, L. (2006). HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24, S1-S10.
20. Ochoa-Carrillo, F. J. (2014). Virus del papiloma humano. Desde su descubrimiento hasta el desarrollo de una vacuna. Parte I/III. *GAMO*, 13(5), 308-15.

21. Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2015). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(S2), 166-171.
22. Graham, S. V. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical science*, 131(17), 2201-2221.
23. Psyrris, A., & DiMaio, D. (2008). Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nature clinical practice oncology*, 5(1), 24-31.
24. Zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews cancer*, 2(5), 342-350.
25. Manzo-Merino, J., Thomas, M., Fuentes-Gonzalez, A. M., Lizano, M., & Banks, L. (2013). HPV E6 oncoprotein as a potential therapeutic target in HPV related cancers. *Expert opinion on therapeutic targets*, 17(11), 1357-1368.
26. Bruni, L., Saura-Lázaro, A., Montoliu, A., Brotons, M., Alemany, L., Diallo, M. S., ... & Bloem, P. (2021). HPV vaccination introduction worldwide and WHO and UNICEF estimates of national HPV immunization coverage 2010–2019. *Preventive medicine*, 144, 106399.
27. Rossmann, M. G. (2013). Structure of viruses: a short history. *Quarterly reviews of biophysics*, 46(2), 133-180.
28. Gheit, T. (2019). Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. *Frontiers in Oncology*, 9, 355.
29. Tan, G., Duan, M., Zhang, N., Zhang, W., Li, B., & Qu, P. (2019). Distribution of HPV 16 E6 gene variants in screening women and its associations with cervical lesions progression. *Virus research*, 273, 197740.
30. Della Fera, A. N., Warburton, A., Coursey, T. L., Khurana, S., & McBride, A. A. (2021). Persistent human papillomavirus infection. *Viruses*, 13(2), 321.
31. Burley, M., Roberts, S., & Parish, J. L. (2020, April). Epigenetic regulation of human papillomavirus transcription in the productive virus life cycle. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 42, No. 2, pp. 159-171). Springer Berlin Heidelberg.
32. Moody, C. A. (2017). Mechanisms by which HPV induces a replication competent environment in differentiating keratinocytes. *Viruses*, 9(9), 261.
33. Johansson, C., & Schwartz, S. (2013). Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nature reviews Microbiology*, 11(4), 239-251.
34. De Witte, L., Zoughlami, Y., Aengeneyndt, B., David, G., Van Kooyk, Y., Gissmann, L., & Geijtenbeek, T. B. (2008). Binding of human papilloma virus L1 virus-like particles to dendritic cells is mediated through heparan sulfates and induces immune activation. *Immunobiology*, 212(9-10), 679-691.
35. Knappe, M., Bodevin, S., Selinka, H. C., Spillmann, D., Streeck, R. E., Chen, X. S., ... & Sapp, M. (2007). Surface-exposed amino acid residues of HPV16 L1 protein mediating interaction with cell surface heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 27913-27922.
36. Fothergill, T., & McMillan, N. A. (2006). Papillomavirus virus-like particles activate the PI3-kinase pathway via alpha-6 beta-4 integrin upon binding. *Virology*, 352(2), 319-328.
37. Stanley, M. A. (2012). Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clinical microbiology reviews*, 25(2), 215-222.
38. Bergant, M., & Banks, L. (2013). SNX17 facilitates infection with diverse papillomavirus types. *Journal of virology*, 87(2), 1270-1273.
39. Wang, J. W., & Roden, R. B. (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445(1-2), 175-186.
40. Ganti, K., Massimi, P., Manzo-Merino, J., Tomaić, V., Pim, D., Playford, M. P., ... & Banks, L. (2016). Interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with sorting nexin 27 modulates endocytic cargo transport pathways. *PLoS pathogens*, 12(9), e1005854.

41. Siddiqi, A., Massimi, P., Pim, D., & Banks, L. (2019). Diverse papillomavirus types induce endosomal tubulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*, 175.
42. Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., De Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B. J., ... & Franceschi, S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature reviews Disease primers*, *2*(1), 1-20.
43. Howley, P. M. & lowy DR. (2006). Papillomavirus. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2238-67.
44. Egawa, N., & Doorbar, J. (2017). The low-risk papillomaviruses. *Virus research*, *231*, 119-127.
45. Doorbar, J. (2013). The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*, *445*(1-2), 80-98.
46. Venuti, A., Paolini, F., Nasir, L., Corteggio, A., Roperto, S., Campo, M. S., & Borzacchiello, G. (2011). Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Molecular cancer*, *10*(1), 1-18.
47. Disbrow, G. L., Hanover, J. A., & Schlegel, R. (2005). Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. *Journal of virology*, *79*(9), 5839-5846.
48. Crusius, K., Rodriguez, I., & Alonso, A. (2000). The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. *Virus genes*, *20*(1), 65-69.
49. Nakahara, T., Peh, W. L., Doorbar, J., Lee, D., & Lambert, P. F. (2005). Human papillomavirus type 16 E1A E4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *Journal of virology*, *79*(20), 13150-13165.
50. Ren, S., Gaykalova, D. A., Guo, T., Favorov, A. V., Fertig, E. J., Tamayo, P., ... & Califano, J. A. (2020). HPV E2, E4, E5 drive alternative carcinogenic pathways in HPV positive cancers. *Oncogene*, *39*(40), 6327-6339.
51. Martínez-Puente, D. H., Pérez-Trujillo, J. J., Gutiérrez-Puente, Y., Rodríguez-Rocha, H., García-García, A., Saucedo-Cárdenas, O., ... & Loera-Arias, M. J. (2019). Targeting HPV-16 antigens to the endoplasmic reticulum induces an endoplasmic reticulum stress response. *Cell Stress and Chaperones*, *24*(1), 149-158.
52. Martínez-Puente, D. H., Garza-Morales, R., Pérez-Trujillo, J. J., García-García, A., Villanueva-Olivo, A., Rodríguez-Rocha, H., ... & Loera-Arias, M. D. J. (2021). Targeting E7 antigen to the endoplasmic reticulum degradation pathway promotes a potent therapeutic antitumor effect. *Journal of Drug Targeting*, *29*(10), 1102-1110.
53. Yim, E. K., & Park, J. S. (2005). The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*, *37*(6), 319-324.
54. Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, *10*(8), 550-560.
55. Estêvão, D., Costa, N. R., da Costa, R. M. G., & Medeiros, R. (2019). Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, *1862*(2), 153-162.
56. Narisawa-Saito, M., & Kiyono, T. (2007). Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer science*, *98*(10), 1505-1511.
57. McLaughlin-Drubin, M. E., & Münger, K. (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, *384*(2), 335-344.
58. Campo, M. S., Graham, S. V., Cortese, M. S., Ashrafi, G. H., Araibi, E. H., Dornan, E. S., ... & Man, S. (2010). HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology*, *407*(1), 137-142.

59. Krawczyk, E., Suprynowicz, F. A., Liu, X., Dai, Y., Hartmann, D. P., Hanover, J., & Schlegel, R. (2008). Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *The American journal of pathology*, *173*(3), 682-688.
60. Suprynowicz, F. A., Campo, M. S., & Schlegel, R. (2006). Biological activities of papillomavirus E5 proteins. *Papillomavirus Research—from natural history to vaccines and beyond*, Caister Academic Press, Norfolk, 97-113.
61. Venuti, A., Paolini, F., Nasir, L., Corteggio, A., Roperto, S., Campo, M. S., & Borzacchiello, G. (2011). Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Molecular cancer*, *10*(1), 1-18.
62. Gutierrez-Xicotencatl, L., Pedroza-Saavedra, A., Chihu-Amparan, L., Salazar-Piña, A., Maldonado-Gama, M., & Esquivel-Guadarrama, F. (2021). Cellular Functions of HPV16 E5 Oncoprotein during Oncogenic Transformation Cell Biology of 16E5 Oncoprotein. *Molecular Cancer Research*, *19*(2), 167-179.
63. Duensing, S., & Münger, K. (2001). Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, *1471*(2), M81-M88.
64. Duensing, S., & Münger, K. (2002). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer research*, *62*(23), 7075-7082.
65. Hebner, C. M., & Laimins, L. A. (2006). Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in medical virology*, *16*(2), 83-97.
66. Fehrmann, F., & Laimins, L. A. (2003). Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*, *22*(33), 5201-5207.
67. Massimi, P., Gammoh, N., Thomas, M., & Banks, L. (2004). HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*, *23*(49), 8033-8039.
68. Kranjec, C., Tomaić, V., Massimi, P., Nicolaidis, L., Doorbar, J., & Banks, L. (2016). The high-risk HPV E6 target scribble (hScrib) is required for HPV E6 expression in cervical tumour-derived cell lines. *Papillomavirus Research*, *2*, 70-77.
69. Chitsike, L., & Duerksen-Hughes, P. J. (2021). PPI modulators of E6 as potential targeted therapeutics for cervical cancer: progress and challenges in targeting E6. *Molecules*, *26*(10), 3004.
70. Martinez-Zapien, D., Ruiz, F. X., Poirson, J., Mitschler, A., Ramirez, J., Forster, A., ... & Zanier, K. (2016). Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature*, *529*(7587), 541-545.
71. Zanier, K., Charbonnier, S., Sidi, A. O. M. H. O., McEwen, A. G., Ferrario, M. G., Poussin-Courmontagne, P., ... & Travé, G. (2013). Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins. *Science*, *339*(6120), 694-698.
72. Ricci-López, J., Vidal-Limon, A., Zunñiga, M., Jiménez, V. A., Alderete, J. B., Brizuela, C. A., & Aguila, S. (2019). Molecular modeling simulation studies reveal new potential inhibitors against HPV E6 protein. *PLoS one*, *14*(3), e0213028.
73. Wallace, N. A., & Galloway, D. A. (2015). Novel functions of the human papillomavirus E6 oncoproteins. *Annu Rev Virol*, *2*(1), 403-423.
74. Penney, J., Taylor, T., MacLusky, N., & Lu, R. (2018). LUMAN/CREB3 plays a dual role in stress responses as a cofactor of the glucocorticoid receptor and a regulator of secretion. *Frontiers in molecular neuroscience*, *11*, 352.
75. Smith, B. S. (2022). *CREB3/LUMAN as a novel regulator of energy metabolism* (Doctoral dissertation, University of Guelph).
76. Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., ... & Huh, K. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of virology*, *78*(21), 11451-11460.

77. McLaughlin-Drubin, M. E., & Münger, K. (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, 384(2), 335-344.
78. Songock, W. K., Kim, S. M., & Bodily, J. M. (2017). The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription. *Virus research*, 231, 56-75.
79. Vallejo-Ruiz, V., Velázquez-Márquez, N., Sánchez-Alonso, P., Santos-López, G., & Reyes-Leyva, J. (2015). La oncoproteína E7 del virus de papiloma humano y su papel en la transformación celular. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 53(Supl 2), S172-7.
80. MuÈnger, K., Basile, J. R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S. L., Grace, M., & Zacny, V. L. (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*, 20(54), 7888-7898.
81. Sima, N., Wang, W., Kong, D., Deng, D., Xu, Q., Zhou, J., ... & Ma, D. (2008). RNA interference against HPV16 E7 oncogene leads to viral E6 and E7 suppression in cervical cancer cells and apoptosis via upregulation of Rb and p53. *Apoptosis*, 13(2), 273-281.
82. Berridge, M. J. (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell calcium*, 32(5-6), 235-249.
83. Westrate, L. M., Lee, J. E., Prinz, W. A., & Voeltz, G. K. (2015). Form follows function: the importance of endoplasmic reticulum shape. *Annu. Rev. Biochem*, 84(1), 791-811
84. Bhat, T. A., Chaudhary, A. K., Kumar, S., O'Malley, J., Inigo, J. R., Kumar, R., ... & Chandra, D. (2017). Endoplasmic reticulum-mediated unfolded protein response and mitochondrial apoptosis in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1867(1), 58-66.
85. Wang, M., & Kaufman, R. J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 14(9), 581-597.
86. Preissler, S., Rato, C., Chen, R., Antrobus, R., Ding, S., Fearnley, I. M., & Ron, D. (2015). AMPylation matches BiP activity to client protein load in the endoplasmic reticulum. *Elife*, 4, e12621.
87. Taniguchi, M., & Yoshida, H. (2017). TFE3, HSP47, and CREB3 pathways of the mammalian Golgi stress response. *Cell structure and function*, 16023.
88. Liu, J. X., Srivastava, R., Che, P., & Howell, S. H. (2007). An endoplasmic reticulum stress response in Arabidopsis is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. *The Plant Cell*, 19(12), 4111-4119.
89. Gao, G., Li, J., Li, H., Li, F., Xu, K., Yan, G., ... & Wu, X. (2014). Comparison of the heat stress induced variations in DNA methylation between heat-tolerant and heat-sensitive rapeseed seedlings. *Breeding science*, 64(2), 125-133.
90. Jia, X. Y., Xu, C. Y., Jing, R. L., Li, R. Z., Mao, X. G., Wang, J. P., & Chang, X. P. (2008). Molecular cloning and characterization of wheat calreticulin (CRT) gene involved in drought-stressed responses. *Journal of experimental botany*, 59(4), 739-751.
91. Wang, M., & Kaufman, R. J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 14(9), 581-597.
92. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology*, 2(6), 326-332.
93. Lee, A. S., & Hendershot, L. M. (2006). ER stress and cancer. *Cancer biology & therapy*, 5(7), 721-722.
94. Hampton, R. Y. (2000). ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. *Current Biology*, 10(14), R518-R521.

95. Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(7), 519-529.
96. Wang, G., Yang, Z. Q., & Zhang, K. (2010). Endoplasmic reticulum stress response in cancer: molecular mechanism and therapeutic potential. *American journal of translational research*, 2(1), 65.
97. Kosaka, N., Yoshioka, Y., Fujita, Y., & Ochiya, T. (2016). Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *The Journal of clinical investigation*, 126(4), 1163-1172.
98. Hart, L. S., Cunningham, J. T., Datta, T., Dey, S., Tameire, F., Lehman, S. L., ... & Koumenis, C. (2012). ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *The Journal of clinical investigation*, 122(12), 4621-4634.
99. Shoulders, M. D., Ryno, L. M., Genereux, J. C., Moresco, J. J., Tu, P. G., Wu, C., ... & Wiseman, R. L. (2013). Stress-independent activation of XBP1s and/or ATF6 reveals three functionally diverse ER proteostasis environments. *Cell reports*, 3(4), 1279-1292.
100. Hazari, Y. M., Bashir, A., & Fazili, K. M. (2016). Emerging tale of UPR and cancer: an essentiality for malignancy. *Tumor Biology*, 37(11), 14381-14390.
101. Kaufman, R. J. (2002). Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *The Journal of clinical investigation*, 110(10), 1389-1398.
102. Marciniak, S. J., & Ron, D. (2006). Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiological reviews*, 86(4), 1133-1149.
103. Oakes, S. A., & Papa, F. R. (2015). The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annual review of pathology*, 10, 173.
104. Zhao, N. A., Cao, J., Xu, L., Tang, Q., Dobrolecki, L. E., Lv, X., ... & Chen, X. (2018). Pharmacological targeting of MYC-regulated IRE1/XBP1 pathway suppresses MYC-driven breast cancer. *The Journal of clinical investigation*, 128(4), 1283-1299.
105. Namba, T. (2015). Regulation of endoplasmic reticulum functions. *Aging (Albany NY)*, 7(11), 901.
106. Rutkowski, D. T., & Kaufman, R. J. (2007). That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends in biochemical sciences*, 32(10), 469-476.
107. Babour, A., Bicknell, A. A., Tourtellotte, J., & Niwa, M. (2010). A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance. *Cell*, 142(2), 256-269.
108. Avivar-Valderas, A., Salas, E., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J. A., Nagi, C., Debnath, J., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2011). PERK integrates autophagy and oxidative stress responses to promote survival during extracellular matrix detachment. *Molecular and cellular biology*, 31(17), 3616-3629.
109. Dey, S., Sayers, C. M., Verginadis, I. I., Lehman, S. L., Cheng, Y., Cerniglia, G. J., ... & Koumenis, C. (2015). ATF4-dependent induction of heme oxygenase 1 prevents anoikis and promotes metastasis. *The Journal of clinical investigation*, 125(7), 2592-2608.
110. Saha, S., Bhanja, P., Partanen, A., Zhang, W., Liu, L., Tomé, W., & Guha, C. (2014). Low intensity focused ultrasound (LOFU) modulates unfolded protein response and sensitizes prostate cancer to 17AAG. *Oncoscience*, 1(6), 434.
111. Hu, R., Zhang, X., Hilakivi-Clarke, L., Kasid, U., & Clarke, R. (2017). TMEM33 induces apoptosis via UPR signaling and autophagy in breast cancer cells. *Cancer Research*, 77(13_Supplement), 2329-2329.

112. Papaioannou, A., & Chevet, E. (2017). Driving cancer tumorigenesis and metastasis through UPR signaling. *Coordinating Organismal Physiology Through the Unfolded Protein Response*, 159-192.
113. Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(2), 89-102.
114. Ibrahim, I. M., Abdelmalek, D. H., & Elfiky, A. A. (2019). GRP78: A cell's response to stress. *Life sciences*, 226, 156-163.
115. Pfaffenbach, K. T., & Lee, A. S. (2011). The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Current opinion in cell biology*, 23(2), 150-156.
116. Sampieri, L., Di Giusto, P., & Alvarez, C. (2019). CREB3 transcription factors: ER-Golgi stress transducers as hubs for cellular homeostasis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 123.
117. Jin, D. Y., Wang, H. L., Zhou, Y., Chun, A. C., Kibler, K. V., Hou, Y. D., ... & Jeang, K. T. (2000). Hepatitis C virus core protein-induced loss of LZIP function correlates with cellular transformation. *The EMBO journal*, 19(4), 729-740.
118. Luciano, R. L., & Wilson, A. C. (2000). N-terminal transcriptional activation domain of LZIP comprises two LxxLL motifs and the host cell factor-1 binding motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 10757-10762.
119. Lu, R., & Misra, V. (2000). Zhangfei: a second cellular protein interacts with herpes simplex virus accessory factor HCF in a manner similar to Luman and VP16. *Nucleic acids research*, 28(12), 2446-2454.
120. Khan, H. A., & Margulies, C. E. (2019). The role of mammalian Creb3-like transcription factors in response to nutrients. *Frontiers in Genetics*, 10, 591.
121. Liang, G., Audas, T. E., Li, Y., Cockram, G. P., Dean, J. D., Martyn, A. C., ... & Lu, R. (2006). Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum (ER) stress response protein Herp through an ER stress response element. *Molecular and cellular biology*, 26(21), 7999-8010.
122. Larson, S., Zhou, R., Li, K., Zhang, Y., Jafarikia, M., Bergeron, R., & Lu, R. (2021). Genetic diversity in the stress regulatory gene LUMAN/CREB3 of Yorkshire and Meishan pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 101(4), 798-804.
123. Denard, B., Lee, C., & Ye, J. (2012). Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1. *elife*, 1, e00090.
124. Schmitt, B. M., Ampofo, E., Stumpf, H., Montenarh, M., & Götz, C. (2020). The stability of CREB3/Luman is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 523(3), 639-644.
125. Wang, L., Lu, M., Zhang, R., Guo, W., Lin, P., Yang, D., ... & Jin, Y. (2019). Inhibition of Luman/CREB3 expression leads to the upregulation of testosterone synthesis in mouse Leydig cells. *Journal of Cellular Physiology*, 234(9), 15257-15269.
126. Aicha, S. B., Lessard, J., Pelletier, M., Fournier, A., Calvo, E., & Labrie, C. (2007). Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AlbZIP/CREB3L4 in prostate cells. *Physiological genomics*, 31(2), 295-305.
127. Murakami, T., Saito, A., Hino, S. I., Kondo, S., Kanemoto, S., Chihara, K., ... & Imaizumi, K. (2009). Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nature cell biology*, 11(10), 1205-1211.

128. Saito, A., Hino, S. I., Murakami, T., Kanemoto, S., Kondo, S., Saitoh, M., ... & Imaizumi, K. (2009). Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. *Nature cell biology*, *11*(10), 1197-1204.
129. Vellanki, R. N., Zhang, L., Guney, M. A., Rocheleau, J. V., Gannon, M., & Volchuk, A. (2010). OASIS/CREB3L1 induces expression of genes involved in extracellular matrix production but not classical endoplasmic reticulum stress response genes in pancreatic β -cells. *Endocrinology*, *151*(9), 4146-4157.
130. Howley, B. V., Link, L. A., Grelet, S., El-Sabban, M., & Howe, P. H. (2018). A CREB3-regulated ER–Golgi trafficking signature promotes metastatic progression in breast cancer. *Oncogene*, *37*(10), 1308-1325.
131. Kang, H., Kim, Y. S., & Ko, J. (2009). A novel isoform of human LZIP negatively regulates the transactivation of the glucocorticoid receptor. *Molecular endocrinology*, *23*(11), 1746-1757.
132. Sung, H. J., Kim, Y. S., Kang, H., & Ko, J. (2008). Human LZIP induces monocyte CC chemokine receptor 2 expression leading to enhancement of monocyte chemoattractant protein 1/CCL2-induced cell migration. *Experimental & molecular medicine*, *40*(3), 332-338.
133. Ko, J., Jang, S. W., Kim, Y. S., Kim, I. S., Sung, H. J., Kim, H. H., ... & Na, D. S. (2004). Human LZIP binds to CCR1 and differentially affects the chemotactic activities of CCR1-dependent chemokines. *The FASEB journal*, *18*(7), 890-892.
134. Kim, H. C., Choi, K. C., Choi, H. K., Kang, H. B., Kim, M. J., Lee, Y. H., ... & Yoon, H. G. (2010). HDAC3 selectively represses CREB3-mediated transcription and migration of metastatic breast cancer cells. *Cellular and molecular life sciences*, *67*(20), 3499-3510.
135. Guelman, S., Sukanuma, T., Florens, L., Swanson, S. K., Kiesecker, C. L., Kusch, T., ... & Workman, J. L. (2006). Host cell factor and an uncharacterized SANT domain protein are stable components of ATAC, a novel dAda2A/dGcn5-containing histone acetyltransferase complex in *Drosophila*. *Molecular and cellular biology*, *26*(3), 871-882.
136. Capotosti, F., Guernier, S., Lammers, F., Waridel, P., Cai, Y., Jin, J., ... & Herr, W. (2011). O-GlcNAc transferase catalyzes site-specific proteolysis of HCF-1. *Cell*, *144*(3), 376-388.
137. Blot, G., Lopez-Vergès, S., Treand, C., Kubat, N. J., Delcroix-Genête, D., Emiliani, S., ... & Berlioz-Torrent, C. (2006). Luman, a new partner of HIV-1 TMgp41, interferes with Tat-mediated transcription of the HIV-1 LTR. *Journal of Molecular Biology*, *364*(5), 1034-1047.
138. Mirabelli, C., Pelletier, I., Téoulé, F., Vidalain, P. O., Brisac, C., Tangy, F., ... & Blondel, B. (2016). The CREB3-Herp signalling module limits the cytosolic calcium concentration increase and apoptosis induced by poliovirus. *Journal of General Virology*, *97*(9), 2194-2200.
139. Gachon, F., Gaudray, G., Thébault, S., Basbous, J., Koffi, J. A., Devaux, C., & Mesnard, J. M. (2001). The cAMP response element binding protein-2 (CREB-2) can interact with the C/EBP-homologous protein (CHOP). *FEBS letters*, *502*(1-2), 57-62.
140. Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., & Mori, K. (2000). ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Molecular and cellular biology*, *20*(18), 6755-6767.
141. Ubeda, M., & Habener, J. F. (2000). CHOP gene expression in response to endoplasmic-reticular stress requires NFY interaction with different domains of a conserved DNA-binding element. *Nucleic acids research*, *28*(24), 4987-4997.

142. Soto-Fuenzalida, G. A., Hernández-Hernández, J. A., López-Sánchez, R. D. C., Aguayo-Millán, C. D., Villela-Martínez, L. M., Espino-Rodríguez, M., ... & Ortiz-López, R. (2020). Tipificación de serotipos del virus del papiloma humano de alto riesgo. *Ginecología y obstetricia de México*, *88*(10), 659-666.
143. Park, E., Kang, H., Kim, J., & Ko, J. (2014). The role of sLZIP in transcriptional regulation of c-Jun and involvement in migration and invasion of cervical cancer cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *33*(1), 151-164.
144. Levrero, M. (2006). Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene*, *25*(27), 3834-3847.
145. Peña, J., & Harris, E. (2011). Dengue virus modulates the unfolded protein response in a time-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(16), 14226-14236.
146. Elgadi, M. M., Hayes, C. E., & Smiley, J. R. (1999). The herpes simplex virus vhs protein induces endoribonucleolytic cleavage of target RNAs in cell extracts. *Journal of virology*, *73*(9), 7153-7164.
147. Audas, T. E., Hardy-Smith, P. W., Penney, J., Taylor, T., & Lu, R. (2016). Characterization of nuclear foci-targeting of Luman/CREB3 recruitment factor (LRF/CREBRF) and its potential role in inhibition of herpes simplex virus-1 replication. *European journal of cell biology*, *95*(12), 611-622.
148. Li, S., Kong, L., & Yu, X. (2015). The expanding roles of endoplasmic reticulum stress in virus replication and pathogenesis. *Critical reviews in microbiology*, *41*(2), 150-164.
149. Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., ... & Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & development*, *12*(7), 982-995.
150. Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., & Hayashi, H. (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *The EMBO journal*, *24*(6), 1243-1255.
151. Yamaguchi, H., & Wang, H. G. (2004). CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(44), 45495-45502.
152. Galindo, I., Hernaez, B., Muñoz-Moreno, R., Cuesta-Geijo, M. A., Dalmau-Mena, I., & Alonso, C. (2012). The ATF6 branch of unfolded protein response and apoptosis are activated to promote African swine fever virus infection. *Cell death & disease*, *3*(7), e341-e341.
153. Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2008). Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, *135*(7), 1161-1163.
154. Bitko, V., Shulyayeva, O., Mazumder, B., Musiyenko, A., Ramaswamy, M., Look, D. C., & Barik, S. (2007). Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF- κ B-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *Journal of virology*, *81*(4), 1786-1795.
155. Carpenter, J. E., Jackson, W., Benetti, L., & Grose, C. (2011). Autophagosome formation during varicella-zoster virus infection following endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Journal of virology*, *85*(18), 9414-9424.
156. Moradpour, D., Penin, F., & Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nature reviews microbiology*, *5*(6), 453-463.

157. Yu, C. Y., Hsu, Y. W., Liao, C. L., & Lin, Y. L. (2006). Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *Journal of virology*, *80*(23), 11868-11880.
158. Pavio, N., Romano, P. R., Graczyk, T. M., Feinstone, S. M., & Taylor, D. R. (2003). Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by the hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2 α kinase PERK. *Journal of virology*, *77*(6), 3578-3585.
159. Zhang, L., & Wang, A. (2012). Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. *Frontiers in plant science*, *3*, 293.
160. Isler, J. A., Skalet, A. H., & Alwine, J. C. (2005). Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *Journal of virology*, *79*(11), 6890-6899.
161. Li, S., Kong, L., & Yu, X. (2015). The expanding roles of endoplasmic reticulum stress in virus replication and pathogenesis. *Critical reviews in microbiology*, *41*(2), 150-164.
162. Moradpour, D., Penin, F., & Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nature reviews microbiology*, *5*(6), 453-463.
163. Hassan, Z. K., Elobeid, M. A., Virk, P., Omer, S. A., ElAmin, M., Daghestani, M. H., & AlOlayan, E. M. (2012). Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012.
164. Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, *13*(2), 89-102.
165. Reiling, J. H., Olive, A. J., Sanyal, S., Carette, J. E., Brummelkamp, T. R., Ploegh, H. L., ... & Sabatini, D. M. (2013). A CREB3-ARF4 signalling pathway mediates the response to Golgi stress and susceptibility to pathogens. *Nature cell biology*, *15*(12), 1473-1485.
166. Tsuchihara, K., Fujii, S., & Esumi, H. (2009). Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. *Cancer letters*, *278*(2), 130-138.
167. Esteve, J. M., & Esteve-Esteve, M. (2020). Vías moleculares de regulación de la autofagia por BRCA1: Implicaciones en cáncer. *Revista Española de Patología*, *53*(4), 246-253.
168. Wu, Y., Xie, Z., Chen, J., Chen, J., Ni, W., Ma, Y., ... & Fan, S. (2019). Circular RNA circTADA2A promotes osteosarcoma progression and metastasis by sponging miR-203a-3p and regulating CREB3 expression. *Molecular cancer*, *18*(1), 1-20.
169. Kim, Y., Kim, J., Jang, S. W., & Ko, J. (2015). The role of sLZIP in cyclin D3-mediated negative regulation of androgen receptor transactivation and its involvement in prostate cancer. *Oncogene*, *34*(2), 226-236.
170. Wang, G., Le, Y., Wei, L., & Cheng, L. (2021). CREB3 transactivates lncRNA ZFAS1 to promote papillary thyroid carcinoma metastasis by modulating miR-373-3p/MMP3 regulatory axis. *International Journal of Endocrinology*, 2021.
171. Buitrago-Pérez, Á., Garaulet, G., Vázquez-Carballo, A., Paramio, J. M., & García-Escudero, R. (2009). Molecular signature of HPV-induced carcinogenesis: pRb, p53 and gene expression profiling. *Current genomics*, *10*(1), 26-34.
172. Walia, M. K., Ho, P. M., Taylor, S., Ng, A. J., Gupte, A., Chalk, A. M., ... & Walkley, C. R. (2016). Activation of PTHrP-cAMP-CREB1 signaling following p53 loss is essential for osteosarcoma initiation and maintenance. *elife*, *5*, e13446.

15. ANEXOS.

Anexo 1: Bibliografía (tablas).

1. Graham, S. V. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical science*, 131(17), 2201-2221.
2. Núñez-Troconis, J. (2022). Epidemiología del virus del papiloma humano. *Investigación Clínica*, 63(2), 170-187.
3. Doorbar, J., Jenkins, D., Stoler, M. H., & Bergeron, C. (2020). Biology of the Human Papillomavirus Life Cycle: The Basis for Understanding the Pathology of Precancer and Cancer. In *Human Papillomavirus* (pp. 67-83). Academic Press.
4. Egawa, N., & Doorbar, J. (2017). The low-risk papillomaviruses. *Virus research*, 231, 119-127.

Anexo 2: Soluciones y medios de cultivo.

Medio LB

Bacto-Triptona 10g
Extracto de levadura 5g
NaCl 10g
H₂O aforar a 1L1.2

1.2 Agar LB con Ampicilina

Bacto-Triptona 10g
Extracto de levadura 5g
NaCl 10g
Agar bacteriológico 1.5% p/v
Ampicilina 100 µg/mLH₂O destilada aforar a 1L

1.3 TBS-T 1x

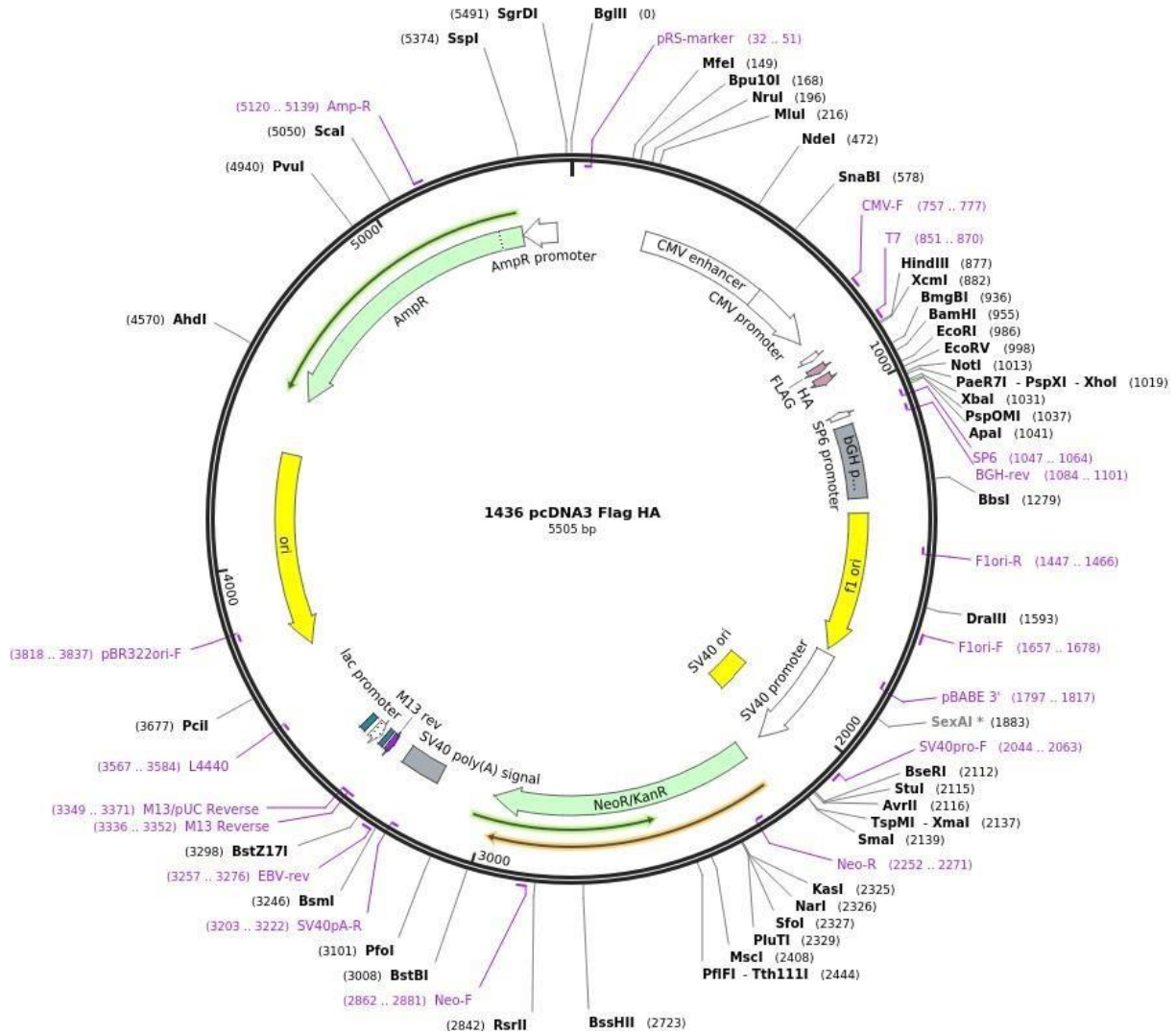
Tris base 2.42 g
NaCl 8.0 g
Tween-20 1.0 %

1.4 Eagle de Dulbecco modificado (DMEM) enriquecido con suero bovino fetal

DMEM-F12(Gibco) 1 sobre
NaHCO₃ 1.2 g/L
Suero bovino fetal (Gibco) 10% v/v

Anexo 3: Mapa del vector de expresión de E6 del VPH16 y E7 del VPH16.

Created with SnapGene®



Anexos 4: Resultados presentados en congresos:

Congreso Nacional de Virología.



UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FCB
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Otorga el presente reconocimiento a

Quintero-Esquivel Silvia, Lizano Marcela, Manzo-Merino Joaquín

Por su Ponencia:

CREB3 levels and expression are modulated by HPV16 E6 oncoprotein
en el XII Congreso Nacional de Virología llevado a cabo del 29
de septiembre al 2° de octubre del 2021.

29 de septiembre al 2 de octubre 2021

Dr. José Ignacio González Rojas
Director FCB-UANL

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Responsable LIV

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Organizador CNV 2021

Dr. Ramón A. González
Presidente Sociedad Mexicana de Virología

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