

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
CENTRO DE INVESTIGACIONES SOBRE
ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

Programa de:

**Maestría en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en
Enfermedades Infecciosas**

Tesis:

**“Interacción entre la oncoproteína E5 de HPV16 y Ras en el
proceso de transformación celular”**

Alumna:

Q.F.B. Prisma Paredes García

Comité de Tesis:

Director de Tesis:	Dra. Ma. de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl	CISEI-INSP
Asesores:	Dr. Gustavo Pedraza Alva	IBT-UNAM
	Dr. Adolfo Pedroza Saavedra	CISEI-INSP

Comité de examen:

Presidente:	Dra. Leonor Pérez Martínez	IBT-UNAM
Secretaría:	Dra. Ma. de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl	CISEI-INSP
1er Sinodal:	Dr. Ramón González García Conde	Fac.Ciencias-UAEM
2o Sinodal:	Dra. Isabel Soto Cruz	FES Zaragoza-UNAM
3er Sinodal:	Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales	CISEI-INSP

CUERNAVACA, MORELOS. 2011

Si no te esfuerzas hasta el máximo, entonces ¿cómo sabrás donde está tu límite?

A mis padres Mirella y Jorge, porque jamás podré agradecerles como se merecen su apoyo y lealtad, y porque este (al igual que todos los demás) es también logro de ustedes,

A mi hermana Paloma, porque durante todos estos años has sido más que mi amiga, mi aliada y cómplice,

A Mariana y Leo, por que su presencia ha venido a revolucionar y refrescar mi percepción del mundo,

A mi familia, por que sus palabras de aliento han sido de utilidad en cada momento,

A mis colegas Rafael, Luz, Miguel, Lillian y Perla, por permitirme compartir con ustedes una de las mejores etapas de mi vida,

A mis compañeros del L5PB Anita, Minerva, Tanya, Mariana, Bertha, Ariadna, Emanuel, Israel y Lilia, gracias por aligerar el trabajo con sus consejos y risas,

A la Dra. Lourdes Gutiérrez y al Dr. Adolfo Pedroza, por su invaluable guía a través de este apasionante viaje,

A todos los que de alguna manera me ayudaron a cumplir uno de los sueños más grandes de mi vida, es decir, culminar esta maestría:

INFINITAS GRACIAS!!!

PRISMA

INDICE

	Página
1. Resumen	5
2. Introducción	7
2.1 Epidemiología del cáncer cervical	7
2.2 Patología del cáncer cervical	10
2.3 Biología y ciclo de vida del HPV	12
2.3.1 Establecimiento de la infección	15
2.3.2 Mantenimiento del genoma	15
2.3.3 Fase proliferativa	16
2.3.4 Amplificación del genoma	16
2.3.5 Síntesis de viriones	17
2.3.6 Transformación celular asociada a HPV	18
2.4 Oncoproteínas del HPV	18
2.4.1 Proteína E6	19
2.4.2 Proteína E7	20
2.4.3 Proteína E5	22
2.5 Oncoproteína Ras	26
3. Justificación	30
4. Hipótesis	31
5. Objetivos	32
6. Metodología	
6.1 Generación de líneas celulares	33
6.2 Transfección estable de la línea celular MEF-FvB con lipofectamina .	34
6.3 Extracción de RNA de cultivos celulares	34
6.4 Evaluación de genes transfectados por RT-PCR	35
6.5 Preparación de proteína A-Sefarosa cargada con inmunoglobulinas de rata	35
6.6 Inmunoprecipitación de la proteína Ras	36

6.7 Inmunodetección de proteínas celulares implicadas en ciclo celular .	37
6.8 Cultivo en agar suave	38
6.9 Curvas de crecimiento	38
7. Resultados	
7.1 Obtención de fibroblastos de ratón cepa FvB	40
7.2 Generación de líneas celulares que expresan las oncoproteínas E5 ó E7 de HPV16 y Ras	40
7.3 Comprobación de la expresión de genes transfectados	41
7.4 Curvas de crecimiento y tiempo de duplicación	44
7.5 Grado de transformación y crecimiento en agar suave	47
7.6 Regulación de proteínas del ciclo celular por las oncoproteínas de HPV16 y Ras.....	48
7.7 Regulación de ciclinas por E5 de HPV16 y Ras	51
7.8 Regulación de inhibidores de ciclinas por E5 de HPV16 y Ras	53
8. Discusión	55
8.1 Grado de transformación de las líneas celulares que expresan los oncogenes <i>ras</i> ^{G12V} y E5 de HPV16	55
8.2 Análisis de proteínas que regulan el ciclo celular	58
9. Conclusiones	62
10. Perspectivas	63
11. Bibliografía	64

1. RESUMEN

El virus de papiloma humano (HPV por sus siglas en inglés) es un virus que coloniza células del cuello uterino, en donde los virus de alto riesgo están asociados con 99.7% de todos los casos de cáncer cervical (CC). E5, una de las proteínas de este virus, evita la degradación y propicia el reciclaje del receptor para el factor de crecimiento epidermal (EGFR, por sus siglas en inglés), lo que provoca un aumento tanto en el número como en los niveles de fosforilación de dicho receptor, produciendo una señal mitogénica más intensa. Diferentes estudios sugieren que E5 contribuye a la proliferación neoplásica durante los estadios tempranos de la infección sin ser indispensable para mantener la malignidad.

Dado que E5 actúa en la misma vía de señalización que la oncoproteína Ras, probablemente ambas actúan sinérgicamente para producir transformación celular. El objetivo de este trabajo es determinar si la expresión de estos dos genes cooperan durante el proceso que produce transformación celular.

Se crearon diversas líneas celulares a partir de fibroblastos obtenidos de embriones de ratón de la cepa FVB de 11 días de gestación, que fueron transfectados con los genes que codifican para las proteínas E5 de HPV16 y Ras viral (Ras^{G12V}) juntos y por separado.

El efecto transformante de estos genes fue determinado en presencia y ausencia de factor de crecimiento epidermal (EGF, por sus siglas en inglés) mediante curvas de proliferación con las que se calcularon los tiempos de duplicación y densidad celular, así como ensayos de crecimiento en agar suave para determinar el grado de transformación. También se analizaron cambios en los niveles de diversas proteínas reguladoras del ciclo celular como ciclina A, ciclina D1, p21^{Waf1}, p27^{Kip1}, p53 y pRb.

Los resultados obtenidos demuestran que cuando E5 de HPV16 y Ras^{G12V} se expresan simultáneamente, compiten por una vía de señalización mitogénica; lo que provoca una disminución en la transformación de la célula. Es decir, E5 de HPV16 puede contrarrestar la transformación celular inducida por el oncogén *ras* cuando se expresan en la misma línea celular, lo cual puede indicar que el papel de E5 durante la infección por HPV tal vez no sea desacoplar el ciclo celular (como lo hacen E6 y E7) para aumentar la reproducción del genoma viral, si no precisamente evitar que la célula experimente una

replicación incontrolada e inestabilidad genómica ya que estos eventos evitarían que el propio virus concluyera su ciclo vital.

2. INTRODUCCIÓN

Aunque históricamente los papilomavirus han coexistido con los vertebrados, no fue hasta principios del siglo XX que Ciuffo estableció la etiología viral de las verrugas humanas (papilomas) mediante el uso de extractos libres de células hechos a partir de verrugas como inóculo para experimentos de transmisión de humano a humano (Stoler, 2000). Actualmente, se sabe que los papilomavirus infectan esencialmente todas las especies de vertebrados, e inducen de manera primaria (aunque no exclusiva) neoplasias del epitelio escamoso.

A la fecha, se han caracterizado más de 100 tipos de virus de papiloma humano (HPV), pero sólo algunos de ellos son tróficos para el tracto anogenital. En la actualidad la infección por HPV es una de las enfermedades de transmisión sexual más común en el mundo (Cobo, 2009).

2.1 Epidemiología del cáncer cervical

El cáncer cervical (CC) es el tercer tipo de cáncer que se diagnostica con mayor frecuencia en el mundo, y es la cuarta causa de muerte por cáncer entre las mujeres a nivel mundial, lo que representa el 9% del total de nuevos casos de cáncer y el 8% del total de muertes por esta enfermedad (Jemal et al., 2011). Durante 2008, se estimaron 529,409 nuevos casos y 274,883 muertes por esta causa en todo el mundo. Sin embargo, cerca del 86% de los casos ocurren en países en vías de desarrollo, donde representan el 13% del total de cáncer entre las mujeres (WHO/ICO Information Center on HPV and Cervical Cancer, 2010). Las tasas de incidencia más altas se encuentran en el sur, este y oeste de África, centro y sur de Asia y América del sur, en contraste con el oeste de Asia, Australia/Nueva Zelanda y Norteamérica que presentan las tasas más bajas (Jemal et al., 2011).

En México (figura 1) se registraron 10,186 nuevos casos de CC y 5061 muertes por dicha causa en 2008 (WHO/ICO Information Center on HPV and Cervical Cancer, 2010). Aunque estas cifras se relacionan estrechamente con el nivel socioeconómico, se ha observado que México presenta otros factores de riesgo para el desarrollo de CC entre los que se encuentran: alta prevalencia de HPV en mujeres mayores de 35 años (15%);

alto número de partos en las mujeres de la mayoría de los grupos sociales y cobertura limitada de programas de tamizaje para la detección de CC (Bosch, 2003).

En base a su asociación con el desarrollo de CC, los HPV pueden ser agrupados en virus de bajo y alto riesgo. Los de bajo riesgo incluyen a los tipos 6, 11, 42, 43 y 44; mientras que los HPV de alto riesgo incluyen a los tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70. En el grupo de alto riesgo se incluyen algunos tipos que son encontrados de manera poco frecuente en las lesiones cancerosas pero se encuentran constantemente en lesiones escamosas intraepiteliales (SILs), por lo que algunos autores se refieren a estos tipos como de riesgo intermedio (Burd, 2003). De los diferentes tipos de HPV el tipo 16 es el más prevalente en el mundo, seguido del tipo 18. (Muñoz, 2000).

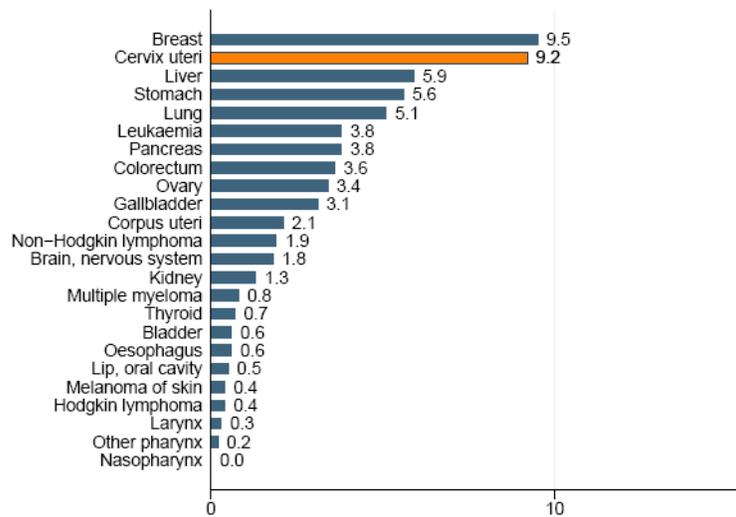


Figura 1. Mortalidad por CC comparada con otros tipos de cáncer en México en mujeres de todas las edades. WHO/ICO Information Center on HPV and Cervical Cancer, 2010.

De esta forma, los tipos de HPV de alto riesgo (oncogénicos) están asociados con 99.7% de todos los casos de CC (Walboomers et al., 1999). Por su parte, los HPV de bajo riesgo son responsables de la mayoría de los casos de verrugas anogenitales y algunos casos de resultados anormales de pruebas de Papanicolaou (Pap) (Ault, 2006). Por lo anterior, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha clasificado a los HPV tipos 16 y 18 como agentes carcinogénicos para

los humanos, mientras que los tipos 31 y 33 son considerados como probablemente carcinogénicos (Franco et al., 2001).

La presencia de una infección con HPV de alto riesgo es necesaria, pero puede no ser suficiente para el desarrollo de CC. Diversos estudios sugieren que para que una mujer desarrolle CC debe haber una interacción entre diversos factores y una infección persistente por HPV (Burd, 2003). Estos resultados concuerdan con el hecho de que sólo una fracción de mujeres con infección persistente por HPV eventualmente desarrollará CC, por lo que se ha sugerido que factores hormonales (número elevado de partos y uso de anticonceptivos orales por un periodo largo), así como infección por *Chlamydia trachomatis*, pueden ser considerados como cofactores en el desarrollo de lesiones cervicales asociadas a la infección por HPV. Otros posibles cofactores incluyen ciertas deficiencias nutricionales y factores del hospedero que pueden incrementar la susceptibilidad a infecciones por HPV (como marcadores genéticos o moduladores de la respuesta inmune hacia HPV) (Muñoz, 2000).

Otro factor importante en el desarrollo de una neoplasia cervical, es la existencia de variantes del HPV. Las variantes de HPV difieren tanto en propiedades biológicas y químicas como en la patogenicidad. En base a variaciones en la secuencia de la región promotora y de la cápside, se han definido 5 grupos filogenéticos naturales de HPV: Europeo (E), Asiático (As), Asiático-Americano (AA), Africano 1 (Af1) y Africano 2 (Af2) (Burd, 2003). Estudios recientes sugieren que tipos específicos de HPVs pueden poseer diferentes riesgos relativos para el desarrollo de cáncer en diferentes regiones geográficas (Bosch et al., 1995).

Estudios epidemiológicos recientes han demostrado que el riesgo de desarrollar una neoplasia intraepitelial cervical es 14 veces más alta para mujeres que han tenido al menos 3 pruebas positivas para HPV, comparadas con mujeres que han presentado pruebas negativas. Además, se sabe que infecciones con HPV de alto riesgo son más persistentes que aquellas con HPV de bajo riesgo, siendo el tipo 16 el más común en infecciones persistentes. Para mujeres de 18 a 35 años, el tiempo medio de resolución de infecciones con HPV de alto riesgo es de 9.8 meses, que es significativamente más alto que el tiempo necesario para la resolución de infecciones por HPV de bajo riesgo (4.3 meses). La persistencia también está asociada con edades mayores, infección con múltiples tipos de HPV y sistema inmune comprometido (Cox, 2006). Otros factores de riesgo para adquirir una infección con HPV incluyen: tener múltiples compañeros

sexuales; haber iniciado actividad sexual a edad temprana; tener historial de otras infecciones de transmisión sexual (ITS); presentar verrugas genitales, mostrar resultados anormales en Pap y/o haber tenido alguna pareja sexual con CC (mujeres) o de pene (hombres) (Burd, 2003). Asimismo, se ha sugerido que otros virus transmitidos sexualmente, como el citomegalovirus o el herpes virus, pueden ser cofactores en el desarrollo de CC aunque en esto no existen datos concluyentes (Burd, 2003).

Por otra parte, se han reportado resultados contradictorios respecto a la utilidad del condón para la protección contra la infección por HPV. Esto puede deberse a la inconsistencia en su uso, o bien, debido a que éste puede no proteger adecuadamente contra una infección por HPV, ya que el virus puede ser transmitido por contacto con el tejido del escroto o ano que no están protegidos por un condón (Burd, 2003). Existe evidencia que sugiere que el uso de condón protege contra algunas secuelas clínicas de infección por HPV y además ayuda a la resolución de dicha infección y de los síntomas clínicos asociados, aún cuando no sea muy útil para prevenir la infección primaria (Ault, 2006).

La respuesta inmune primaria frente a una infección por HPV es mediada por células T, por lo que las condiciones que comprometan la respuesta inmune (tales como trasplantes renales, o infección con HIV), incrementan el riesgo de adquisición de HPV y progresión a CC (Burd, 2003).

Actualmente se han desarrollado dos vacunas multivalentes que protegen contra los tipos 6, 11, 16 y 18, y se estima que reducen hasta en un 90% las infecciones por HPV (Cox, 2006), sobre todo en países en vías de desarrollo donde los programas de tamizaje por medio de Pap han sido poco efectivos (Franco et al., 2001). Sin embargo, para que esto suceda la cobertura de vacunación deberá ser generalizada a la población de riesgo (adolescentes no expuestos al HPV), lo cual no será factible a corto plazo debido al alto costo de las vacunas.

2.2 Patología del cáncer cervical

El HPV infecta a las células del cuello uterino, que es la parte inferior y estrecha del útero o matriz y se ubica entre la vejiga y el recto. Forma un canal que desemboca en la vagina, la cual a su vez conduce al exterior del cuerpo (Vorvick & Storck, 2009). El cuello

uterino está revestido por un epitelio escamoso no queratinizante, y se divide en 3 regiones :

- a) Exocérnix: está cubierto por un epitelio plano, escamoso y pluriestratificado no queratinizante. El epitelio se apoya en una lámina de tejido conjuntivo y una membrana basal, agrupándose las células en 4 estratos (figura 2): estrato basal, estrato parabasal o espinoso, estrato intermedio y estrato superficial o escamoso.
- b) Endocérnix: está revestido por un epitelio monoestratificado columnar de células cilíndricas altas, ciliadas, mucíparas y en empalizada.
- c) Unión escamosa-cilíndrica o zona de transición: es la unión del epitelio cilíndrico con el escamoso y se localiza generalmente en el orificio cervical externo, pero varía según la edad, momento del ciclo menstrual y embarazo entre otros. Es en esta zona de transición epitelial donde ocurren la mayor parte de las patologías del cérvix, incluyendo el cáncer.

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para la Prevención, Detección, Diagnóstico, Tratamiento, Control y Vigilancia Epidemiológica del Cáncer Cérvico Uterino (NOM-014-SSA2-1994), se le llama displasia a una anomalía del desarrollo de un epitelio con pérdida de la estructura de éste y alteraciones en la morfología de sus componentes celulares, y aunque la displasia no es un indicativo de cáncer, si las células anormales no son tratadas a tiempo, esta lesión puede llegar a desarrollar cáncer (Lundes et al., 2009). Los cambios precancerosos del cuello uterino generalmente no causan dolor y no provocan síntomas, y sólo son detectados mediante pruebas citológicas como el Pap (Vorvick & Storck, 2009).

Existen dos sistemas formales para la clasificación citológica de las lesiones precursoras de cáncer cervical. El primero es el sistema de neoplasia intraepitelial cervical o NIC (por sus siglas en español) propuesto por Richart en 1967 (Lacruz, 2003), quien clasifica a las lesiones en: a) NIC I o Displasia leve, donde el tercio inferior de las células en la capa superior del cuello uterino son anormales y las lesiones se relacionan con HPV de bajo riesgo (Ruiz, 1997), por lo que más del 70% de estas lesiones son regresivas (Syrjänen et al., 1992); b) NIC II o Displasia moderada a acentuada, donde dos tercios de la capa epitelial presenta células anormales (Ruiz, 1997) y un 53% pueden ser regresivas

(Syrjänen et al., 1992) y c) NIC III o Displasia severa a carcinoma *in situ*, en este estadio las células precancerosas están presentes en toda la capa superior del cuello uterino (Ruiz, 1997) y solo un 14% son regresivas (Syrjänen et al., 1992).

El segundo sistema es conocido como Bethesda, fue desarrollado en 1998 y modificado por última vez en 2000 en donde se incluyen las siguientes categorías (Lundes et al., 2009): a) Células escamosas atípicas de significado incierto (ASCUS), esta categoría indica que los cambios observados pueden deberse a un proceso benigno pero intenso, o a una lesión potencialmente grave ya que son cuantitativa o cualitativamente insuficientes como para ser clasificados con seguridad como una lesión intraepitelial (Lacruz, 2003); b) Lesiones intraepiteliales de bajo riesgo (LSIL, por sus siglas en inglés), incluyen a las NIC I y se refiere a los cambios tempranos en tamaño, forma y número de células que forman la superficie del cuello uterino (Lundes et al., 2009). Estas lesiones están relacionadas con HPVs de bajo riesgo y su evolución suele ser impredecible; c) Lesiones intraepiteliales escamosas de alto riesgo (HSIL, por sus siglas en inglés), incluyen a NIC II y NIC III e implican la presencia de un número alto de células precancerosas en la superficie del cuello uterino (Lundes et al., 2009) y están relacionadas con HPVs de alto riesgo.

De acuerdo con la NOM-014-SSA2-1994, si existe alguna lesión en la que todo el epitelio, o la mayor parte de la muestra tiene un aspecto celular de carcinoma y no hay invasión del estroma subyacente, se trata de cancer *in situ*. Si las células además logran infiltrarse o otros tejidos y/u órganos, entonces se estará desarrollando un CC invasor (Vorvick & Storck, 2009).

2.3 Biología y ciclo de vida del HPV

Inicialmente, los papilomavirus fueron clasificados como miembros de la familia *Papovaviridae* (Burd, 2003), junto con los géneros polyoma y virus vacuolizantes de los simios (Stoler, 2000). Sin embargo, el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) ha reconocido a *Papillomaviridae* y *Polyomaviridae* como dos familias separadas debido a que presentan grandes diferencias tanto en el tamaño de sus genomas como en la organización de los mismos, además de que no

presentan similitudes entre sus secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos (De Villiers et al., 2004).

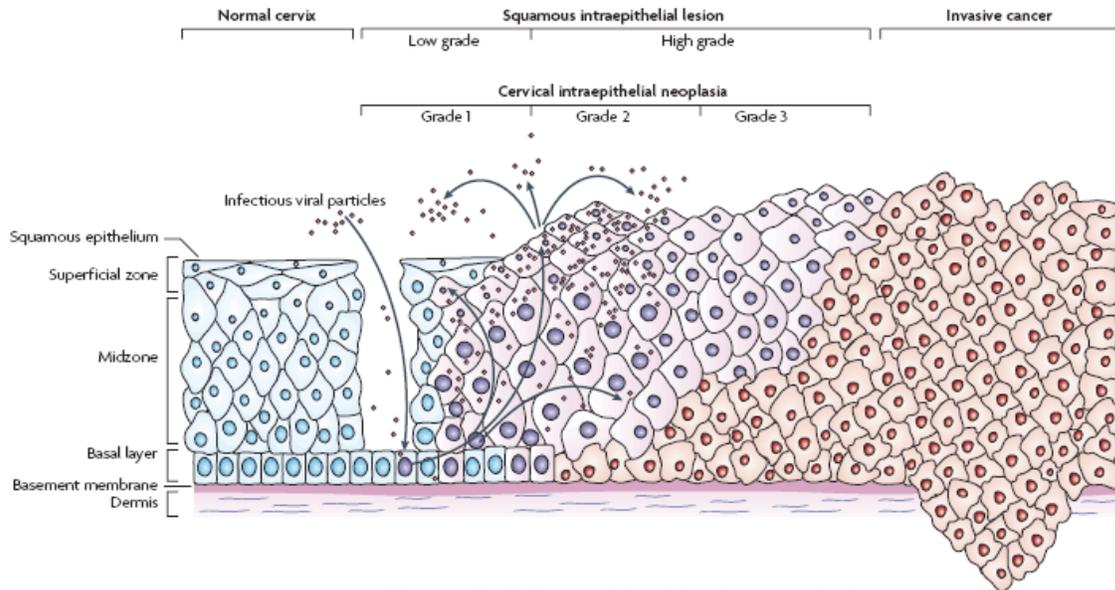


Figura 2. Células del tejido del exocérvix.
Woodman et al, 2007. Nature Review Cancer.

Los HPVs son virus no envueltos, de aproximadamente 55 nm de diámetro y con un genoma que consiste de una molécula circular de DNA de doble cadena (Burd, 2003), conformada por aproximadamente 8,000 pares de bases (Stoler, 2000). Se pueden clasificar en 4 grupos:

- Supergrupo A (virus de papiloma Alfa): Los virus de este grupo son patógenos transmitidos principalmente por vía sexual pero también pueden infectar mucosa oral tanto de humanos como de primates. Los virus de alto riesgo pertenecientes a este supergrupo causan lesiones en mucosas que pueden progresar a neoplasias de alto grado y cáncer, ya que son capaces de immortalizar queratinocitos (Doorbar, 2005). Este grupo incluye a los tipos 2, 6, 7, 10, 16, 18, 23, 32, 34, 53, 54, 61 y 71 (De Villiers et al., 2004).
- Supergrupo B1 (virus de papiloma Beta): Son los causantes de lesiones cutáneas en humanos que cursan como infecciones latentes o inaparentes, que

pueden tornarse activas en pacientes inmunosuprimidos o con defectos hereditarios (Doorbar, 2005). A este grupo pertenecen los tipos 5, 9 y 49 (De Villiers et al., 2004).

- Supergrupo B2 (virus de papiloma Gamma): Causan verrugas cutáneas en humanos (Doorbar, 2005), e incluye a los tipos 4, 48, 50, 60 y 88 (De Villiers et al., 2004).
- Supergrupo E (virus de papiloma Mu-Nu): Aquí se agrupan el resto de los HPV y son los causantes de papilomas cutáneos y verrugas palmares (Doorbar, 2005), abarcando los tipos 1, 41 y 63 (De Villiers et al., 2004).

El genoma de HPV contiene aproximadamente ocho marcos de lectura abiertos (ORF) que a su vez son transcritos como RNAs policistrónicos a partir de una sola cadena de DNA (Fehrmann & Laimins, 2003) y es debido al splicing de estos genes que se pueden codificar todas las proteínas virales (Stoler, 2000). El DNA de este virus se encuentra asociado con proteínas histonas con las que forma complejos similares a la cromatina (Longworth & Laimins, 2004).

Los HPV contienen en su genoma 3 regiones importantes que son:

1. La primera región es una región no codificante reguladora de 400 a 1000 pb, la cual se conoce como long control region (LCR por sus siglas en inglés) (Burd, 2003) o URR “upstream regulatory region” (Stoler, 2000). Esta región contiene las secuencias regulatorias requeridas tanto para la replicación viral como para la transcripción (Fehrmann & Laimins, 2003) y es donde se presenta el más alto grado de variación genómica (Burd, 2003).
2. La segunda región es conocida como región temprana y consiste en los ORFs para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7, las cuales están involucradas en la replicación viral y la oncogénesis (Burd, 2003). En los tipos de HPV de alto riesgo, estas proteínas tempranas son expresadas antes de la producción replicativa del virus desde un promotor localizado en la región LCR que en el caso de HPV16 es el P₉₇ (Fehrmann & Laimins, 2003). Los ORFs de **E6** y **E7** son los únicos que son expresados y conservados en todos los HPV asociados con alguna patología (Stoler, 2000).

3. La tercera región es la tardía, la cual codifica las proteínas estructurales L1 y L2 que forman la cápside viral y son expresadas desde un promotor tardío (P₆₇₀ en el caso de HPV16) durante la síntesis de nuevos viriones (Fehrmann & Laimins, 2003; Conway & Meyers, 2009).

HPV exhibe tropismo específico por queratinocitos (Cheah & Looi, 1998). Su ciclo de vida está conectado directamente con la diferenciación celular de las células epiteliales del hospedero e incluye diversas etapas, durante las cuales los genes tempranos de HPV son expresados a través de todo el ciclo de vida, mientras que los genes tardíos son solamente expresados en células diferenciadas del epitelio, al final del ciclo (Pyeon et al; 2009).

2.3.1 Establecimiento de la Infección

Se cree que la infección por HPV ocurre a través de microtraumas en el epitelio, lo cual expone a las células basales a la entrada de los virus (Fehrmann & Laimins, 2003), ya que para establecer una infección por HPV es necesario que el virus alcance células mitóticamente activas (Cheah & Looi, 1998). A pesar de que se desconoce cuáles son los receptores que median esta primera interacción, se cree que para que una infección sea eficiente es necesario el heparán sulfato (Longworth & Laimins, 2004) y otros receptores secundarios como la integrina $\alpha 6$ (Doorbar, 2006). Tras su unión a las células, las partículas virales son internalizadas mediante endocitosis mediada por vesículas revestidas de clatrina (Doorbar, 2005) o vía caveolas. Estudios recientes sugieren que el modo de entrada a las células puede no ser conservado entre los diferentes tipos de HPVs (Doorbar, 2006). Finalmente, las partículas son desensambladas dentro de endosomas tardíos y/o lisosomas, para que finalmente el DNA viral se transporte hacia el núcleo (Doorbar, 2006).

2.3.2 Mantenimiento del Genoma

Una vez dentro del núcleo, el genoma de HPV se establece como un episoma, produciéndose de 20 a 100 copias por célula que se replican en sincronía con la duplicación del DNA del hospedero (Fehrmann & Laimins, 2003), para lo cual se requiere la expresión de las proteínas virales de replicación E1 y E2 (Doorbar, 2006). Estas proteínas se unen al origen de replicación viral y comienzan el reclutamiento de la DNA polimerasa celular junto con las demás proteínas necesarias para la replicación (Hamid et

al., 2009; Longworth & Laimins, 2004), además de facilitar la correcta segregación del genoma durante la división celular (Doorbar, 2005).

2.3.3 Fase proliferativa

Después de la división celular, los queratinocitos del epitelio no infectado salen del ciclo celular tan pronto se separan de la capa basal y migran hacia las capas suprabasales para terminar su proceso de diferenciación (Doorbar, 2005), lo que frecuentemente causa que las células pierdan su núcleo (Longworth & Laimins, 2004). En contraste, las células infectadas por HPV mantienen activo su ciclo celular aún cuando han dejado la capa basal, por lo que la célula permanece en fase S incluso en las capas suprabasales. Esto provoca, por un lado, la amplificación del genoma viral a miles de copias por célula (Fehrmann & Laimins, 2003); y por el otro, el retraso en la diferenciación terminal normal de la célula (Doorbar, 2006). Como resultado final, la célula retiene su núcleo a través de las diferentes capas del epitelio (Longworth & Laimins, 2004).

Dado que las proteínas E6 y E7 son expresadas a partir de un solo mRNA bicistrónico, se cree que estas proteínas actúan juntas durante esta fase para restringir el ciclo celular y producir un retraso en la diferenciación terminal de las células (Doorbar, 2005). E7 interactúa con proteínas de la familia pRb que a su vez actúan como reguladores negativos del ciclo celular ya que previene el progreso hacia la fase S mediante su asociación con el factor de transcripción E2F. Sin embargo, cuando E7 se une con pRb desplaza a E2F, lo que lleva a la expresión de proteínas necesarias para la replicación del DNA (Doorbar, 2005).

Por su parte, E6 previene la inducción de apoptosis en respuesta a la entrada descontrolada a fase S en la célula provocada por E7, esto mediante la degradación por ubiquitinación de p53. Por lo tanto, se considera que E6 es un factor de predisposición para el desarrollo de cáncer, ya que permite que errores en la replicación del DNA del hospedero no sean corregidos, además de que puede irrumpir en la adhesión celular normal (Doorbar, 2005).

2.3.4 Amplificación del genoma

La amplificación del genoma ocurre en las capas intermedias o suprabasales del epitelio (Doorbar, 2005) y necesita de la expresión de todas las proteínas tempranas,

incluyendo E5 (Doorbar, 2006), que es una proteína transmembranal que se asocia con un retraso en el proceso de acidificación de endosomas.

Durante esta fase, E2 es expresada en bajos niveles, pero es requerida para formar un complejo en el origen de replicación viral que induce distorsión localizada en el DNA viral además de facilitar el reclutamiento de moléculas adicionales de E1, que actúan como helicasas (Doorbar, 2006). E2 puede también actuar como activador transcripcional y de esta manera regular el promotor viral temprano para controlar la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7. A niveles bajos, E2 actúa como un activador transcripcional, mientras que a niveles altos, E2 reprime la expresión de estos oncogenes ya que desplaza el activador transcripcional a un sitio adyacente del promotor primario (Doorbar, 2006).

2.3.5 Síntesis de viriones

La transcripción de los genes tardíos y la consiguiente síntesis de la cápside se restringen a los queratinocitos diferenciados que se encuentran en la superficie del epitelio. La expresión de los genes tardíos está controlada por una región corta no codificante denominada SNR (short non-coding region) que se encuentra entre los ORFs de **E5** y **L2** (Maki et al; 1996).

También se ha encontrado evidencia de que una región del DNA que precede a los ORFs de los genes tardíos denominada *upstream late region* (ULR) puede regular la expresión de los genes tardíos de manera dependiente de la diferenciación de los queratinocitos (Geisen & Kahn, 1996).

Las proteínas de la cápside son L1 y L2: la proteína principal L1 se expresa después de L2, permitiendo así el ensamble de las nuevas partículas infecciosas en las capas suprabasales del epitelio. E2 es necesaria en este proceso ya que puede mejorar la eficiencia de la encapsidación del genoma (Doorbar, 2005). Después de que L2 se ha traducido regresa al núcleo donde se asocia con cuerpos leucémicos promielocíticos (PML), que a su vez reclutan genomas virales mediante su interacción con la proteína E2. La proteína L1 se ensambla en capsómeros en el citoplasma antes de translocarse nuevamente al núcleo donde se almacena dentro de los cuerpos PML sólo después de que L2 se haya unido a éstos. Posteriormente L2 se asocia con L1 mediante una región

hidrofóbica cercana al extremo C-terminal, mientras que la maduración y estabilización del virus se completa por la formación de puentes disulfuro (Doorbar, 2006).

HPV es un virus no lítico, por lo que no es liberado sino hasta que se encuentra en la capa más superficial del epitelio, es decir, debe eventualmente salir de la célula infectada y resistir en el espacio extra-celular antes de poder re-infectar otra célula, por lo que es resistente a la desecación. Se cree que E4 puede irrumpir las redes de queratina y afectar la integridad de la envoltura del estrato epitelial para facilitar el egreso de los viriones (Doorbar, 2006).

2.3.6 Transformación celular asociada al HPV

La integración del DNA viral en el genoma del hospedero no es una parte normal del ciclo de vida del HPV ya que hace imposible que el virus termine su ciclo de vida (Hamid et al., 2009). Sin embargo es un evento importante para el desarrollo de cáncer cervical (Fehrmann & Laimins, 2003), ya que las células que presentan esta integración muestran un aumento en su proliferación y presumiblemente forman un grupo de células inmortalizadas cuyas mutaciones pueden llevar a la transformación celular total y a la formación de carcinomas (Hamid et al., 2009). La integración ocurre en diferentes sitios del genoma del hospedero, aunque parece ser que la integración tiene preferencia por “sitios frágiles” (Hamid et al., 2009).

La integración frecuentemente produce la interrupción del ORF de **E2**, con lo cual se eliminan las acciones reguladoras de esta proteína sobre la expresión de E6 y E7, provocando altos niveles de estas dos proteínas oncogénicas, lo que contribuye a la transformación celular y eventualmente al desarrollo del cáncer. También se suprime la expresión de **E5** y de las proteínas tardías L1 y L2, (Fehrmann & Laimins, 2003) por lo que los virus que integran su genoma con el del hospedero quedan imposibilitados para producir viriones y por tanto concluir su ciclo de vida. (Hamid et al., 2009),

2.4. Oncoproteínas del HPV

La capacidad de las infecciones por HPV de generar tumores malignos se ha atribuido a la acción de las oncoproteínas E6 y E7 de este virus ya que se ha demostrado que E6 y E7 de HPV16 cooperan entre sí para inmortalizar queratinocitos primarios

humanos y células epiteliales (Fehrmann & Laimins, 2003). Estudios recientes sugieren que la proteína E5 puede estar involucrada en la transformación, aunque este hecho es causa de debates debido a que usualmente el ORF de esta proteína es eliminado al momento de la integración del genoma viral al del hospedero (Swan et al., 1994). Otros autores sostienen que E5 no es necesariamente responsable del mantenimiento de la malignidad debido a que algunos tumores no contienen ni el gen ni la proteína E5, sin embargo, ésta puede contribuir a la proliferación neoplásica durante los estadios tempranos de la infección sin ser indispensable para la transformación maligna (Tsai & Chen, 2003).

2.4.1 Proteína E6

La proteína E6 está formada por cerca de 160 aminoácidos (Fehrmann & Laimins, 2003) y contiene dos señales de localización nuclear (NLS), por lo que se localiza tanto en núcleo como en citoplasma (Hamid et.al., 2009).

La proteína E6 no tiene actividades enzimáticas intrínsecas, por lo que realiza sus funciones mediante su interacción con proteínas celulares (Fehrmann & Laimins, 2003). La función mejor conocida de E6 es su habilidad de inducir la degradación de p53. La proteína p53 está involucrada en múltiples procesos, incluyendo la regulación del ciclo celular, inducción de apoptosis y reparación de daño en DNA. La vida media de p53 es baja, pero en respuesta a DNA dañado o algún otro tipo de estrés celular p53 se estabiliza y funciona como factor de transcripción al unirse al DNA e inducir la expresión de p21^{Waf1} (un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas (Cdks)) resultando en arresto del ciclo celular y/o apoptosis. La proteína p53 activada puede inducir apoptosis por un mecanismo independiente de transcripción que involucra la translocación de p53 a la mitocondria y la liberación del citocromo c (Hamid et al; 2009).

La proteína E6 de HPVs de alto riesgo se une al dominio central de p53 en conjunción con E6-AP, una ligasa celular E3 que no se une a p53 en la ausencia de E6, lo que lleva a la ubiquitinación de p53, y por tanto a su degradación por el proteosoma 26S, reduciendo la vida media de p53 en queratinocitos de varias horas a pocos minutos (Longworth & Laimins, 2004). Estudios recientes demuestran que la unión de E6 a E6AP también resulta en la auto-ubiquitinación de E6AP, lo que sugiere que posiblemente E6 puede regular los niveles de éste mediante su propia degradación (Longworth & Laimins, 2004). Solamente E6 de HPVs de alto riesgo es capaz de degradar a p53, ya que se une

a éste tanto por su extremo carboxilo terminal como por su dominio central, mientras que E6 de HPVs de bajo riesgo sólo se une a p53 por su extremo carboxilo terminal, resultando en una interacción que es más débil (Hamid et al., 2009). La degradación de p53 provoca que se sobrepasen las señales de arresto normales en los *checkpoints* en G1/S y G2/M del ciclo celular, lo que lleva a la adquisición de numerosas alteraciones genéticas e inestabilidad del genoma celular, que contribuyen a la transformación maligna de las células (Fehrmann & Laimins, 2003).

Por otra parte, E6 tiene además otras proteínas diana para degradación mediante proteosoma, incluyendo la proteína apoptótica efectora Bak (Hamid et al., 2009). E6 puede también interactuar con proteínas de la familia PDZ, que ayudan a anclar proteínas transmembranales al citoesqueleto para mantener unidas a todas aquellas proteínas que formen un complejo de señalización (Cooper & Hausman, 2003). E6 de HPVs de alto riesgo se unen específicamente a dominios PDZ y promueven la degradación vía proteosoma de diversos miembros de esta familia, incluyendo hDLG, MUPP-1 y hSCRIB (Hamid et al., 2009).

Finalmente, E6 tiene la capacidad de activar la expresión de hTERT, que es la subunidad catalítica de la telomerasa (Hamid et al., 2009). La telomerasa es una enzima con múltiples subunidades responsable de la replicación del DNA telomérico en los extremos de los cromosomas y se encuentra activa en células embrionarias, pero ausente en células somáticas (Fehrmann & Laimins, 2003). Conforme la célula se divide, las regiones teloméricas se acortan con cada ronda de división, produciendo eventualmente inestabilidad cromosomal y senescencia. Sin embargo, E6 de HPVs de alto riesgo mantiene la longitud de los telómeros por medio de la acción de las telomerasas. Aparentemente E6 activa la transcripción de hTERT mediante la acción combinada de Myc y Sp-1 (Longworth & Laimins, 2004). La sobre expresión de hTERT en conjunción con E7 es suficiente para inmortalizar queratinocitos primarios, lo que sugiere un efecto importante de E6 sobre este proceso (Hamid, et.al., 2009).

2.4.2 Proteína E7

La proteína E7 contiene 98 aminoácidos, se encuentra predominantemente en el núcleo y presenta 3 regiones conservadas denominadas CR1, CR2 y CR3 que son importantes para sus funciones (Hamid et al., 2009). La región CR1 de E7 se encuentra en el extremo N-terminal, la región CR2 contiene el motivo LXCXE mediante el cual se

puede unir a la proteína pRb, mientras que la región CR3 contiene 2 motivos de dedos de Zinc (Longworth & Laimins, 2004).

E7 de HPVs de alto riesgo puede immortalizar células primarias humanas y llevar a la transformación cuando es expresada junto con un oncogén activo (Hamid et al., 2009). Sin embargo, mientras que E7 por sí sola puede immortalizar queratinocitos humanos, la presencia de E6 aumenta la frecuencia a la cual este efecto puede ocurrir (Fehrmann & Laimins, 2003).

E7 puede unirse a diversas proteínas de la familia pRb, como la misma pRb, p107 y p130 mediante su motivo LXCXE. Estas proteínas juegan un papel importante en la replicación y reparación del DNA, prevención de apoptosis, diferenciación celular y senescencia (Hamid et al., 2009), y son expresadas diferencialmente a través del ciclo celular: pRb es expresada constitutivamente durante todas las fases del ciclo celular, mientras que p107 se sintetiza predominantemente durante la fase S, y p130 se expresa en fase G0 (Longworth & Laimins, 2004).

En células normales, pRb se encuentra hipofosforilada y unida a E2F al comienzo de la fase G1 y comienza a fosforilarse por el complejo ciclinaD/Cdk4/6 conforme pasa a la fase S. Esto provoca la liberación de E2F, lo que activa la transcripción de los genes requeridos para la transición a la fase S. Por su parte, E7 de HPVs de alto riesgo invalida este control del ciclo celular mediante el secuestro de pRb, con lo que se libera la proteína E2F. Además, E7 de HPVs de alto riesgo también induce la degradación de pRb mediante una vía dependiente de proteosoma. La remoción de pRb no sólo es importante para la tumorigénesis sino que también reprime la transcripción de **p16** (inhibidor de Cdks), mientras que E7 aumenta su nivel. Normalmente p16 se une a ciclina D inhibiendo la formación del complejo ciclina D/Cdk4 (y por ende la fosforilación de pRb) para inducir el arresto del ciclo celular; sin embargo, esto no ocurre durante una infección con HPV, ya que la degradación de pRb se favorece por la presencia de E7 (Hamid et al., 2009).

La senescencia limita el potencial replicativo de las células por lo que debe ser evitada durante la tumorigénesis, así que E7 se une a la proteína promielocítica de leucemia (PML) y bloquea la habilidad de esta proteína de inducir senescencia (Hamid et al., 2009). Además, E7 de HPVs de alto riesgo también puede unirse a E2F-1, lo que provoca la activación de la transcripción dependiente de este factor (Hwang et al., 2002).

Estudios recientes demuestran que E7 de HPVs de alto riesgo puede bloquear la habilidad de p21^{Waf1} de inhibir la actividad de Cdks, así como la replicación dependiente del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) mediante la unión directa de E7 con el extremo carboxilo de p21^{Waf1} (Funk et al., 1997).

Finalmente, E7 de HPVs de alto riesgo puede alterar la estructura de la cromatina de algunos genes, y por tanto alterar su expresión mediante el complejo cromatina-desacetilasa. Las enzimas histonas desacetilasas (HDAC) son expresadas en todos los tejidos y actúan removiendo grupos acetilo de histonas (Longworth & Laimins, 2004). E7 puede unirse a HDAC de clases I y II de manera indirecta a través de Mi2 β , que es un componente del complejo de reordenamiento de nucleosomas por desacetilación (Hamid et al., 2009). Además las HDACs pueden desacetilar directamente a los factores E2F, provocando así la pérdida de su función (Longworth & Laimins, 2004).

2.4.3 Proteína E5

E5 es una proteína hidrofóbica de alrededor de 80 aminoácidos que se localiza principalmente en membranas endosomales, aparato de Golgi y en menor cantidad en membrana plasmática (Fehrmann & Laimins, 2003). Debido al tamaño y a la hidrofobicidad de esta proteína, se concluye que no presenta actividad catalítica, si no que más bien ejerce sus efectos mediante la modulación de la actividad de proteínas de la membrana celular (DiMaio, 2006).

La expresión de E5 tiene lugar en los estadios tempranos de la infección, y está extinta en la mayoría de los cánceres. En lesiones genitales humanas, la expresión de E5 va disminuyendo conforme las lesiones progresan en malignidad debido a que la integración del genoma viral en el del hospedero se realiza en los ORFs **E2/E5** (Venuti & Campo, 2002).

Una de las principales actividades de E5 es su interacción con el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR). La familia de receptores de crecimiento de tipo I incluye entre otros a EGFR (Erb B1), los cuales tienen actividad tirosina cinasa y se encuentran frecuentemente sobrepresados en diversos tipos de cánceres humanos. En respuesta a la unión de su ligando, los EGFR forman homo- o hetero-dímeros, que resulta en la autofosforilación del receptor (Tsai & Chen, 2003).

En células normales, el EGFR presente en la superficie celular es rápidamente internalizado en respuesta al tratamiento con factor de crecimiento epidermal (EGF), después de lo cual el receptor es degradado en lisosomas (DiMaio, 2006). En contraste, se ha demostrado que en presencia de E5, la exposición a EGF resulta en un incremento tanto en el número como en la fosforilación del EGFR en la membrana plasmática. Este efecto se debe al impedimento de la regulación negativa de los receptores, así como al aumento del reciclamiento de estos hacia la membrana celular (Tsai & Chen, 2003). La inhibición de la degradación del EGFR puede deberse a la habilidad de E5 de impedir la asociación de dicho receptor con c-Cbl que es una E3 ubiquitin ligasa que normalmente actúa sobre el EGFR activado para degradarlo mediante proteosoma (DiMaio, 2006).

Por su parte, el aumento en el reciclaje del EGFR es mediado por la unión de E5 a la subunidad de 16kDa de la ATPasa de protones localizada en la membrana endosomal (Tsai & Chen, 2003). Esta ATPasa es responsable del bombeo de iones H^+ contra un gradiente de concentración en varios compartimentos celulares, incluyendo aparato de Golgi, endosomas, lisosomas y vesículas revestidas de clatrina, acidificando el pH interno de estos. Por lo tanto, la unión de E5 provoca la inhibición de la acidificación de los organelos mencionados, y precisamente la alcalinización de endosomas puede ser responsable de la inhibición de la degradación del EGFR, así como del aumento en su reciclaje hacia la membrana plasmática (Venuti & Campo, 2002).

Por otro lado, cambios en la actividad del aparato de Golgi debido al cambio en el pH, pueden tener profundas consecuencias para las funciones normales de las células, las cuales podrían explicar la acción pleiotrópica de E5. Receptores de membrana y moléculas de adhesión son glicosiladas y transportadas hacia la membrana plasmática vía aparato de Golgi. GTPasas pequeñas son modificadas postraduccionalmente en el mismo organelo, por lo que la glicosilación aberrante de proteínas en el aparato de Golgi frecuentemente conlleva a la transformación maligna. Así, la habilidad de E5 de alterar el pH de organelos intracelulares mediante inhibición de la subunidad de 16kDa de la ATPasa protónica vacuolar puede influenciar la actividad de muchas proteínas y contribuir a la transformación celular (Venuti & Campo, 2002). Por tanto, varios autores sugieren que E5 interfiere en el tráfico vesicular más que en la modificación del pH de los endosomas (DiMaio, 2006; Venuti & Campo, 2002).

Además de ser un componente de la ATPasa protónica vacuolar, la proteína de 16kDa es una proteína multifuncional con cuatro dominios transmembranales que también

forma parte del conexón, es decir, del canal que permite la comunicación intracelular a través de las llamadas “gap junctions”, que a su vez son responsables de la homeostasis (Venuti & Campo, 2002). Así, además de sus efectos sobre el pH endosomal, la interacción entre E5 y la proteína de 16kDa inhibe la comunicación intracelular mediada por “gap junctions”, la cual está asociada con la desfosforilación de la conexina 43, que es otro componente de las “gap junctions”. Por su parte, se ha identificado que la conexina 43 es regulada negativamente por E5 en queratinocitos diferenciados, lo que hace que las células transformadas sean refractarias a las señales inhibitorias de crecimiento originadas en las células vecinas durante la progresión de tumores (Venuti & Campo, 2002; DiMaio, 2006).

Se sabe que miembros de las familias c-Jun y c-Fos constituyen al factor de transcripción AP-1, ya sea como homodímeros Jun-Jun, o como heterodímeros Jun-Fos y una activación incorrecta de estas proteínas puede llevar a la transformación celular (Venuti & Campo, 2002). Se ha descrito que E5 puede estimular la transcripción de los oncogenes nucleares **c-jun**, **junB** y **c-fos**. La expresión del proto-oncogene **c-jun** es estimulada mediante PKC y vías dependientes de Ras para poder así transmitir señales hacia el núcleo y su inducción se hace a través de un sitio de unión de la proteína activadora AP-1. Por otro lado, E5 promueve la expresión de **c-fos** mediante un sitio de unión para el factor nuclear 1 (NF-1); de este modo E5 puede potenciar la expresión de genes virales mediante la activación de AP-1 y NF-1 (Tsai & Chen, 2003). Debido a que existen diversos sitios de unión de AP-1 y NF-1 en la región reguladora del DNA de HPV, es posible que E5 pueda transactivar genes virales y de este modo incrementar la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 (Tsai & Chen, 2003).

Estudios previos han demostrado que E5 puede suprimir la expresión del gen supresor de tumores **p21^{Waf1}** mediante represión transcripcional (Venuti & Campo, 2002), lo cual puede promover la proliferación celular. Esta función sugiere que E5 tiene un papel en el incremento o la potenciación de E6 y E7 durante la inmortalización de queratinocitos humanos en el curso de la infección primaria por HPV (Tsai & Chen, 2003). La expresión de **c-Jun** lleva a la reducción tanto del RNAm como de la proteína p21^{Waf1}, por lo que es posible que la inhibición de la expresión de **p21^{Waf1}** debida a E5 esté asociada al incremento de c-Jun (Venuti & Campo, 2002). Del mismo modo, la represión de p21^{Waf1} puede facilitar la activación del complejo ciclina D-Cdk4, el cual se sabe que fosforila a pRb e inactiva la función de éste como controlador del ciclo celular (Tsai & Chen, 2003).

Por otra parte, se sabe que mediante el bloqueo de la apoptosis, los virus previenen la muerte prematura de la célula hospedera para maximizar la progenie de los virus y facilitar una infección persistente (Venuti & Campo, 2002). En este caso, se sabe que E5 puede proteger a queratinocitos primarios humanos de la apoptosis inducida por irradiación con rayos ultravioleta (DiMaio, 2006). Este efecto protector parece estar mediado por 2 vías de señalización que corren por debajo del EGFR: la vía de la fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) y la vía de las MAP cinasas (Tsai & Chen, 2003). También se sabe que E5 inhibe la apoptosis inducida por el ligando Fas y la inducida por el factor de necrosis tumoral, que están implicados en la apoptosis por vía extrínseca. Durante este proceso, el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) o el ligando Fas se unen a sus receptores, provocando que estos se trimericen, lo cual a su vez provoca la unión de la proteína adaptadora FADD “Fas-associated death domain” y el posterior reclutamiento de procaspasa 8. Este complejo proteico es denominado complejo de señalización inductor de muerte (DISC). La formación de este complejo provee el ambiente necesario para la activación de procaspasa 8 mediante auto-cisición, que a su vez activará a la caspasa 3, que es una caspasa efectora que activa las últimas fases de la apoptosis (Kabsch & Alonso, 2002). Se ha demostrado que E5 inhibe la formación del complejo DISC, por lo que la caspasa 8 al igual que la caspasa 3 no pueden ser activadas (Kabsch et al., 2004).

En el contexto de la respuesta inmune se sabe que el complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC I) es responsable de la presentación de péptidos antigénicos a las células T efectoras, por lo que tiene un papel crítico en la vigilancia del sistema inmune. La proteína β 2-microglobulina y otras chaperonas (como TAP) se unen a la cadena pesada del MHC en el retículo endoplásmico en un proceso dependiente del pH, luego este complejo es transportado a través del aparato de Golgi hacia la membrana plasmática (Venuti & Campo, 2002). Dado que E5 interfiere con la función del aparato de Golgi y los lisosomas mediante la inhibición de la acidificación del pH, puede predecirse que el transporte del MHC I también será alterado. Así, la regulación negativa del MHC I toma lugar en diferentes niveles, incluyendo la reducción en la transcripción del gen de la cadena pesada del MHC I, lo que genera bajos niveles de esta proteína, además de existir una inhibición en el transporte del MHC I hacia la superficie celular (Venuti & Campo, 2002). De este modo, parece que la reducida expresión de MHC I en células que expresan E5 es en parte debida a la retención de éste dentro del aparato de Golgi, junto con la degradación del antígeno y la inhibición de la transcripción del gen (DiMaio, 2006).

La proteína E5 también puede regular negativamente la expresión de Antígenos Leucocitarios Humanos A (HLA A) y HLA B en la superficie celular, los cuales presentan péptidos virales a linfocitos T citotóxicos, de esta forma E5 no permite que las células infectadas sean destruidas mediante la respuesta inmune celular del hospedero. En contraste, HLA C y HLA E (HLAs no clásicos) no sufren regulación negativa por E5, lo que permite a las células escapar de la muerte a través de las células NK (DiMaio, 2006).

Dado que E5 se expresa en estadios precancerosos en el epitelio cervical durante la infección con HPV y debido a que las lesiones precancerosas usualmente contienen pocas células con malignidad invasiva, se sugiere que una intervención temprana puede ofrecer una oportunidad de erradicar tumores más fácilmente mientras se está en estadios premalignos. Algunos reportes han demostrado que la proliferación de linfocitos en respuesta a E5 es inversamente proporcional a la severidad de las lesiones intraepiteliales. Esto convierte a E5 en un blanco potencial de HPV que permita eliminar células potencialmente tumorales en los estadios tempranos de la enfermedad (Sang-Woo & Joo-Sung, 2006).

2.5 Oncoproteína Ras

Es conocido que en condiciones *in vitro*, la sola expresión de las oncoproteínas de HPV no es suficiente para la transformación celular, sino que además se requiere la activación de al menos un oncogén celular (Swan et al., 1994).

Las proteínas codificadas por oncogenes celulares (oncoproteínas) son formas mutantes activadas de aquellas proteínas codificadas por proto-oncogenes celulares. Las proteínas que se expresan a partir de proto-oncogenes celulares funcionan normalmente como componentes de vías involucradas en la transmisión de señales y la regulación génica. Estas proteínas participan en una complicada cascada que transfiere señales desde receptores de factores de crecimiento localizados en la superficie celular hasta factores transcripcionales que actúan en el núcleo de la célula (Swan et al., 1994). La activación de estos oncogenes celulares altera el control normal de la transcripción originado por factores de crecimiento, dando como resultado, por ejemplo, la habilidad de las células de proliferar aún en ausencia de factores mitogénicos (Swan et al., 1994).

La familia de las proteínas Ras pertenece a la gran superfamilia de GTPasas monoméricas (o proteínas pequeñas de unión a GTP), que también incluye a las familias de las proteínas Rho, Rac y a la familia Rab, entre otras (Lodsch et al., 2002). Las proteínas Ras participan en la transmisión de señales desde receptores de superficie tipo tirosina-cinasa hasta el núcleo, estimulando la proliferación o la diferenciación celular (Alberts et al., 2002).

Las proteínas Ras se identificaron por primera vez como proteínas oncogénicas de virus tumorales que causaban sarcomas en ratas (de allí el nombre de Ras, del inglés **Rat Sarcoma virus**). El interés por esta proteína se incrementó en 1982, cuando se implicaron por primera vez las mutaciones en el proto-oncogén *ras* con el desarrollo de cánceres humanos. La importancia de Ras en la señalización se puso de manifiesto mediante experimentos en los que se demostraba que la inyección de Ras activa inducía la proliferación de células sanas de mamífero, mientras que la interferencia con la función de Ras bloqueaba la proliferación celular inducida por factores de crecimiento. Así, Ras no es capaz solamente de inducir el crecimiento anormal característico de las células cancerosas, sino que se requiere en la respuesta de las células normales a la estimulación por factores de crecimiento (Cooper & Hausman, 2003).

Al igual que otras GTPasas pequeñas, Ras es una proteína de unión a nucleótidos de guanina que actúa como interruptor, alternando entre 2 estados conformacionales diferentes: activo, cuando se une a GTP e inactivo cuando se encuentra unido a GDP. Sin embargo, en las células existen dos clases de proteínas que regulan la actividad de Ras, influyendo en la transición entre el estado activo y el inactivo. Las proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAP) incrementan la velocidad de hidrólisis de GTP unido a Ras, de forma que la inactivan (Alberts et al., 2002). Estos reguladores negativos están compensados por proteínas denominadas factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), las cuales estimulan el intercambio de los nucleótidos de GDP por GTP del citosol, tendiendo así a activar a Ras (Lodisch et al., 2002).

La activación de Ras por receptores tipo tirosina-cinasa en la cara citoplasmática de la membrana tiene una vida muy corta: las fosforilaciones son revertidas rápidamente por fosfatasas específicas y Ras se inactiva mediante la hidrólisis del GTP que lleva unido. Por lo tanto, estas señales han de convertirse en eventos más duraderos que mantengan activa la señal de proliferación y transmitirla hacia el núcleo. Hay una familia que contiene al menos 5 miembros que parecen desempeñar un papel importante: las proteínas MAP

cinastas (de “Mitogen Activated Proteins”), también denominadas ERK (“Extracellular Signal Regulated Kinase”). Estas cinastas son activadas por una gran variedad de señales inductoras de proliferación y diferenciación (Alberts et al., 2002), pero el mecanismo mejor caracterizado es el mediado por receptores tirosina-cinastas: una vez que estos receptores se han autofosforilado, se asocian con la proteína adaptadora Grb2 que como su nombre lo indica, sirve como un puente con el que une por un lado al receptor fosforilado mediante un dominio SH2 y al mismo tiempo (gracias a un dominio SH3) une a SOS que actúa como GEF de Ras, ayudando a intercambiar los nucleótidos de guanina, generando el complejo activo Ras-GTP (Lodisch et al., 2002). En su forma activa, Ras interacciona con varias proteínas efectoras, entre las que se encuentra la serina/treonina cinasa Raf. Esta interacción Ras-Raf hace que Raf pase de un estado inactivo en el citosol, a uno activo en la membrana plasmática (Alberts et al., 2002). De este modo, la activación de Ras inicia una cascada de activación a través de Raf, el cual una vez activado se une y fosforila a MEK, una proteína cinasa que fosforila residuos de tirosina y serina. MEK a su vez fosforila y activa a MAP cinasa, otra serina/treonina cinasa, y finalmente esta cinasa fosforila muchas proteínas diferentes, entre ellas factores de transcripción que median respuestas celulares (Cooper & Hausman, 2003; Lodisch et al., 2002).

Existen 3 miembros de la familia de oncogenes **ras** en humanos: Harvey (**H**)-**ras**, Kirsten (**K**)-**ras**, y Neuroblastoma (**N**)-**ras**. Los 3 proto-oncogenes **ras** codifican para proteínas de 21 kDa (p21) de 189 aminoácidos (Mammas et al., 2004). Sin embargo, Ras adquiere propiedades transformantes debido a mutaciones puntuales, generalmente en los codones 12, 13, 59 o 61, que inhiben la interacción de Ras con GAP, lo que permite mantener a Ras en su estado activo de manera constitutiva (Mammas et al., 2004).

Un estudio que analizó las mutaciones en los loci **K-ras** y **H-ras** demostró que la prevalencia de mutaciones en el codón 12 de K-ras en muestras positivas para HPV de alto riesgo fue de 20.45% (Mourón et al., 2000). Otros estudios han detectado la presencia de H-ras mutado en 20% de los casos de NIC grado III, y 41% en carcinomas *in situ*, lo que pone de manifiesto la importancia de este oncogén en el desarrollo de CC (Berger et al., 2006).

Hay una asociación entre las mutaciones activadoras en estos oncogenes, y la infección por HPV, sin embargo, los mecanismos por los cuales el oncogén **ras** lleva a la transformación maligna no están completamente dilucidados, pero involucra inestabilidad genómica y la subsecuente acumulación de daño genético. Algunos estudios han

sugerido también que la presencia del oncogén **ras** es un marcador de malignidad para el desarrollo de tumores, así como un marcador temprano para la progresión del desarrollo de cáncer (Landro et al., 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

El CC es la cuarta causa de muerte por cáncer entre las mujeres a nivel mundial, lo que representa el 8% del total de muertes por esta enfermedad (Jemal et al., 2011). En México, durante el año 2008 murieron 5,061 mujeres y se reportaron 10,186 nuevos casos de CC (WHO/ICO Information Center on HPV and Cervical Cancer, 2010), siendo el segundo lugar de muertes más alto en América Latina (Flores et al., 2008).

Desafortunadamente en la población mexicana se presentan diversos factores de riesgo importantes en el desarrollo de CC entre los que se encuentran la elevada prevalencia del DNA de HPV en mujeres mayores de 35 años (> 15%), alto número de partos en la mayoría de los grupos sociales y cobertura limitada de los programas de tamizaje para la detección de CC (Bosch, 2003), por lo que el CC es definitivamente un problema de salud pública en México.

Se ha demostrado que los HPV de alto riesgo se asocian con 99.7% de todos los casos de CC (Walboomers et al., 1999), siendo los oncogenes virales **E6** y **E7** los que se expresan de manera importante tanto en lesiones precursoras de CC, como en CC invasivo. Recientemente, se demostró que la expresión de **E5**, otro oncogén de HPV, tiene lugar en los estadios tempranos de la infección, y va disminuyendo conforme las lesiones progresan en malignidad, por lo que se ha sugerido que **E5** juega un papel importante en el inicio de la transformación celular. Una de las principales funciones de **E5** es la desregulación del ciclo celular mediante su interacción con EGFR para provocar la activación de diversas vías de transducción de señales (como la de las MAP cinasas), ya que la desregulación de estos caminos de señalización provoca transformación y desregulación de otros proto-oncogenes como es el caso de **ras**.

La proteína Ras participa en la transducción de señales de receptores de superficie tipo tirosina-cinasa, estimulando la proliferación o la diferenciación celular, y puede mediar la activación de la vía de las MAP cinasas. Por su parte, el EGFR es un receptor tipo tirosina-cinasa que al unirse a su ligando transduce señales mitogénicas mediante la vía de las MAP cinasas, cuya actividad ha demostrado ser modificada por **E5** generando proliferación celular.

Debido a que Ras forma parte de la vía de señalización del EGFR y a que **E5** de HPV16 modifica el sistema de señalización de este receptor, es probable que Ras y **E5** se

entrecrucen en algún punto de la vía de señalización que ambas utilizan, provocando que aumente la proliferación celular, se reduzca la apoptosis, se inhiba la diferenciación y se favorezca la transformación celular; sobre todo si una de las consecuencias de la interacción de E5 con EGFR es la desregulación de otros oncogenes celulares.

Si esta asociación resulta cierta, entonces se tendría un mejor conocimiento de los procesos que tienen lugar en estadios tempranos de esta enfermedad y que llevan al desarrollo de malignidad. Posiblemente, esto podría ayudar en la detección de proteínas que pudieran ser blancos para el desarrollo de nuevos fármacos que permitan incidir en la reducción del CC generado por HPV.

4. HIPÓTESIS

Debido a que Ras forma parte de la vía de señalización del receptor de EGF y a que E5 de HPV16 favorece esta misma vía de señalización, entonces la interacción funcional de la proteína E5 de HPV16 y Ras es necesaria para modificar el ciclo celular y desarrollar transformación celular.

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar si E5 de HPV16 modifica la señalización mitogénica de Ras^{G12V} en el proceso de transformación celular.

Objetivos específicos:

1. Determinar si E5 de HPV16 altera el grado de transformación de Ras^{G12V}.
2. Identificar si E5 en presencia de Ras^{G12V} modifica los niveles de proteínas reguladoras del ciclo celular.

6. METODOLOGÍA

6.1 Generación de líneas celulares

A partir de embriones de ratón de la cepa FvB/Ntac con 13 días de gestación, se generó una línea celular de fibroblastos, los cuales fueron obtenidos a partir de la disgregación de los embriones y tratamiento con tripsina de acuerdo a lo reportado por Heidcamp (2009). Después de 3 meses de pasajes continuos los fibroblastos presentaron un período de crisis, después de lo cual sólo aquellas células que se inmortalizaron pudieron sobrevivieron y continuaron creciendo, a esta línea celular se le denominó MEF-FvB. Posteriormente, esta línea celular inmortalizada fue transfectada con plásmidos que contienen los diferentes oncogenes de interés: **E5** y **E7** de HPV16 en el plásmido pcDNA3 y el oncogene **ras^{G12V}** así como **ras116Y** (dominante negativo) en el plásmido pBabe, ya sea de manera individual o combinados. El oncogen **ras^{G12V}** presenta una mutación que sustituye glicina por valina en la posición 12, lo cual provoca que la proteína Ras expresada por este gen se encuentre siempre unida a GTP, y por tanto esta proteína se encuentra activa de manera constitutiva. Por su parte, el oncogén **ras116Y** es un mutante que tiene tirosina en lugar de asparagina en la posición 116, lo que impide que la proteína Ras expresada se una a GTP, por lo que la señalización transducida por ésta se ve afectada negativamente (Ogiso et al., 1990)

Además de los genes ya mencionados, también se incluyeron los correspondientes plásmidos pcDNA3 y pBabe sin insertos, generando así las siguientes líneas celulares:

a) pC+pB	MEF-FvB + pBabe + pcDNA (ambos plásmidos sin inserto)
b) E5	MEF-FvB + pcDNAE5
c) Ras	MEF-FvB + pBaberas ^{G12V}
d) E5 +Ras	MEF-FvB + pcDNAE5 + pBaberas ^{G12V}
e) E7 + Ras	MEF-FvB + pBaberas ^{G12V} + pcDNAE7
f) Ras 116Y	MEF-FvB + pBaberas116Y
g) E5+Ras 116Y	MEF-FvB + pcDNAE5 + pBaberas116Y

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)+ 10% de suero fetal bovino (SFB) e incubadas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

6.2 Transfección estable de la línea celular MEF-FvB con lipofectamina

Células fueron sembradas a una concentración de 2×10^5 células/caja petri de 60 mm y se dejaron crecer por 24 h en medio DMEM complementado con 10% de SFB. Al siguiente día las células se incubaron con medio libre de suero y se transfectaron con 10 μ g de cada uno de los plásmidos descritos anteriormente (para las transfecciones dobles, se tomaron 5 μ g de cada plásmido) previamente mezclados con 20 μ L de Lipofectamina (Invitrogen). Después de 5 horas de incubación el medio fue reemplazado por medio DMEM + 10% SFB dejándose incubar por 24 horas más, después de lo cual las células se tripsinizaron y se sembraron a una dilución 1:10 en cajas de 60 mm por cada tratamiento. Para las transfecciones dobles, después de 24 h el medio DMEM+10% SFB fue suplementado con 800 μ g/mL de la droga G418 y 400 μ g/mL de higromicina para llevar a cabo la selección positiva de las células que incorporaron los plásmidos deseados. El medio de selección fue cambiado cada tercer día durante 15 días. Para las transfecciones individuales, el medio de selección sólo contenía un antibiótico de selección de acuerdo a la resistencia dada por el plásmido transfectado (G418 para pcDNA3 e higromicina para pBabe).

Debido al alto porcentaje de eficiencia de la transfección, hubo un número elevado de células transfectantes por lo que no fue posible obtener clonas. Por lo tanto, después de 15 días se hicieron “pools” de células resistentes a G418 y/o higromicina. Las células fueron expandidas y congeladas para su conservación en nitrógeno líquido, y evaluadas por RT-PCR para determinar la presencia del transcrito del gen transfectado (**E5**, **E7**, **ras^{G12V}** y/o **ras116Y**).

6.3 Extracción de RNA de cultivos celulares

Células de cada uno de los “pools” de las diferentes líneas celulares se lisaron con tiocianato de guanidina y β -mercaptoetanol, se incubaron con fenol, cloroformo y acetato de sodio 2 M y se centrifugaron 20 min a 8000 rpm en el rotor SS34 de Sorvall para separar el RNA del resto de los componentes celulares. El RNA se precipitó 2 veces con isopropanol durante 1 hora a -20°C y luego se lavó con etanol al 75%. Después de eliminar el etanol sobrante y secar la pastilla en estufa a 37°C durante 10 min, el RNA se disolvió en 250 μ L de agua con dietilpirocarbonato (H_2O -DEPC), de esta suspensión se tomaron 2 alícuotas: una de 5 μ L para determinar la concentración de RNA en el espectrofotómetro (260 nm); y otra de 10 μ L para evaluar la integridad del RNA mediante

electroforesis en gel de agarosa al 1% (70 V, 1 h). Finalmente, a la disolución anterior se le agregaron 3 volúmenes de etanol absoluto y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

6.4 Evaluación de genes transfectados por RT-PCR

Una vez obtenido el RNA de las diferentes líneas celulares se llevó a cabo la reacción de RT para lo cual se incubaron 2 µg de RNA total con 160 U de enzima Mo-MLV RT (USB), dNTPs 10 mM (Roche) y 60 pmol de oligo d(T)₁₅ (Roche) para obtener el DNA de doble cadena (cDNA). Posteriormente y a partir de la reacción de RT se tomaron 3 µL del cDNA de la retrotranscripción y se incubaron con 1.5 mM de MgCl₂ (Promega), dNTP's 2 mM (Roche), 0.625 U de Taq polimerasa (Promega) y oligonucleótidos específicos para amplificar cada uno de los genes deseados: Para el gen **E5** de HPV16 For (5'-CCGCTCGAGACAAATCTTGATACTGCATCC-3') y Rev (5'-CCGCGGATCCCTTA TGTAATTA AAAAGCGTGC-3'); y para el gen **E7** de HPV16 For (5'-CCGCTCGAGCATG GAGATACACCTACATTG-3') y Rev (5'-CGGCATCCCTTATGGTTTCTGAGAACAGAT-3'). La PCR para el fragmento de **E5** de HPV16 consistió en el pretratamiento de la muestra a 95°C por 5 min, seguida de la adición de la Taq polimerasa y continuando con 30 ciclos, cada uno conformado por desnaturalización a 94°C por 45 s, alineación oligonucleótido-específica a 54°C por 1 min y elongación a 72°C por 2 min. Al final de los 30 ciclos, se dió una incubación por 15 min a 72°C para dar oportunidad a la Taq polimerasa de que terminara de extender los productos de PCR que pudieran haber quedado incompletos, y luego a 30°C por 30 s para enfriar las reacciones. Para el fragmento de **E7** de HPV16 se comenzó con 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos, cada uno conformado por desnaturalización a 95°C por 30 s, alineación oligonucleótido-específica a 55°C por 30 s y elongación a 72°C por 1 min. Al final se incubó 15 min a 72°C y luego a 30°C por 30 s. Todos los productos de PCR fueron analizados mediante gel de poliacrilamida al 8%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV.

6.5 Preparación de Proteína A-Sefarosa cargada con inmunoglobulinas de rata

En un tubo de microcentrífuga se colocaron 250 µL de proteína A sefarosa (SPA) y se lavó 3 veces durante 15 min con 1 mL de buffer RIPA con cocktail de inhibidores de proteasas Mini complete de Roche®. Después de los lavados, la SPA se incubó por 2 h con agitación continua a 4°C con anticuerpos anti-rata desarrollados en conejo. Tras la incubación, la SPA fue lavada 3 veces con 1 mL de buffer RIPA. La mitad de SPA (125 µL) se incubó con inmunoglobulinas de rata (30 µL, 0.1 µg/µL) durante 2 h con agitación

continua a 4°C, finalmente se lavó nuevamente 3 veces con buffer RIPA, resuspendiéndose 1:1 en este mismo buffer.

6.6 Inmunoprecipitación de la proteína Ras

Cultivos de cada línea celular fueron sembrados en cajas petri de 100 mm con DMEM + 10%SBF e incubadas a 37°C y atmósfera de 5% de CO₂. Una vez que estuvieron en confluencia, se aspiró el medio de cultivo y las células se lavaron 3 veces con solución buffer de fosfatos (PBS) frío (KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM). Posteriormente se incubaron por 10 min en cama de hielo con 500 µL de buffer para ensayos de radio inmunoprecipitación (RIPA por sus siglas en inglés: PBS, NP40 2%, Deoxicolato de sodio 1%, SDS 0.2%, EDTA pH 8.0 2 mM) mezclado con cocktail de inhibidores de proteasas Mini complete de Roche®. Tras la incubación, las células se rasparon y los lisados se pasaron varias veces por una pipeta automática para romper el DNA. Los lisados se centrifugaron por 15 min a 13000 rpm en una microcentrífuga a 4°C para separar los componentes celulares no disueltos y el sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo.

Posteriormente para determinar la concentración de proteína de los lisados (método de BCA de PIERCE), alícuotas de 10 µL por duplicado de cada lisado fueron incubadas en placas de 96 pozos con buffer de lisis y reactivo BCA (Sulfato cúprico al 4% mas ácido bicíntrico en proporción 1:50) a 37°C por 20-30 min. Se determinó la absorbancia a 570 nm y las concentraciones fueron interpoladas de una curva de calibración de albúmina sérica bovina que se corrió en paralelo a las muestras.

Se tomaron 500 µg de proteína ajustando el volumen final con buffer RIPA a 1 mL y se agregaron 20 µL de SPA previamente cargada con inmunoglobulinas de conejo anti-rata (como se describe en el punto anterior). Las muestras de lisados se incubaron por 2 h a 4°C con agitación continua, después de lo cual se centrifugaron a 13000 rpm por 10 min en una microcentrífuga a 4°C, para separar los antígenos unidos inespecíficamente a la SPA-conejo-anti-rata (SPA-IN) del sobrenadante. Una vez separada, la SPA-IN se lavó 3 veces con buffer RIPA y una vez más con Tris 50 mM pH 6.8, centrifugando entre cada lavado como se especificó anteriormente. Estas pastillas (SPA-IN) se utilizaron como control de la inmunoprecipitación, por lo que una vez lavadas, se mezclaron con 50 µL de buffer de carga Laemmli (SDS 2%, Glicerol 8.6%, Tris HCl 100 mM pH 6.8, DTT 6 mM,

azul de bromofenol 0.01%) y se mantuvieron a -20°C hasta que se cargaron en un gel de poliacrilamida.

Por otro lado, los sobrenadantes se incubaron con anticuerpo monoclonal de rata anti-Ras Y13-259 (1 µg por muestra) por 16 h a 4°C con agitación continua. Posteriormente, se les agregó 20 µL de la SPA previamente cargada con inmunoglobulinas conejo anti-rata en proporción 1:1 y se dejaron incubar por 2 h más a 4°C con agitación continua. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron en las condiciones antes señaladas y el sobrenadante fue desechado; las pastillas se lavaron 3 veces con buffer RIPA y una vez con Tris 50mM pH 6.8. Finalmente las pastillas se mezclaron con 50 µL de buffer de carga Laemmli como ya se describió y todas las muestras se hirvieron por 5 min antes de cargarse en un gel al 15% de poliacrilamida junto con las SPA-IN.

Las muestras se corrieron en gel de poliacrilamida al 15% dejándolas separar por 16 h a 70 V. Después las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa como se menciona posteriormente y se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-Ras C-137 como anticuerpo primario, y posteriormente con anticuerpo de cabra anti-conejo (acoplado a peroxidasa) como anticuerpo secundario. El reconocimiento antígeno-anticuerpo se puso de manifiesto mediante quimioluminiscencia (ECL, Perkin Elmer, E.E.U.U.) exponiendo las membranas a película X-OMAT por diferentes tiempos (1-30 min) hasta lograr la mejor exposición de las bandas.

6.7 Inmunodetección de proteínas celulares implicadas en el ciclo celular

Se sembraron células de cada línea celular a una densidad de 3×10^5 células por caja petri de 60 mm y se dejaron crecer por 48 h, tras lo cual se dejaron incubar durante 24 h en medio sin suero (DMEM+0.2%SFB). Una vez completada esta incubación, todas las células se estimularon con EGF (25 ng/mL) y se fueron lisando con buffer RIPA suplementado con ortovanado de sodio (1 mM), DTT (0.5 mM) y cocktail de inhibidores de proteasas (Mini complete de Roche®), a los tiempos 0, 2, 4, 8, 16 y 24 h post-estimulación. Una vez obtenidos los lisados, estos se cuantificaron por el método de BCA de PIERCE (como ya se describió), se tomaron los volúmenes de lisados correspondientes a 40 µg de proteína total y se agregaron 10 µL de buffer de carga Laemmli. Las muestras se colocaron en un baño de agua hirviendo por 5 min, para posteriormente cargarse en un gel de poliacrilamida al 12.5% y la electroforesis se dejó

correr a 60 V por 16 h. Después las proteínas del gel fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa (PROTEAN) con buffer de transferencia (Tris 24 mM, glicina 190 mM, etanol 20%) durante 6 h a 200 V, para lo que se utiliza un sistema de enfriamiento.

Después de la transferencia, la membrana fué bloqueada por 30 min a temperatura ambiente (TA) con leche en polvo descremada al 10% disuelta en PBS-T (PBS, Tween 20 0.05%). Tras el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo deseado (anti-p21^{Waf1}, anti-p27^{Kip1}, anti-ciclina A, anti-ciclina D1, anti-p53, anti-pRb o anti-actina) en PBS-T-leche 5% durante 16 h a 4°C con agitación continua. Posteriormente, las membranas se lavaron 8 veces (15 min por cada lavado) con PBS-T y luego incubadas con el anticuerpo secundario específico conjugado a peroxidasa (cabra anti-ratón o anti-conejo de DAKO, Dinamarca) en PBS-T-leche 5% con agitación suave por 1 h a TA. Las membranas fueron nuevamente lavadas con PBS-T como ya se mencionó y la señal específica fue detectada por quimioluminiscencia (ECL, Perkin Elmer Co.). Las membranas fueron expuestas a película X-OMAT por diferentes tiempos (1- 30 min) hasta lograr la mejor exposición de las bandas con el menor fondo en la placa fotográfica.

Para poder hacer una evaluación más cuantitativa, las películas de cada Inmunoblot fueron escaneadas y se calculó el número de pixeles de cada una de las bandas mediante análisis densitométrico usando el programa ImageJ (NIH-USA).

6.8 Cultivo en agar suave

Cultivos de las diferentes líneas celulares se tripsinizaron y resuspendieron a 3 diferentes concentraciones por duplicado (5×10^4 , 5×10^3 y 5×10^2 células/pozo) en DMEM+10% SFB y 0.4% de agar noble. La resuspensión celular anterior fue colocada enseguida en placas de 6 pozos previamente preparadas con una capa de agar noble al 1% en DMEM+10% SFB. Los cultivos en agar fueron mantenidos en presencia o ausencia de 25ng/mL de EGF durante el experimento. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5% por 15 días, alimentando las células cada tercer día con 200 µL de DMEM+10%SFB+Antibióticos, agregando EGF (25 ng/mL) a los cultivos correspondientes. El número de colonias de transformación fue determinado bajo el microscopio las cajas petri al término de los 15 días de cultivo.

6.9 Curvas de crecimiento

Células de las diferentes líneas celulares se tripsinizaron y sembraron cada una por duplicado en cajas petri de 35 mm a una densidad de 4×10^4 células/caja, con medio

DMEM+10% SFB. Un juego de cajas de cada línea celular se estimuló con EGF (25 ng/mL) cada tercer día; mientras que el otro fué alimentado solamente con medio sin EGF adicionado. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y cosechadas a diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 6 y 8 días). Las células de cada caja se tripsinizaron y resuspendieron en 1 mL de medio y una alícuota se mezcló 1:1 con azul de tripano. Las células viables (refringentes, no azules) se contaron bajo el microscopio usando una cámara de Neubauer para determinar la cantidad total de células en la caja. Los datos obtenidos se graficaron (número total de células viables vs. Tiempo en días) y se calculó la pendiente de la recta para obtener el tiempo de duplicación ($\ln 2/\text{pendiente}$) y la densidad de saturación de las diferentes líneas celulares.

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de fibroblastos de ratón de la cepa FvB

Los cultivos primarios embrionarios de la cepa de ratón FvB que se generaron fueron obtenidos a partir de 8 embriones, los cuales fueron disgregados por tratamiento enzimático como se describió en la metodología. A partir de estos, se logró obtener el cultivo de los fibroblastos de uno sólo de los embriones, al que se denominó ratón "A". Estas células se mantuvieron en cultivo continuo haciendo pases de las células al llegar a confluencia (una vez por semana). Las células se expandieron y fueron congeladas en el pase 9, considerándose hasta este momento como cultivos primarios. Los cultivos se mantuvieron en cultivo continuo con pases cada semana y aproximadamente después del pase 20 las células sufrieron un lapso de crisis en donde dejaron de incrementarse por varios días, para después proliferar hasta volverse una línea inmortalizada a la cual se le denominó **MEF-FvB**. En este punto se consideró que las células estaban aptas para poder realizar la transfección con los diferentes oncogenes (**E5** y **E7** de HPV16, **ras^{G12V}** y **ras116Y**).

7.2 Generación de líneas celulares que expresan las oncoproteínas E5 o E7 de HPV16 y Ras

La transfección de la línea celular MEF-FvB se llevó a cabo con los diferentes oncogenes de acuerdo a lo descrito en la metodología y seleccionadas con las drogas G418 (400 µg/µL) y/o higromicina (200 µg/µL) por 15 días. Después de este tiempo, se esperaba seleccionar colonias aisladas de células que estuvieran transfectadas con los genes seleccionados, sin embargo, debido a la alta eficiencia de la transfección no fue posible observar colonias aisladas, por lo que la concentración de G418 e higromicina se elevó a 800 µg/µL y 400 µg/µL respectivamente.

Al término del tiempo de selección y a pesar del aumento en la concentración de los antibióticos no se logró obtener colonias aisladas, por lo que se realizaron 2 pases a todos los cultivos celulares, permitiendo así que las células se dividieran para que las drogas consiguieran eliminar aquellas células que pudieran no estar transfectadas. De cada cultivo de células transfectadas con los diferentes genes (**E5**, **E5+ras^{G12V}**, **E5+ras116Y**, **ras^{G12V}**, **E7**, **E7+ras^{G12V}**, **ras116Y** y los plásmidos solos), se mantuvieron 3 cajas petri y

cada cultivo de estos fue tomado como “pool” de células, los cuales fueron conservados con DMEM+10%SFB, realizándose pase de cada cultivo 2 veces por semana. Cada “pool” se expandió y congeló en nitrógeno líquido para su conservación.

7.3 Comprobación de la expresión de genes transfectados

Para analizar la expresión de los diferentes genes que fueron transfectados en la línea celular MEF-FvB se realizó RT-PCR a partir de RNA aislado de cada uno de los 3 pools de las 8 diferentes líneas celulares generadas y las muestras fueron separadas en gel de poliacrilamida al 8%.

La presencia del gen **E5** de HPV16 se evaluó en las líneas celulares E5, E5+Ras y E5+Ras116Y, donde se observó que los 3 “pools” de las 3 diferentes líneas celulares amplificaron un fragmento del tamaño esperado de 252 pb. Al observar la banda de **E5** en los diferentes pools de células se determinó que los “pools” número 3 de cada línea celular que tiene **E5** presentaron la mayor expresión de este gen, por lo que fueron elegidos para realizar los experimentos posteriores (figura 3).

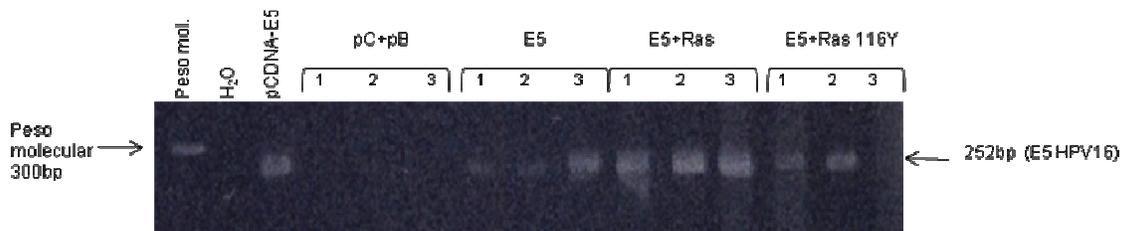


Figura 3. Expresión del gen E5 en las diferentes líneas celulares. PCR del fragmento de 252 pb correspondiente al gen **E5** de HPV16 transfectado en las diferentes líneas celulares. Los productos de PCR fueron separados en gel de poliacrilamida al 8%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz U.V.

En el caso de las líneas celulares E7 y E7+Ras se llevó a cabo el RT-PCR para verificar la expresión del gen **E7** de HPV16 y la banda de 305 pb fue observada en un gel de poliacrilamida al 8%. Todos los “pools” de las células transfectadas con **E7** expresaron el gen, pero de todos sólo fueron elegidos el “pool” 3 de la línea E7 y el “pool” 2 para E7+Ras, por presentar las bandas más prominentes (figura 4).

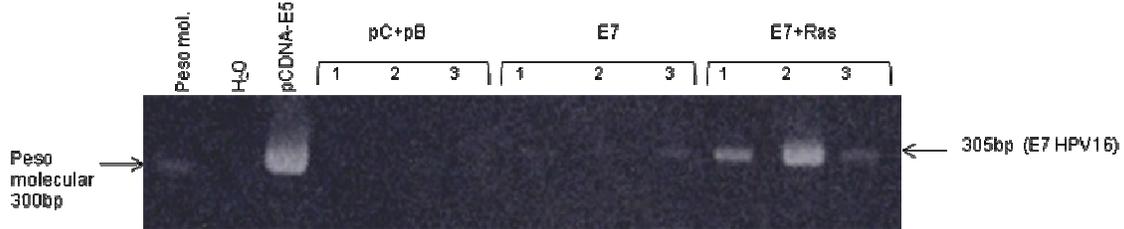


Figura 4. Expresión del gen *E7* en las diferentes líneas celulares. PCR del fragmento de 305 pb correspondiente al gen *E7* de HPV16 transfectado en las diferentes líneas celulares. Los productos de PCR fueron separados en gel de poliacrilamida al 8%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz U.V.

La expresión del gen *ras*^{G12V} por RT-PCR se verificó en las líneas celulares Ras, E5+Ras, E7+Ras, Ras 116Y y E5+Ras116Y, sin embargo, al realizar los ensayos no se logró amplificar adecuadamente el gen *ras*^{G12V}, observándose bandas inespecíficas y falta de reproducibilidad entre los diferentes ensayos realizados. Se llevaron a cabo modificaciones en las condiciones de PCR variando las temperaturas de alineamiento en base a la TM de los oligonucleótidos y la concentración de MgCl₂, pero aún después de esto no fue posible identificar el fragmento de 737 pb que se esperaba. Por lo anterior se decidió verificar la expresión de este gen mediante la expresión de la proteína a través de un ensayo de inmunoprecipitación-inmunoblot. Las células normales expresan Ras celular (*c-ras*), pero el gen *ras*^{G12V} que fue transfectado a las células fue el viral (*v-ras*) con una mutación que genera un cambio de glicina (G) por valina (V) en la posición 12. Por tanto, fue necesario llevar a cabo la inmunoprecipitación de la proteína Ras^{G12V} con un anticuerpo monoclonal anti-Ras (monoclonal de rata Y13-259) que reconoce a todas las proteínas Ras, pero para el inmunoblot se ocupó como anticuerpo primario un anticuerpo anti-Ras que reconoce específicamente al Ras viral (policlonal de conejo anti-Ras C-138) y que fue generado en nuestro laboratorio.

Como se mencionó en la metodología, para esta técnica fue necesario obtener lisados de las líneas celulares transfectadas con el gen *ras*^{G12V} para inmunoprecipitarlos con el anticuerpo monoclonal anti-Ras Y13-259. El inmunoblot se reveló con el anticuerpo policlonal anti-Ras C138 seguido del anticuerpo anti-conejo unido a peroxidasa para finalmente ser revelado por quimioluminiscencia. Los resultados de la inmunoprecipitación-inmunoblot se muestran en la figura 5, en donde se pueden observar

bandas prominentes que corresponden al peso molecular de Ras (21 kDa) en las líneas celulares Ras, E5+Ras y E7+Ras, mientras que en las líneas Ras116Y y E5+Ras116Y las bandas fueron menos intensas. Estos resultados confirman que las tres primeras líneas celulares expresan efectivamente el gen *ras*^{G12V} transfectado, a diferencia de las líneas Ras116Y y E5+Ras116Y que al ser transfectadas con un gen dominante negativo de Ras, muestran una expresión parcialmente abrogada de la misma proteína.



Figura 5. Expresión de Ras^{G12V} en las diferentes líneas celulares. Inmunoblot de la inmunoprecipitación de la proteína Ras^{G12V} de 21 kDa correspondiente al gen *ras*^{G12V} transfectado en las diferentes líneas celulares. La proteína Ras fue inmunoprecipitada con anticuerpo α -Ras Y13-259 (I) y revelado con anticuerpo α -Ras C-138. Lisado celular sin incubar con el anticuerpo α -Ras Y13-259 fue usado como control interno en todas las líneas celulares (C).

De esta forma, una vez identificados los “pools” que presentaron mayor expresión de los genes transfectados ya sea por RT-PCR o por inmunoprecipitación-inmunoblot, se seleccionaron aquellos que se utilizaron para todos los experimentos posteriores que se desarrollaron en este trabajo de investigación, los cuales fueron:

Línea celular	Oncogén expresado	Pool
pC+pB	Ninguno	2
E5	E5 de HPV16	3
Ras	<i>ras</i> ^{G12V}	2
E5+Ras	E5 de HPV16+ <i>ras</i> ^{G12V}	3
E7	E7 de HPV16	3
E7+Ras	E7 de HPV16+ <i>ras</i> ^{G12V}	2
Ras116Y	<i>ras116Y</i>	2
E5+Ras116Y	E5 de HPV16+ <i>ras116Y</i>	3

7.4 Curvas de crecimiento y tiempo de duplicación de las diferentes líneas celulares

Una vez que se seleccionaron los “pools” a utilizar de cada línea celular, se hicieron curvas de crecimiento de cada una de ellas en presencia y ausencia de EGF, como se describió en la metodología. De esta forma, la identificación de diferencias en el crecimiento celular entre las diversas líneas pudiera asociarse a la presencia de alguno de los oncogenes que fueron transfectados. Por otro lado, la estimulación del sistema con EGF (importante para la vía de señalización tanto del oncogén *ras* como para *E5*) puede indicar la posible dependencia (o no) a factores de crecimiento durante el proceso de transformación celular.

El número total de células por cada línea celular fue cuantificado en una cámara de Neubauer cada 2 a 3 días y estos datos fueron graficados como se muestran en la figura 6. Los resultados mostraron que las líneas celulares que expresan los oncogenes *ras*^{G12V} y *E7+ras*^{G12V} presentaron un crecimiento 2.9 y 2.7 veces (respectivamente) más alto con respecto a la línea celular control pC+pB (figura 6 a y b, día 8). Por su parte, la línea celular que expresa *E5* de HPV16, considerado un oncogén, presentó un crecimiento 3.5 veces menor que las células de la línea Ras (figura 6a, día 8) y aunque tiende a comportarse de manera similar al control pC+pB, su crecimiento fue tan solo de 0.8 veces comparado con éste (figura 6a, día 8). Sin embargo, cuando E5 se expresa junto con Ras^{G12V} (línea E5+Ras) se observó un incremento de hasta 2 veces el crecimiento de esta línea celular con respecto al control pC+pB.

Al observar las curvas de crecimiento de las diferentes líneas celulares estimuladas con EGF también se observó que las líneas pC+pB, E5, E7+Ras y E5+Ras116Y aumentaron su crecimiento entre 1.4 a 1.9 veces con respecto a las mismas células sin estimulación con el factor de crecimiento (figura 6 a y b, día 8, +/-EGF). Sin embargo, la línea E5+Ras al ser estimulada con EGF presentó una disminución de hasta 30% en su crecimiento con respecto a la misma línea sin estimulación (figura 6b, E5+Ras, día 8, +/-EGF). Finalmente, se observó que el crecimiento de la línea celular Ras aumenta hasta alcanzar la misma densidad de saturación celular ya sea en presencia o ausencia del EGF, lo que implica la independencia de esta línea celular a los factores de crecimiento.

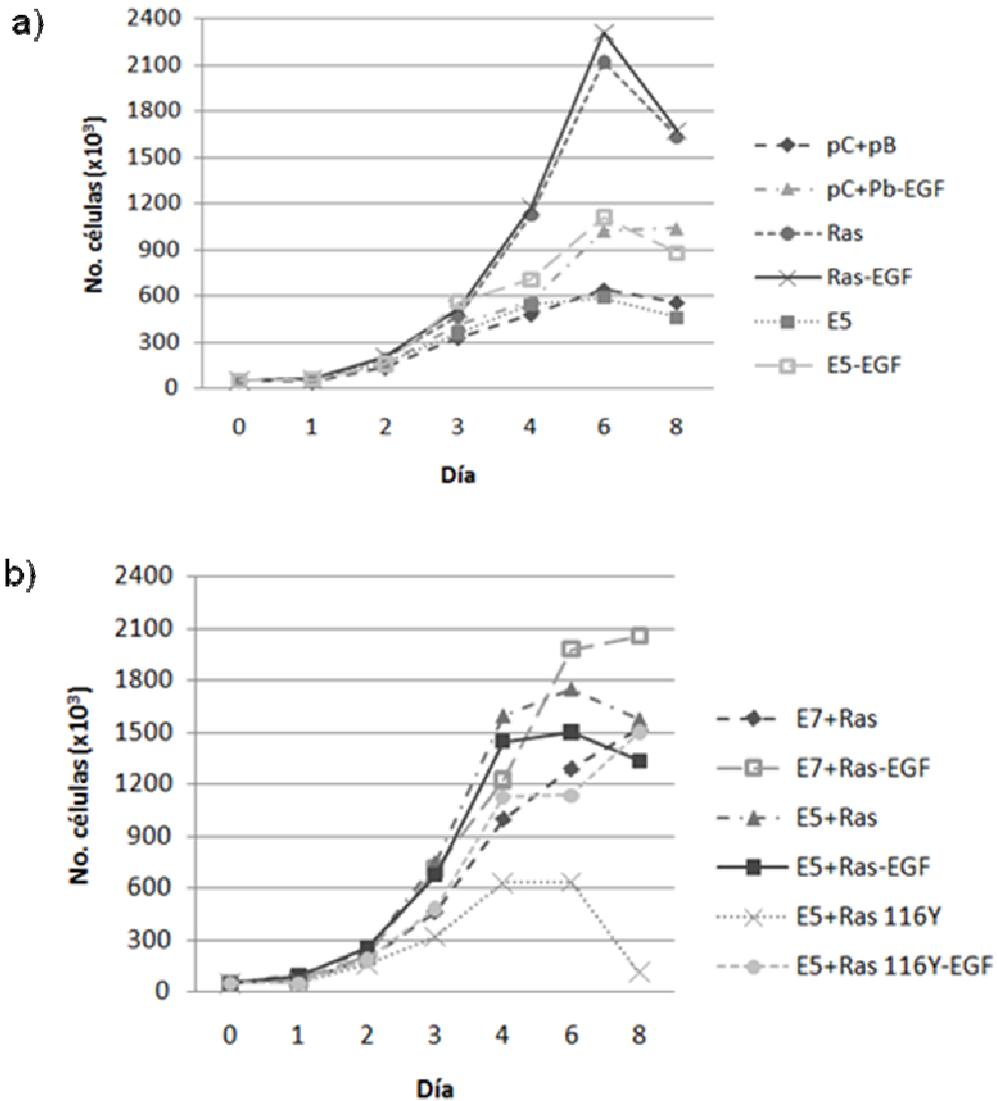


Figura 6. Curvas de crecimiento de las diferentes líneas celulares. Células fueron sembradas en cajas petri y contadas en una cámara de Neubauer cada 24 h. Los datos fueron graficados en número de células contra tiempo. **a)** Curvas de crecimiento de las líneas celulares control pC+pB, E5 y Ras. **b)** Curvas de crecimiento de las líneas celulares E7+Ras, E5+Ras y E5+Ras 116Y.

A partir de las curvas de crecimiento se llevó a cabo el cálculo de los tiempos de duplicación celular para poder tener un dato cuantitativo del tiempo en que se duplica la población de células con relación a los oncogenes con los que fueron transfectadas (Tabla 1). Los resultados mostraron que las líneas celulares Ras y E7+Ras presentaron los menores tiempos de duplicación que fueron de 23.2 y 19.6 h respectivamente, lo que implica un tiempo de duplicación de 27% y 39% menor que el que presentó la línea celular

control pC+pB (31.9 h). Por su parte, la línea celular E5 tuvo un tiempo de duplicación de 35.1 h, lo que indica que estas células se duplicaron 10% más lento que la línea control. Sin embargo, cuando las células que expresan E5 además expresan Ras^{G12V} o Ras116Y, el tiempo de duplicación se reduce a 25.6 h y 24.4 h respectivamente, lo que denota un comportamiento semejante al observado en las células que sólo expresan Ras^{G12V}. Los resultados también mostraron que la estimulación de las células con EGF provocó que los tiempos de duplicación disminuyeran entre 3% y 6% con respecto a los mismos tiempos de duplicación de las células sin estimulación con EGF. Esta reducción en el tiempo de duplicación fue mucho más evidente en la línea celular E5, ya que logró disminuir hasta un 20% (de 35 a 28 h) su tiempo de duplicación con respecto a las mismas células pero sin estimulación con EGF (Tabla 1). La excepción a este comportamiento fue la línea E5+Ras, ya que al ser estimuladas con EGF, no sólo no disminuyó el tiempo de duplicación, sino que por el contrario, hubo un ligero incremento (3%) con respecto a las mismas células sin estimulación con el mismo factor, lo que sugiere que existe tendencia a la independencia de estas células hacia los factores de crecimiento.

Tabla 1. Características de crecimiento de las diferentes líneas celulares.

Línea celular	Tiempo de duplicación (h)				Densidad de saturación (no. células x10 ³)	
	EGF (-)	%*	EGF (+)	%*	EGF (-)	EGF (+)
pC+pB	31.9		30.3		558	1040
Ras	23.2	72.8%	23.0	76.0%	1630	1670
E7	27.7	86.8%	25.0	82.5%	687	1150
E7+Ras	19.6	61.5%	18.3	60.0%	1515	2055
E5	35.1	110.0%	28.3	93.0%	460.5	879.5
E5+Ras	25.6	80.0%	26.6	88.0%	1575	1335
Ras 116Y	26.4	82.8%	24.8	81.9%	724	1355
E5+Ras 116Y	24.4	76.5%	20.4	67.3%	113	1500

* Los porcentajes expresan la rapidez con que cada línea celular se duplica con respecto al control. Para calcularlo, se tomó como 100% el tiempo de duplicación de la línea control pC+pB con y sin estimulación con EGF .

7.5 Grado de transformación y crecimiento en agar suave

Además de las curvas de crecimiento, cada una de las diferentes líneas celulares fueron sembradas en agar suave para determinar su grado de transformación, ya que como se sabe, las células epiteliales normales requieren una superficie a la cual adherirse para poder multiplicarse, por lo que son incapaces de crecer en agar suave, a diferencia de las células transformadas que son capaces de crecer sin adherirse (anchorage-independent growth).

En la Tabla 2 se resume la información del conteo de las colonias formadas en agar por las diferentes líneas celulares después de 15 días en ausencia o presencia de EGF. Los resultados de los focos de transformación en las líneas celulares sin estimulación con EGF muestran que cuando alguno de los oncogenes de HPV16 se expresa solo, el grado de transformación es bajo como se aprecia en las líneas celulares E7 y E5 que sólo forman 3 y 4 veces más focos que el control respectivamente. Por otro lado, la sola expresión del oncogén *ras*^{G12V} (línea Ras) es altamente transformante, ya que tiene la capacidad de formar hasta 37 veces más focos que la línea control. De esta forma, se esperaría que al expresar a *ras*^{G12V} junto con uno de los oncogenes de HPV16, el poder transformante aumente, sin embargo, en las líneas celulares que expresan Ras^{G12V} y los oncogenes de HPV16 se observa un efecto regulador negativo de la transformación por parte de estos últimos: la línea celular E7+Ras sólo forma 9 veces más focos de transformación que el control (4 veces menos que la línea Ras), mientras que la línea E5+Ras formó 20 veces más focos de transformación que el control, es decir, sólo 1.8 veces menos focos que la línea celular Ras.

Cuando las líneas celulares fueron estimuladas con EGF durante la formación de focos de transformación se observó que la línea celular Ras forma un alto número de focos de transformación (22 veces más que el control), sin embargo, la línea celular que formó más focos fue E7+Ras (26 veces más que el control). En este caso puede observarse el poder aditivo de los oncogenes *ras*^{G12V} y *E7* para llevar a cabo la transformación celular. No obstante, debe notarse que este efecto no se observa en la línea celular E5+Ras, ya que en este caso la estimulación con EGF solo permitió que los focos de transformación fueran 7 veces más que en el control, además de que los focos se redujeron casi a la mitad con respecto a esta misma línea celular en ausencia del estímulo del EGF (1566 vs. 954 focos).

Por su parte, el mutante dominante negativo Ras116Y inhibe la transformación celular asociada a este oncogén ya que en esta línea celular sólo se observaron 2 veces más focos que el control. Al integrar a E5 al sistema de Ras116Y, la formación de focos fue igual que para Ras116Y, sin importar la ausencia o presencia de EGF. Es decir, en este caso el bloqueo del proceso de transformación por Ras116Y no pudo ser compensado ni por la presencia de E5, ni por la estimulación con EGF (Tabla 2).

Finalmente se pudo observar que en las líneas pC+pB, E7, y E7+Ras, el número de focos de transformación depende de la estimulación con EGF, mientras que para la línea celular Ras este proceso es independiente del factor de crecimiento. Asimismo, en el caso de E5+Ras se observó que el proceso de transformación es independiente de EGF, ya que hay una disminución en el número de focos de transformación en presencia de EGF comparado con las mismas células en ausencia de éste.

Tabla 2. Características de transformación en base a focos de transformación en agar suave.

Línea celular	Focos de transformación (razón*)		Razón EGF +/-
	EGF (-)	EGF (+)	
pC+pB	78 (1)	132 (1)	1.7
Ras	2870 (37)	2910 (22)	1.0
E7	236 (3)	576 (4)	2.4
E7+Ras	740 (9)	3378 (26)	4.6
E5	302 (4)	384 (3)	1.3
E5+Ras	1566 (20)	954 (7)	0.6
Ras 116Y	166 (2)	170 (1)	1.0
E5+Ras 116Y	140 (2)	184 (1)	1.3

* La razón se calculó dividiendo el número de colonias formadas por cada línea celular entre el número de colonias formadas por el control. La razón EGF +/- de la última columna se calculó dividiendo el número de colonias formadas por cada línea celular en presencia de EGF entre el número correspondiente sin EGF.

7.6 Regulación de proteínas de ciclo celular por las oncoproteínas de HPV16 y Ras

Uno de los principales procesos que se modifican durante la transformación celular es definitivamente el ciclo celular, así como las proteínas que lo regulan. Por ello, nos concentramos en identificar los niveles de expresión de proteínas importantes en el inicio

del ciclo celular, incluyendo ciclina A, ciclina D1, pRb, p53, p21^{Waf1} y p27^{Kip1}. Para esta parte, las diferentes líneas celulares fueron estimuladas con EGF a diferentes tiempos (0, 2, 4, 8, 16 y 24 h) con el objetivo de identificar si la presencia de E5 de HPV16 y Ras^{G12V} promueven variaciones en los niveles de estas proteínas, así como comparar diferencias en el ciclo celular con respecto al grado de transformación de las líneas celulares pC+pB (control negativo) y E7+Ras (control positivo de transformación).

En la figura 7 se muestran los niveles de expresión de pRb en el inmunoblot a partir de las diferentes líneas celulares. La línea celular control pC+pB presentó una expresión baja de pRb con respecto a la línea transformada E7+Ras (control positivo), presentando variación de 23% a 78% durante el seguimiento a 24 h; mientras que E7+Ras mostró niveles crecientes de expresión de pRb de hasta 220% hacia las 24 h, observándose una banda mayoritaria de 105 kDa correspondiente al peso molecular de pRb. Al observar la línea E5, se identificó una expresión alta de pRb al tiempo 0 (3 veces más que en el positivo) para luego disminuir y recuperar sólo un 65% hacia las 24 h después de estimulación con EGF. En esta misma línea, se pueden observar 3 bandas de pRb (105, 107 y 110 kDa aproximadamente), lo que no se observó en las líneas celulares control (pC+pB y E7+Ras). Es posible que estas bandas encontradas por arriba de 105 kDa correspondan a fosforilaciones de la misma pRb, ya que los niveles se mantienen altos todo el tiempo. Para la línea Ras, los niveles de pRb se observan altos hacia las 2 h post-estimulación con EGF (166% con respecto al tiempo 0). Además se observó una prominente banda de pRb en 107 kDa (figura 7, pRb, panel superior), pero esta banda desaparece hacia las 24 h, quedando sólo la banda de 105 kDa en altos niveles hacia las 24 h. Al analizar la línea E5+Ras se encontró que los niveles de pRb son muy altos hacia las 8 h (288% con respecto al tiempo 0), pero los niveles se recuperan casi a la normalidad hacia las 24 h. En este caso las bandas de 107 y 110 kDa son semejantes a lo observado cuando sólo se expresa E5. Es interesante destacar que todas las líneas presentan un decremento en la expresión de pRb a las 16 h de estimulación con EGF, siendo más evidente en las líneas E7+Ras y E5+Ras y apenas perceptible en el control pC+pB.

En la misma figura 7 se puede observar en el panel intermedio el inmunoblot que muestra la expresión de p53 en las líneas celulares. En este caso, se esperaba encontrar niveles altos de p53 en la línea pC+pB, ya que en las líneas celulares inmortalizadas este gen siempre está expresándose constitutivamente. Sin embargo, como se denota en

la figura 7 el control pC+pB no presenta niveles observables de p53 y tampoco la línea E7+Ras.

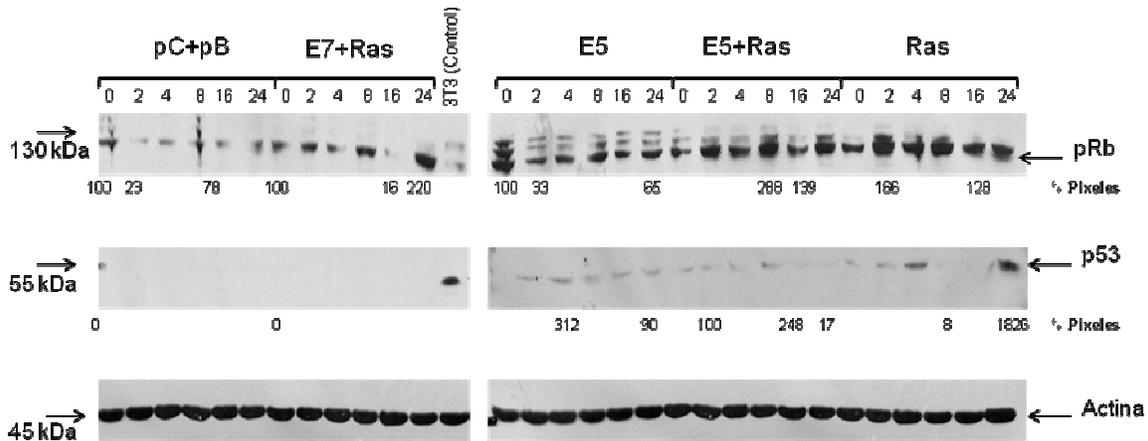


Figura 7. Niveles de proteínas pRb y p53 en las diversas líneas celulares. Inmunoblot para determinar la expresión de pRb (panel superior) y p53 (panel intermedio) a partir de lisados de líneas celulares que expresan diferentes oncogenes. Todas las líneas fueron estimuladas con 25 ng/mL de EGF y seguidas por diferentes tiempos (0, 2, 4, 8, 16 y 24 h). Los números debajo de cada panel indican el porcentaje de pixeles presentes en cada banda el cual se calculó tomando como 100% el t 0 de cada línea celular. El carril "3T3" corresponde a lisado de la línea celular 3T3 que fue usado como control interno del experimento. Actina fue utilizada como control de la carga de proteína en el gel de electroforesis.

Sin embargo, la expresión de p53 puede notarse en células que expresan Ras^{G12V} durante la estimulación con EGF hasta llegar a niveles altos hacia las 24 h después de dicha estimulación (1826% con respecto al tiempo 0), aunque los niveles de p53 fueron semejantes a lo observado en el control interno del sistema que fue lisado de células 3T3 (figura 7, p53, panel intermedio). Al revisar la expresión de p53 en las líneas celulares E5 y E5+Ras los niveles de p53 se encontraron bajos con respecto al control (células 3T3), pero se mantuvieron constantes hacia las 24 h post-estimulación con EGF. La línea celular E5 presenta p53 hasta las 2 h post-estimulación, alcanzando su máximo nivel a las 4 h (312% con respecto al tiempo 0). Se observa un comportamiento semejante para la línea celular E5+Ras, aunque la expresión de p53 fue menor (248% con respecto al tiempo 0) comparada con E5 y Ras por separado. Hay que resaltar el hecho que las

líneas Ras y E5 presentaron un pico en la expresión de p53 a las 4 h de estimulación, mientras que para la línea E5+Ras, este pico se observó hasta las 8 h.

7.7 Regulación de ciclinas por E5 de HPV16 y Ras

Resultados previos de nuestro laboratorio (Pedroza-Saavedra et al., 2010) demostraron que en un sistema donde se sobre-expresa EGFR, la proteína E5 de HPV16 es capaz de regular el ciclo celular manteniendo bajos los niveles de p27^{Kip1}, pero sin alterar las concentraciones de las ciclinas. Sin embargo, se desconoce cómo es que las ciclinas regulan el ciclo celular en un sistema con bajos niveles de EGFR y además en presencia de la oncoproteína Ras. La ciclina A es necesaria para que la célula comience la fase de síntesis de DNA, por lo que la síntesis de esta ciclina inicia cuando se acerca la transición de fase G1 a S (Lodisch et al., 2002) e inmediatamente después de ser sintetizada se transporta al núcleo dónde se asocia con Cdk2 y el complejo Ciclina A/Cdk2 puede fosforilar a diversas moléculas que promueven la síntesis de DNA (Stamatakos et.al., 2010). En el panel superior de la figura 8 se muestra el comportamiento de Ciclina A (cycA) después de estimular a las células con EGF por diferentes tiempos durante 24 h. Debido a que cycA es una proteína que promueve la progresión del ciclo celular, se esperaría encontrarla en mucho mayor cantidad en aquellas líneas más transformadas, y en menor cantidad en células normales. En la línea control pC+pB los niveles de cycA se redujeron al 50% hacia las 8 h post-estimulación con EGF, y los niveles se recuperaron al 80% a las 24 h. Sin embargo, en esta línea celular no se observó la banda de mayor peso molecular que correspondería a la forma fosforilada y activa de cycA. Por su parte, la línea transformada E7+Ras presentó niveles estables de cycA, ya que estos sólo variaron del 100 al 65% con respecto al tiempo 0 y durante las 24 h de seguimiento post-estimulación con EGF se presentó una banda grande de peso molecular mayor, lo que indica que la cycA está fosforilada en esta línea celular. Los niveles de expresión de cycA en las líneas celulares Ras y E5+Ras fueron semejantes a lo observado en la línea E7+Ras, ya que tanto los niveles de cycA como la banda de fosforilación de mayor peso molecular son estables a lo largo de todo el seguimiento post-estimulación con EGF. Es interesante observar las variaciones en los niveles de cycA en la línea E5, donde encontramos un pico de expresión hacia las 2 h post-estimulación (147% con respecto al tiempo 0), sin embargo, hacia las 24 h post-estimulación la expresión decrece hasta alcanzar los valores iniciales. Es evidente que en esta línea los

niveles de *cycA* no fueron tan elevados como los que se observaron en las líneas celulares que expresan Ras^{G12V}.

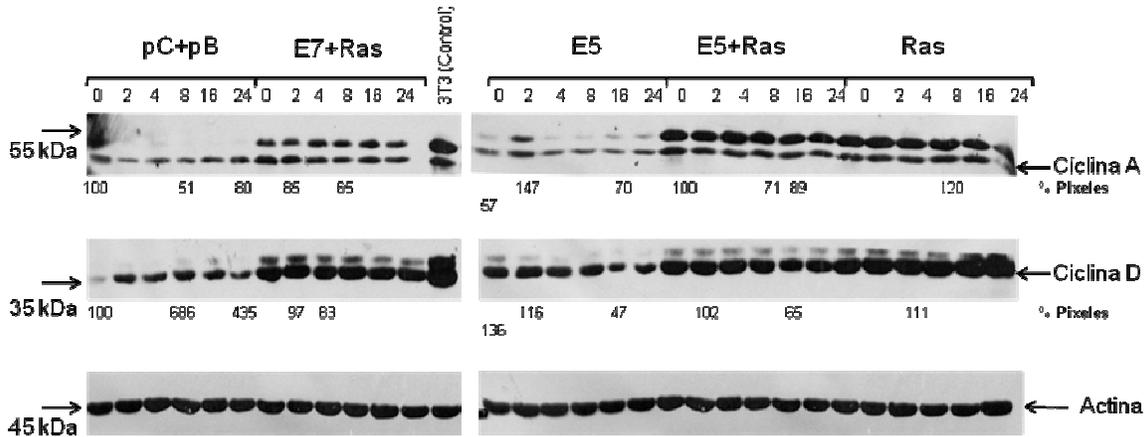


Figura 8. Niveles de proteínas ciclina A y ciclina D₁ en las diversas líneas celulares. Inmunoblot para determinar los niveles de expresión de Ciclina A (panel superior) y Ciclina D (panel intermedio) a partir de lisados de líneas celulares que expresan diferentes oncogenes. Todas las líneas fueron estimuladas con 25 ng/mL de EGF y seguidas por diferentes tiempos (0, 2, 4, 8, 16 y 24 h). Los números debajo de cada panel indican el porcentaje de pixeles presentes en cada banda el cual se calculó tomando como 100% el t 0 de cada línea celular. El carril “3T3” corresponde a lisado de la línea celular 3T3 que fue usado como control interno del experimento. Actina fue utilizada como control de la carga de proteínas en el gel de electroforesis.

Al igual que la *cycA*, la proteína ciclina D (*cycD*) promueve el avance del ciclo celular, ya que al formar complejos ciclina D/Cdk4/6 fosforila a pRb ayuda a la progresión de la fase G1 (Stamatakis et al., 2010). Por lo anterior, presenta un comportamiento similar (figura 8, Ciclina D, panel intermedio): En la línea control pC+pB se observa una expresión débil de *cycD* al tiempo 0, pero aumenta hasta 686% hacia las 8 h post-estimulación con EGF, manteniendo altos niveles hasta las 24 h y observando una ligera banda de *cycD* fosforilada solamente en las horas 8 y 16. En las líneas E7+Ras y Ras la *cycD* se expresa en altos niveles de manera constitutiva, sin embargo, se puede apreciar claramente que los niveles de *cycD* fosforilada decrecen al 50% hacia las 24 h post-estimulación con EGF (figura 8, Ciclina D, panel intermedio). Las líneas celulares que expresan E5 de HPV16 presentan niveles de fosforilación de *cycD* más bajos que los mostrados por las líneas celulares transformadas con Ras^{G12V}, pero tanto E5 como E5+Ras presentan la misma tendencia de niveles altos de *cycD* en el tiempo 0 que luego

decrecen paulatinamente hacia las 24 h post-estimulación, no obstante estas similitudes, es notable que E5 es la línea que muestra los niveles más bajos de cycD.

7.8 Regulación de los inhibidores de ciclinas por E5 de HPV16 y Ras

Las proteínas p21^{Waf1} y p27^{Kip1} son inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, así que a diferencia de la cycA y la cycD detienen la progresión del ciclo celular (Abukhdeir & Park, 2008), por lo que se esperaría que la expresión de estas proteínas fuera reducida en las líneas celulares más transformadas. Es importante notar que la línea control pC+pB (que está inmortalizada) al igual que células del cultivo primario MEF-FvB (de donde fueron originadas todas las líneas celulares, incluyendo a pC+pB) no mostraron niveles detectables de p21^{Waf1} (figura 9, p21, panel superior), lo que sugiere que todas las líneas celulares (incluyendo la línea pC+pB, usado como control negativo de transformación) tienen cierto fondo genético importante. Esto quiere decir que durante el proceso de inmortalización las células perdieron la capacidad de expresar a p21^{Waf1}, sin embargo, esta pérdida no se debe a alguna mutación que impida el reconocimiento de la proteína por el anticuerpo anti-p21^{Waf1}, ya que 2 líneas celulares lograron rescatar la expresión de esta proteína: la línea Ras presenta niveles altos de p21^{Waf1}, alcanzando un nivel máximo (201%) a las 16 h post-estimulación con EGF, mientras que la línea E5+Ras expresa niveles bajos pero constantes de p21^{Waf1} durante las 24 h de seguimiento. En contraste, las líneas E7+Ras y E5 no mostraron niveles detectables de dicha proteína en ningún momento tras la estimulación con EGF, lo que sugiere que estas líneas no pudieron rescatar la expresión de p21^{Waf1}.

Otro regulador del ciclo celular es p27^{Kip1}, el cual inhibe la formación del complejo cycD/Cdk4-6, evitando así que la célula entre a la fase de síntesis de DNA (Abukhdeir & Park, 2008). Sin embargo, el comportamiento de esta proteína en nuestras líneas celulares dista mucho de ser similar al de p21^{Waf1}: por un lado la expresión de p27^{Kip1} fue alta en todas las líneas celulares, pero hay una expresión visiblemente mayor en aquellas líneas que no expresaron p21^{Waf1}, es decir pC+pB, E7+Ras y E5 (figura 9, p27, panel intermedio).

En comparación con las tres líneas anteriores, E5+Ras presenta una expresión más débil de p27^{Kip1}, sin embargo los niveles de esta proteína permanecen constantes hasta las 16 h post-estimulación con EGF donde alcanza el máximo nivel (144%) para luego descender ligeramente en el último punto.

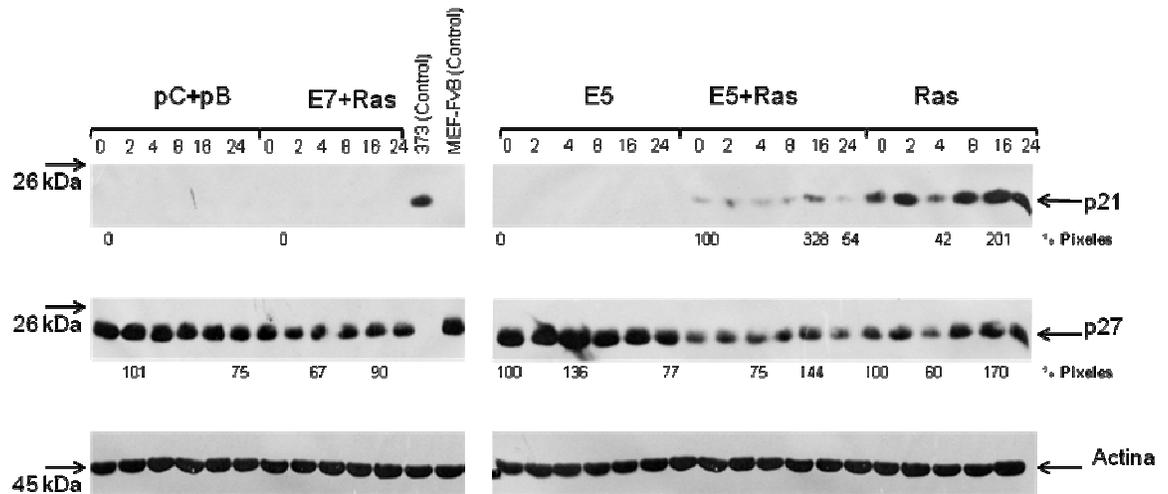


Figura 9. Niveles de proteínas p21 y p27 en las diversas líneas celulares. Inmunoblot para determinar los niveles de expresión de p21 (panel superior) y p27 (panel intermedio) a partir de lisados de líneas celulares que expresan diferentes oncogenes. Todas las líneas fueron estimuladas con 25 ng/mL de EGF y seguidas por diferentes tiempos (0, 2, 4, 8, 16 y 24 h). Los números debajo de cada membrana indican el porcentaje de pixeles presentes en cada banda el cual se calculó tomando como 100% el t 0 de cada línea celular. El carril "3T3" corresponde a lisado de la línea celular 3T3 que fue usado como control interno del experimento. El carril MEF-FvB corresponde a lisados de células MEF-FvB antes de ser immortalizadas y a partir de las cuales se crearon todas las líneas celulares. Actina fue utilizada como control de la carga de proteínas en el gel de electroforesis.

Es obvio que los niveles de p27^{Kip1} en la línea Ras son muy fluctuantes: bajos en los tres primeros puntos de estimulación para luego aumentar desde la hora 8 y alcanzar el máximo nivel 16 horas después de la estimulación con EGF (170%). Estos últimos resultados sugieren que de alguna manera p27^{Kip1} trata de suplir la carencia de p21^{Waf1} para evitar que las células experimenten división descontrolada.

8. DISCUSIÓN

Antes que nada, debemos tomar en cuenta el hecho de que todas las líneas celulares fueron creadas a partir de “pools” y no de colonias aisladas. La aparente desventaja de trabajar con “pools” es que existe la posibilidad de que no todas las células se hayan transfectado correctamente, es decir, no se tiene la certeza de que todas las células expresen el/los gen/es de interés. También es probable que aunque los genes hayan sido transfectados, la expresión de éstos se pierda o disminuya con los pases que se les hagan a las células. Obviamente, esto puede suponer repercusiones en la interpretación de los resultados ya que la expresión de los genes transfectados pudiera variar entre los diferentes experimentos.

Para evitar el sesgo anterior, en todos los experimentos realizados, sólo usamos células con no más de 10 pases a fin de asegurar (en la medida de lo posible) que las células tuvieran la misma expresión de los oncogenes que la verificada con los RT-PCRs y la inmunoprecipitación-inmunoblot al inicio de los demás experimentos (figuras 3, 4 y 5).

Sin embargo, usar “pools” puede ser considerado también como una ventaja, ya que precisamente al tener células con diferentes grados de expresión, podríamos conseguir un modelo más parecido a los sistemas *in vivo* donde no todas las células de un tejido expresan los mismos niveles de proteínas.

Cualquiera que sea el caso, sabemos que esta podría ser considerada como una limitación del presente trabajo.

8.1 Grado de transformación de las líneas celulares que expresan los oncogenes *ras*^{G12V} y E5 de HPV16

El oncogén *ras*^{G12V} fue seleccionado en estos experimentos como control positivo para llevar a cabo la transformación de líneas celulares *in vitro* como ya se ha demostrado ampliamente (Macaluso et al., 2002). Así mismo, se sabe que Ras coopera con E7 de HPV16 en la transformación de fibroblastos de ratón y de queratinocitos (Hamid et al., 2009), por lo que se esperaba que E5 (otro oncogén de HPV) también cooperase con Ras en el inicio de la transformación celular cuando ambos se expresaran simultáneamente en células transfectadas con ambos oncogenes. Sin embargo, los resultados fueron contradictorios, ya que el gen *ras*^{G12V} resultó altamente eficiente para transformar nuestra línea celular parental (fibroblastos de ratón FvB) como se refleja en la formación de

numerosos focos de transformación (22 veces más que el control). De manera similar, y de acuerdo a los reportes que indican que **E5** de HPV16 tiene un débil poder transformante (Venuti & Campo, 2002), este oncogén fue capaz de formar algunos focos de transformación (3 veces más que el control) en la línea celular parental. No obstante, cuando ambos oncogenes se expresaron en la misma línea celular (E5+Ras) la actividad de ambos no sólo no sinergizó, sino que fue inhibitoria para el proceso de transformación, ya que se observó una disminución en el número de focos de transformación (3 veces menor con respecto a la línea Ras), por lo que estos hallazgos nos sugieren que en lugar de que las propiedades oncogénicas de **E5** y *ras*^{G12V} interactúen para potenciarse mutuamente, en algún punto la actividad oncogénica de ambas proteínas se ve bloqueada.

Se sabe que Ras participa en la cascada de señalización generada por EGFR y transducida por MAPK (Tsai & Chen, 2003; Alberts et al., 2002), pero cuando este proto-oncogén muta a Ras^{G12V}, la proteína se encuentra activa constitutivamente, de manera que todo estímulo por arriba de esta cascada es intrascendente para la transducción de señales (Crespo & León, 2000). Por su parte, también es sabido que E5 de HPV16 estimula la actividad del EGFR y es a través de esta vía que ejerce su poder transformante, de manera que el sistema se hace dependiente de este factor de crecimiento (Straight et al., 1993). Fue interesante identificar que al expresar las proteínas virales (E5 y E7) el sistema se vuelve dependiente de factor de crecimiento; sin embargo, en el caso de E7+Ras la transformación se potencia (740 vs. 3378 colonias en agar +/-EGF), mientras que en el caso de E5+Ras la transformación disminuye (1566 vs. 954 colonias en agar +/-EGF). En dicha línea, E5 amplifica la señal mitogénica de la cascada de señalización de EGFR y Ras^{G12V} y de alguna manera permite que este camino de señalización se vuelva independiente de EGFR, por lo que es probable que alguna proteína blanco en el camino de señalización del EGF esté siendo utilizada por ambas oncoproteínas provocando que su oncogenicidad disminuya en vez de potenciarse. El hecho de que Ras^{G12V} tenga una mutación en el sitio de unión a GTP que hace que permanezca activa, y por tanto interactuando con Sos y activando Raf de manera constitutiva (Ayllón & Rebollo, 2000), sugiere que la molécula por la que compiten E5 y Ras pudiera estar al inicio de la cascada de señalización, es decir, algún regulador de Ras, Sos o incluso Raf.

Ras es una proteína que para ser funcional debe de sufrir 3 modificaciones post-traduccionales en la caja CAAX que se encuentra localizada en las posiciones 186-189 (C es cisteína, A es un aminoácido alifático como leucina, isoleucina o valina y X representa metionina, serina, leucina o glutamina) (Macaluso et al., 2002). Estas modificaciones comienzan en el aminoácido 186 (siempre cisteína) e incrementa la hidrofobicidad de la región C-terminal de Ras, lo cual es de suma importancia para su localización y anclaje en membrana, lo que es indispensable para su función. Las modificaciones post-traduccionales de Ras comienzan con farnesilación en C-186, seguida por metilación en la misma posición y finalmente palmitoilación de residuos de cisteína en la región 165-186 (Gutierrez et al., 1989). Se sugiere que la farnesilación es necesaria para la asociación de Ras con el retículo endoplásmico y aparato de Golgi y procesos posteriores para transportación a la membrana (Hancock et al., 1989). Por su parte, está ya documentado que uno de los efectos de E5 en fibroblastos es modificar el pH interno de diferentes organelos, lo que provoca alteración del tráfico vesicular dentro de la célula; por lo que una posibilidad es que aunque *ras*^{G12V} fue correctamente transfectado, la proteína expresada no es funcional debido a que E5 de HPV16 impide la correcta interacción entre la proteína Ras y el retículo endoplásmico y/o aparato de Golgi, debido a retraso en el tráfico vesicular de la célula, de manera que Ras no puede sufrir las modificaciones postraduccionales necesarias, o estas se vean retrasadas en los diferentes compartimentos celulares y se ha observado que estas modificaciones en el extremo carboxilo son importantes para que pueda mediar transformación (Pérez-Sala & Rebollo, 1999). En este mismo escenario de tráfico vesicular alterado por E5 de HPV16, es también posible que la composición de los rafts presentes en la superficie de la membrana plasmática también esté alterada, y estudios recientes demuestran que disrupciones en estos rafts pueden afectar la habilidad de H-Ras para activar Raf (Ayllón & Rebollo 2000).

Además de los GEFs (factor de intercambio de nucleótidos de guanina, por sus siglas en inglés) y GAPs (proteínas activadoras de GTPasas, por sus siglas en inglés), existen otras proteínas que pueden regular la función de Ras, como la familia de proteínas Sprouty, que han sido identificadas como inhibidores altamente conservados de la vía de señalización de Ras/MAPK. Sprouty contiene un dominio llamado Spred que es capaz de unirse a Raf y Ras, inhibiendo así cualquier señalización mediada por estas moléculas. Además, Sprouty 1 puede unirse a Grb2, evitando la cascada de señalización de Ras/MAPK (Torii et al., 2004). También se ha demostrado que la interacción *in vitro* de

Ras y Raf no es suficiente para estimular la actividad cinasa de esta última, lo que indica que se necesitan otras moléculas para la completa activación de Raf, posiblemente proteínas de la familia 14-3-3 o algunos fosfolípidos (Pérez-Sala & Rebollo, 1999). Por lo que de acuerdo a nuestros resultados es posible que E5 de HPV16 pudiera estar compitiendo por alguna de estas proteínas blanco de Ras.

8.2 Análisis de proteínas que regulan el ciclo celular

La progresión del ciclo celular es controlada por Cdk's (quinasas dependientes de ciclinas, por sus siglas en inglés), que para ser activadas deben unirse con ciclinas, y formar complejos capaces de fosforilar diversos efectores para que las células se dividan y completen el ciclo celular. Como se describió en la sección de resultados, se observó una alta expresión de *cycD* en las líneas celulares más transformadas (E7+Ras y Ras), lo cual concuerda con lo encontrado en diversos tumores humanos en los que se ha encontrado sobre expresión de *cycD* (Stamatikos et al., 2010). Para que la *cycD* funcione es necesario que se asocie con Cdk 4 ó 6 y estos complejos son específicos para que la célula pueda pasar de la fase G1 a la fase S. La principal función de los complejos *cycD/Cdk4/6* es la fosforilación de pRb para promover la transición del ciclo celular de la fase G1 hacia la fase S. De este modo, los complejos *cycD/Cdk4/6* permanecen en núcleo durante la fase G1, y conforme la célula entra en fase S, la *cycD* es exportada del núcleo hacia el citoplasma para ser degradada. Modelos experimentales recientes afirman que mutaciones que interfieren con la exclusión del núcleo de los complejos *cycD/Cdk4* (que pueden alterar tanto el tráfico como la proteólisis de dicha ciclina) son responsables de disparar el potencial oncogénico de la *cycD* (Kim & Diehl, 2009; Stamatikos et al., 2010). Además, también se ha demostrado que la *cycD* puede cooperar con Ras para transformar fibroblastos murinos, ya que la sobreexpresión de esta ciclina hace que células fibroblásticas quiescentes tengan una mayor respuesta al factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), lo que lleva a un aumento de la progresión del ciclo celular y activación de ERK2 (Tashiro et al., 2007). Tal vez esta cooperación *cycD*-Ras pueda explicar cómo la línea celular E5+Ras tiende a presentar una capacidad oncogénica mayor que la demostrada por la línea E5, pero no tan alta como la de la línea E7+Ras.

Las ciclinas promueven la progresión del ciclo celular, sin embargo hay otras moléculas cuya principal función es frenar el ciclo celular, una de ellas es pRb. Esta proteína detiene el ciclo en fase G1 y evita que la célula transite hacia la fase S. Cuando

está activa, se encuentra hipofosforilada y puede unirse al factor de transcripción E2F, evitando así que se transcriban diversos genes relacionados con la división celular. Sin embargo, cuando es fosforilada por el complejo *cycD/Cdk4/6*, pRb se vuelve inactiva y se separa de E2F dejándolo libre para que pueda promover la transcripción de genes requeridos para la progresión a fase S (Stamatikos et al., 2010)

Dado que la principal función de la *cycD* es fosforilar pRb, se ha encontrado que la sobreexpresión de *cycD* induce hiperfosforilación de pRb (Tashiro et al., 2007), lo que concuerda con nuestros resultados en donde observamos una gran expresión de pRb hiperfosforilado en las líneas transformadas con los oncogenes **E5** y **ras** comparadas con el control, a excepción de E7+Ras en donde E7 secuestra a pRb del sistema, lo que permite la liberación de E2F y la entrada al ciclo celular (Hamid et al., 2009). Sin embargo, a pesar de una alta fosforilación de pRb en la línea E5, el grado de transformación de estas células es reducido comparado con lo observado en las líneas transformadas Ras y E7+Ras, lo que puede sugerir que tal vez la hiperfosforilación de pRb sea uno de los marcadores iniciales de transformación celular, pero no suficiente para indicar la desregulación total del ciclo celular.

Además de pRb, existen otros supresores del ciclo celular que actúan inhibiendo a las Cdks y pueden dividirse en 2 grupos: La familia INK4 que inhibe específicamente a las Cdk4 y Cdk6, y la familia CIP que inhibe un amplio espectro de Cdks e incluye entre otras proteínas a p21^{Waf1} y p27^{Kip1}, que pueden asociarse con el complejo *cycA/Cdk2* y *cycD/Cdk4/6* respectivamente, y en ambos casos se inhibe la fosforilación de pRb, induciendo arresto del ciclo celular en fase G1 y en fase S (Abbas & Dutta, 2009).

p53 es otra proteína supresora de tumores sumamente importante que detiene la transición de la fase G1 a la S en caso de daño en el DNA, para lo cual promueve la expresión de p21^{Waf1} y así inhibir la fosforilación de pRb como se menciona arriba. Dado que p21^{Waf1} contiene 2 elementos de respuesta a p53 (Yong-Sam et al., 2010), la expresión de p21^{Waf1} es dependiente de la de p53.

Debido a lo anterior, la expresión tan baja de p53 en las líneas E5+Ras, Ras y E5, así como la ausencia de esta proteína en la línea E7+Ras y la línea control (donde se supone que esta proteína supresora de tumores funciona normalmente) es completamente imprevista. Cuando se analiza la expresión de p21^{Waf1} a pesar de encontrar un comportamiento similar, es decir, nula expresión de p21^{Waf1} en las líneas

control, E5 y E7+Ras, se puede apreciar mayor expresión en las línea Ras y E5+Ras, lo cual concuerda con estudios que demuestran que Ras oncogénico es capaz de activar la expresión de $p21^{Waf1}$ independientemente de la presencia de p53 al inducir la unión del factor de transcripción E2F1 a elementos *cis* del gen **$p21^{Waf1}$** favoreciendo así su transcripción (Abbas & Dutta, 2009). También se ha encontrado que la transcripción de **$p21^{Waf1}$** es activada por receptores nucleares como el receptor de retinoides, de vitamina D y andrógenos (Abbas & Dutta, 2009), lo que podría explicar la mayor expresión de $p21^{Waf1}$ independientemente de p53.

Sin embargo, aparentemente esta carencia de $p21^{Waf1}$ está siendo reemplazada por la expresión de $p27^{Kip1}$, ya que la expresión de esta proteína es mayor justo en las líneas celulares más carentes de $p21^{Waf1}$. Este comportamiento es lógico, ya que cuando $p27^{Kip1}$ se localiza en núcleo también puede inhibir complejos ciclina/Cdk, y a pesar de que la activación de Ras induce regulación negativa de $p27^{Kip1}$ (Ayllón & Rebollo 2000), también se ha observado que la expresión de $p27^{Kip1}$ es controlada por efectores de otras vías de señalización como AKT y PI3K (Martin et al., 2005). Sin embargo, también hay evidencia de que $p27^{Kip1}$ adquiere propiedades tumorigénicas cuando se transloca a citoplasma debido a una hiperfosforilación por diferentes tipos de cinasas (Lee & Kim, 2009).

En este punto es de suma importancia notar que las células inmortalizadas a partir de las cuales se hizo la transfección, no expresan $p21^{Waf1}$, lo cual habla de un fondo genético que está alterando incluso al control negativo, lo cual podría ayudar a explicar la ausencia de p53 y expresión tan baja de $p21^{Waf1}$ incluso en las líneas no transformadas. Se ha demostrado que el gen **$p21^{Waf1}$** es haplo-insuficiente para la supresión de tumores, es decir, la pérdida de 1 ó 2 copias de este gen incrementa la incidencia de desarrollo de tumores (Engelman et al., 2007; Jackson et al., 2003), a diferencia que el gen **$p27^{Kip1}$** , ya que estudios recientes describen que células de epitelio mamario con genotipo **$p27^{Kip1+/-}$** son más susceptibles a la tumorigénesis inducida por oncogenes, mientras que aquellas células con genotipo **$p27^{Kip1-/-}$** son más resistentes a la transformación debido a un impedimento en el funcionamiento del complejo *cycD/Cdk4* (Muraoka et al., 2002). También hay evidencia de que fibroblastos murinos carentes tanto de $p21^{Waf1}$ como de $p27^{Kip1}$ son incapaces de ensamblar adecuadamente los complejos *cycD/Cdk* lo cual es de suma importancia ya que se requiere de una cierta cantidad de estas proteínas para poder formar estos complejos, y así asegurar una adecuada progresión del ciclo celular (Yong-Sam et al., 2010; Pedroza-Saavedra et al., 2010).

Como se puede observar, son diversos los eventos que ocurren en las diferentes líneas celulares creadas, sin embargo, todos apuntan al mismo comportamiento: cuando se expresan por separado, tanto E5 como Ras^{G12V} tienen propiedades transformantes aunque sea en diferentes niveles, sin embargo, cuando ambas proteínas se expresan al mismo tiempo, E5 puede disminuir la capacidad oncogénica de Ras^{G12V}.

9. CONCLUSIONES

1. E5 de HPV16 regula de manera negativa la capacidad transformante de Ras^{G12V} al ser expresadas simultáneamente en una misma célula.
2. E5 de HPV16 y Ras^{G12V} se encuentran en el mismo camino de señalización asociado a EGF y es posible que compitan por una proteína blanco, lo que provoca una disminución en la transformación celular.
3. Alteraciones en el fondo genético de la línea parental FvB (ausencia de p21^{Waf1}) facilitó la obtención de las líneas celulares transformadas con los oncogenes **E5** de HPV16 y *ras*^{G12V}, pero hizo compleja la interpretación de los resultados.
4. Los complejos de cycD/Cdk4/6 son capaces de secuestrar a p21^{Waf1} y p27^{Kip1}, lo cual puede explicar los altos niveles de ciclina D1 y niveles fluctuantes de p21^{Waf1} y p27^{Kip1} en la mayoría de las líneas celulares.
5. Debido al fondo genético de la línea parental, es probable que la mayor expresión de p27^{Kip1} esté tratando de compensar la ausencia de p21^{Waf1}.
6. Es claro que **E5** de HPV16 puede contrarrestar la transformación celular inducida por el oncogén *ras*^{G12V} cuando se expresan al mismo tiempo, lo cual puede indicarnos que el papel de E5 durante la infección por HPV tal vez no sea desacoplar el ciclo celular (como lo hacen E6 y E7); sino precisamente evitar que la célula experimente una replicación descontrolada e inestabilidad genómica ya que estos eventos evitan que el propio virus concluya su ciclo vital.
7. Nuestra teoría es que E5 se expresa justamente en los estadios tempranos de la infección por HPV aumentando los estímulos mitogénicos para asegurar que la célula hospedera se replique lo suficiente para mantener el genoma viral pero evitando que E6 y E7 dañen en demasía a la célula hospedera. Sin embargo, cuando el genoma del virus se inserta en el genoma del hospedero, el marco de lectura de **E5** se pierde, por lo que la expresión de esta proteína desaparece, de manera que la expresión descontrolada de E6 y E7 causa alteraciones tanto en el ciclo de replicación como en otros eventos celulares, por lo que la célula termina transformándose. Es decir, es probable que **E5** de HPV, más que un

oncogén, es necesario para asegurar la correcta culminación del ciclo de vida del virus del papiloma humano.

10. PERSPECTIVAS

1. Realizar citometría de flujo en las diferentes líneas celulares creadas para analizar cambios en las fases del ciclo celular.
2. Inocular ratones con las diferentes líneas celulares para evaluar su capacidad de inducir tumores.
3. Evaluar si la pérdida de expresión de p21^{Waf1} y p53 se dá a nivel mRNA mediante Northern blot.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas T and Dutta A. p21 in cancer: Intricate networks and multiple activities. *Nature Review Cancer*. 2009; 9:400-414.
2. Abukhdeir A and Park B. p21 and p27: Roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2008; 10:e19.
3. Alberts, Bary, Lewis, Raff, Roberts, Watson. *Biología Molecular de la célula*. Tercera edición. Ediciones Omega. España, 2002.
4. Ault K. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infectins in the female genital tract. *Infectious Disease in Obstetrics and Gynecology*. 2006:1-5.
5. Ayllón V and Rebollo A. Ras induced cellular events (Review). *Molecular Membrane Biology*. 2000; 17:65-73.
6. Berger K, Barriga F, Lacey M, Turek L, Zamba G, Domann F, Lee J and Klingelutz A. Cervical keratinocytes containing stably replicating extrachromosomal HPV16 are refractory to transformation by oncogenic H-ras. *Virology*. 2006; 356:68-78.
7. Bosch X, Manos M, Muñoz N, Sherman M, Jansen A, Schiffman M, Moreno V, Kurman R and Shah K. Prevalence of Human Papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995; 87:796-801.
8. Bosch X. Cancer cervical: Avances en la prevención y conocimiento de su etiología. *Salud Publica de Mexico*. 2003; 45:s299-s300.
9. Burd E. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Review*. 2003; 16:1-17.
10. Cheah P and Looi L. Biology and pathological association of the human papillomaviruses: a review. *Malaysian Journal of Pathology*. 1998; 20:1-10.
11. Cobo F, Concha A and Ortiz M. Human Papillomavirus (HPV) type distribution in females with abnormal cervical cytology. A correlation with histological study. *The Open Virology Journal*. 2009; 3:60-66.
12. Conway MJ and Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *Journal of Dental Research*. 2009; 4:307-317.
13. Cooper and Hausman . *La célula*. Tercera edición. Editorial Marbán. España, 2003
14. Cox T. The development of cervical cancer and its precursors: what is the role of human papillomavirus infection?. *Current Opinion in Obstetrics Gynecology*. 2006; 18 (Suppl):S5-S13.
15. Crespo P and León J. Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000; 57:1613-1626.

16. De Villiers EM, Fauquet C, Broker T, Bernard HU and Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324:17-27.
17. DiMaio D. Papillomavirus E5 proteins. Book_Garcea/DiMaio_0387365222_Proof2_November 10, 2006. 175-188
18. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*. 2006; 110:525-541.
19. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*. 2005; 32S:S7-S15.
20. Engelman R, Jackson R, Coppola D, Wharton W, Cantor A and Pledger J. Loss of Nuclear p21^{Cip1/WAF1} during neoplastic progression to metastasis in γ -irradiated p21 hemizygous mice. *Experimental Molecular Pathology*. 2007; 82:234-244.
21. Fehrmann F and Laimins L. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 2003; 22:5201-5207.
22. Flores Y, Bishai D, Shah K, Lazcano-Ponce E, Lörincz A, Hernandez M, Ferris D and Salmerón J. Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in Mexico. *Salud Publica de Mexico*. 2008; 50:49-58.
23. Franco E, Duarte-Franco E and Farenczy A. Cervical cancer: Epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Canadian Medical Association Journal*. 2001; 164:1017-1025 .
24. Funk J, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B and Galloway D. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes & Development*. 1997; 11:2090-2100.
25. Geisen C and Kahn T. Promoter activity of sequences located upstream of the human papillomavirus types 16 and 18 late regions. *Journal of General Virology*. 1996; 77:2193-2200.
26. Gutierrez L, Magee A, Marshall C and Hancock J. Post-translational processing of p21^{ras} is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis. *European Molecular Biology Organization Journal*. 1989; 8:1093-1098.
27. Hamid A, Brown C and Gatton K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009; 7: 1-7.
28. Hancock J, Magee A, Childs J and Marshall C. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*. 1989; 57:1167-1177.
29. Heidcamp W. *Cell Biology Laboratory Manual*. Biology Department, Gustavus Adolphus College. 2009.

<http://homepages.gac.edu/~cellab/chpts/chpt12/ex12-10.html>

http://www.cervantesvirtual.com/servlet/SirveObras/23587396543414962965679/005092_1.pdf

30. http://www.healthsystem.virginia.edu/uvahealth/adult_gyneonc_sp/cervical.cfm
31. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m014ssa24.html>
32. Hwang S, Lee D, Kim J, Seo T and Choe J. Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a pRb independent manner. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277:2923-2930.
33. Jackson R, Engelman R, Coppola D, Cantor A, Wharton W and Pledger J. p21^{Cip1} Nullizygoty increases tumor metastasis in irradiated mice. *Cancer Research*. 2003; 63:3021-3025.
34. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E and Forman D. Global cancer statistics, 2011. *Cancer Journal for Clinicians*. 2011; 61:69-90.
35. Kabsch K and Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAILS and FasL mediated apoptosis in HaCat cells by different mechanisms. *Journal of Virology*. 2002; 76:12162-12172.
36. Kabsch K, Mossadegh N, Kohl A, Komposch G, Schenkel J, Alonso A and Tomakidi P. The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL and FasL mediated Apoptosis in human keratinocyte raft cultures. *Intervirology*. 2004; 47:48-56.
37. Kim JK and Diehk AJ. Nuclear cyclin D₁: An oncogenic driver in human cancer. *Journal of Cell Physiology*. 2009; 220:292-296.
38. Lacruz P. Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolaou a Bethesda 2001). *Revista Española de Patología*. 2003; 36:5-10.
39. Landro M, Dalbert D, Picconi M, Cúnoe N, González J, Vornetti S, Baán G, Mural J, Basiltti J, Teyssié A and Alonio L. Human Papillomavirus and mutated H-ras oncogene in cervical carcinomas and pathological negative pelvic lymph nodes: A retrospective Follow-up. *Journal of Medical Virology*. 2008; 80:694-701.
40. Lee EW, Lee MS, Camus S, Ghim J, Yang MR, Oh W, Ha NC, Lane D and Song J. Differential regulation of p53 and p21 by MKRN1 E3 ligase controls cell cycle arrest and apoptosis. *European Molecular Biology Organization Journal*. 2009; 28:2100-2113.
41. Lee J and Kim SS. The function of p27^{Kip1} during tumor development. *Experimental and Molecular Medicine*. 2009; 41:765-771.

42. Lodish, Berck and Zipursky. Biología celular y molecular. Cuarta edición. Editorial Panamericana. España, 2002.
43. Longworth M and Laimins L. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. Microbiology and molecular biology reviews. 2004; 68:362-372.
44. Lundes R, Pichardo G, Escamilla G and Hernández-Valencia. Estudio de la citopatología del cérvix. Perinatología y Reproducción Humana. 2009; 23:12-17.
45. Macaluso M, Russo G, Cinti C, Bazan V, Gebbia N and Russo A. Ras family genes: An interesting link between cell cycle and cancer. Journal of cellular physiology. 2002; 192:125-130.
46. Maki H, Fujikawa-Adachi K and Yoshie O. Evidence for a promoter-like activity in the short non-coding region of human papillomaviruses. Journal of General Virology. 1996; 77:453-458.
47. Mammas I, Zafiropoulos A, Koumantakis E, Sifakis S and Spandidos D. Transcriptional activation of H-ras oncogenes in human cervical cancer. Gynecologic Oncology. 2004; 92:941-948.
48. Martín A, Odajima J, Hunt S, Ortega S, Malumbres M and Barbacid M. Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27^{Kip1} and p21^{Cip1}. Cancer Cell. 2005; 7:591-598.
49. Mourón S, Abba M, Güerci A, Gómez M, Dulout F and Golijow C. Association between activated K-ras and c-erb2 oncogenes with high-risk and low-risk Human Papillomavirus types in preinvasive cervical lesions. Mutation Research. 2000; 469:127-134.
50. Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. Journal of Clinical Virology. 2000; 19:1-5.
51. Muroaka R, Lenferink A, Law B, Hamilton E, Brantley D, Roebuck R and Arteaga C. ErbB2/Neu-Induced, Cyclin D1-Dependent Transformation is Accelerated in p27-Haploinsufficient Mammary Epithelial Cells but Impaired in p27-Null Cells. Molecular and Cellular Biology. 2002; 22:2204-2219.
52. Ogiso Y, Gutierrez L, Wrathall LS, Lu YY, Blair DG, Clanton DJ, Hwang YW, ShihTY. *trans*-dominant suppressor mutations of the *H-ras* oncogene. Cell growth & differentiation. 1990; 1:217-224.
53. Pedroza-Saavedra A, Lam E, Esquivel-Guadarrama F and Gutierrez-Xicotencatl L. The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-receptor

- signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27^{Kip1}. *Virology*. 2010; 400:44-52.
54. Pérez-Sala D and Rebollo Angelita. Novel aspects of Ras proteins biology: regulation and implications. *Cell Death and Differentiation*. 1999; 6:722-728.
 55. Pyeon D, Pearce S, Lank S, Ahlquist P and Lambert P. Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression. *PLoS Pathogenesis*. 2009; 5:1-9.
 56. Ruiz H. Factores Predictivos en el diagnóstico y la evolución de las neoplasias cervicales intraepiteliales (CIN). Universidad de Granada y Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. 1997
 57. Sang W and Joo S. Human Papillomavirus Type 16 E5 protein is a therapeutic target. *Yonsei Medical Journal*. 2006; 47:1-14.
 58. Scoumanne A. and Chen X. Protein methylation: a new regulator of the p53 tumor suppressor. *Histology and Histopathology*. 2009; 23:1143-1149.
 59. Stamatakos M, Palla V, Karaiskos I, Xiromeritis K, Alexiou I, Pateras I and Kontzoglou K. Cell cyclins: triggering elements of cancer or not?. *World Journal of Surgical Oncology*. 2010; 8:111-119.
 60. Stoler M. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: A model for carcinogenesis. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2000; 19:16-28.
 61. Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ and McCance DJ. The E5 protein of Human Papillomavirus Type 16 Transforms Fibroblasts and Effects the Downregulation of the Epidermal Growth Factor Receptor in Keratinocytes. *Journal of Microbiology*. 1993; 67:4521-4532.
 62. Swan D, Vernon S and Icenogle P. Celular proteins involved in papillomavirus-induced transformation. *Archives of Virology*. 1994; 138:105-115.
 63. Syrjänen K, Kataja V, Yliskosky M, Chang F, Syrjänen S and Saarikosky S. Natural History of Cervical Human Papillomavirus Lesions does not Substantiate the Biologic Relevance of the Bethesda System. *Obstetrics & Gynecology*. 1992; 79:675-682.
 64. Tashiro E, Tsuchiya A and Imoto M. Functions of cyclin D₁ as an oncgen and regulation of cyclin D₁ expression. *Cancer Science*. 2007; 98:629-635.
 65. Torii S, Nakayama K, Yamamoto T and Nishida E. Regulatory Mechanisms and Functions of ERK MAP Kinases. *Journal of Biochemistry*. 2004; 136:557-561.

66. Tsai TC and Chen SL. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Archives of Virology*. 2003; 148:1445-1453.
67. Venuti and Campo. The E5 protein of papillomaviruses. *Human papillomaviruses*, D.J McCane (editor). 2002, 143-156.
68. Vorvick L and Storck S. Enciclopedia Médica: Displasia cervical. Actualizado en 17/04/2009. Biblioteca Nacional de Medicina e Institutos Nacionales de Salud de EE.UU
69. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*. 1999; 189:12-19.
70. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). *Human Papillomavirus and Related Cancers in Mexico. Summary Report 2010*.
71. Woodman C, Collins S, Young L. The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. *Nature Review Cancer*. 2007; 7:11-22.
72. Yong-Sam J, Yingjuan Q and Xinbin C. Examinations of the expanding pathways for the regulation of the p21 expression and activity. *Cell Signal*. 2010; 22:1003-1012.