

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del virus del papiloma humano.

Descritos en 1933, los primeros papilomavirus fueron relacionados a la aparición y persistencia de neoplasias de piel benignas (verrugas) en el conejo. Después de algún tiempo, las verrugas se convirtieron en malignas, sugiriendo que los papilomavirus podrían estar asociados al cáncer. Desde entonces, se han descrito otros papilomavirus asociados a verrugas benignas en otras especies incluyendo la humana. Los papilomavirus ganaron notoriedad a principios de la década de 1980 cuando se descubrió que algunos tipos de papilomavirus humanos (HPV por sus siglas en inglés: human papillomavirus) estaban asociados al cáncer cervical, una de las más amplias formas de cáncer alrededor del mundo. A la fecha, más de 100 genotipos de HPV han sido identificados [Figura 1], de los cuales un pequeño número, los de alto riesgo (HPVs 16, 18, 31 y 33) están causalmente asociados con el cáncer cervical. Otro conjunto de HPVs llamados de mediano riesgo han sido identificados en tumores cervicales y otras lesiones malignas de la región anogenital en hombres y mujeres (HPVs 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 70). El número de nuevos tipos de HPV aislados de papilomas benignos anogenitales y del tracto nasofaríngeo es significativamente bajo (HPVs 3, 32, 72, 73), mientras que la mayoría causa una variedad de lesiones benignas tales como verrugas (HPVs 5, 6, 11, etc.)^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7}.

El grupo de investigación pionero del Dr. H. zur Hausen publicó a mediados de los 80's fuertes evidencias de que dos tipos de HPV (16 y 18) eran detectados en cáncer cervical. Desde entonces se han venido realizando intensas investigaciones en torno a estos tipos de HPVs,

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

aunque gran parte de éstas se han enfocado en el HPV tipo 16 (HPV-16), debido a que éste tiene un mayor potencial oncogénico que el HPV tipo 18 (HPV-18), como lo demuestran distintos estudios en los que el 99.7 % de los carcinomas cervicales son HPV positivos, de los cuales cerca de un 50% se les ha detectado HPV-16 ^{8, 9, 10}.

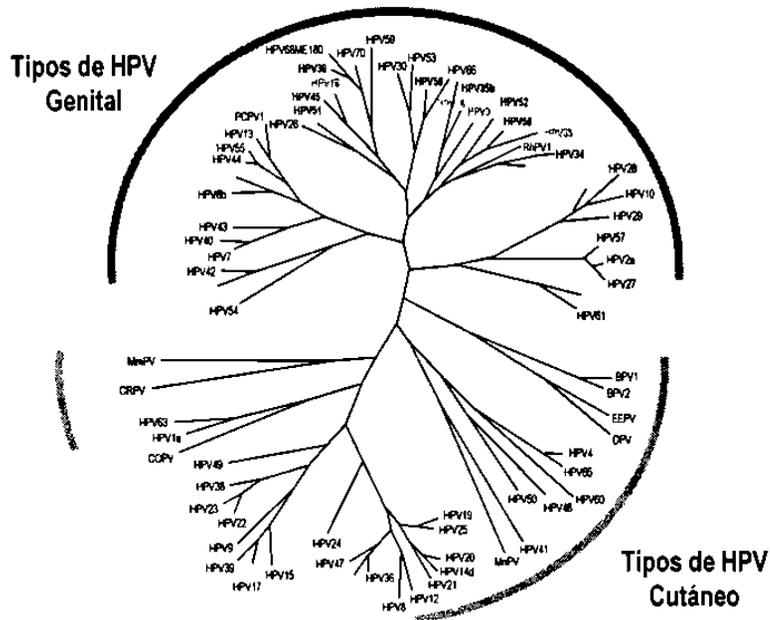


Figura 1. **Árbol filogenético de los HPV.** Se realizó alineando el gen E6 de los papilomavirus mediante análisis parsimony, y se observa la agrupación de los virus de alto, mediano y bajo riesgo (HPV tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 45, 51, 56, 58), lo que va directamente relacionado con su capacidad oncogénica. (Tomado de Myers et al, 1997).

Los papilomavirus son parte de la familia *papillomaviridae* de virus tumorales de DNA. A diferencia de otros papovavirus (por ejemplo los poliomavirus o el virus SV40), todos los genes de los papilomavirus son codificados en una de las dos hebras de DNA, utilizando tres marcos de lectura abierta (ORFs) y remoción diferencial de intrones para la expresión individual de cada gen. Como consecuencia, la expresión de los papilomavirus está caracterizada por un gran arreglo de RNAs codificados por diferentes genes. En papilomas animales (por ejemplo BPV-1 en el ganado, CRPV en el conejo), los transcritos tempranos y tardíos se originan de varios promotores, mientras que los transcritos de HPV comienzan a partir de uno o dos promotores ¹¹.

Todos los papilomavirus exhiben tropismo extremo por las células epiteliales ^{12, 13}. Aunque el mecanismo de la infección no está completamente entendido, la actividad génica viral

depende en gran parte de la interacción de factores de transcripción celulares específicos con la región reguladora viral conocida como la región de control larga (LCR) ¹⁴. La infección con papilomavirus normalmente resulta en la hiperproliferación celular huésped, y en ciertos tipos puede permitir la transformación e inmortalización. Lo anterior se debe a que los papilomavirus expresan dos o más proteínas que transitoriamente alteran el ciclo celular y estimulan la división celular, afectando al mismo tiempo los mecanismos celulares para la inhibición del crecimiento. Para una infección productiva, los papilomavirus requieren células diferenciadas terminalmente. Esta característica biológica del papilomavirus ha impedido la total reproducción de su ciclo de vida en condiciones de laboratorio, debido a la carencia de un modelo altamente eficiente de epitelio terminal diferenciado *in vitro*. Sin embargo, la mayoría de las diferentes etapas del ciclo de vida del papilomavirus han sido establecidas usando estrategias de biología molecular e ingeniería genética ¹⁵.

1.2 Estructura del virión.

Los papilomavirus son virus no envueltos de DNA de doble hebra, con un genoma circular de ~8000 pb, con una cápside de 55 nm de diámetro compuesta de 72 capsómeros de la proteína L1 que están arreglados en la superficie en forma de un icosaedro. Las partículas de papilomavirus [Figura 2] están constituidas por los productos de los genes L1 (proteína mayor de la cápside) y L2 (proteína menor de la cápside). Los capsómeros están localizados en cada uno de los 12 vértices y son pentavalentes (es decir, cada uno está rodeado por cinco capsómeros adyacentes). Los 60 capsómeros restantes son hexavalentes (cada uno adyacente a seis capsómeros). L1 es la región más conservada entre los papilomavirus¹⁶.

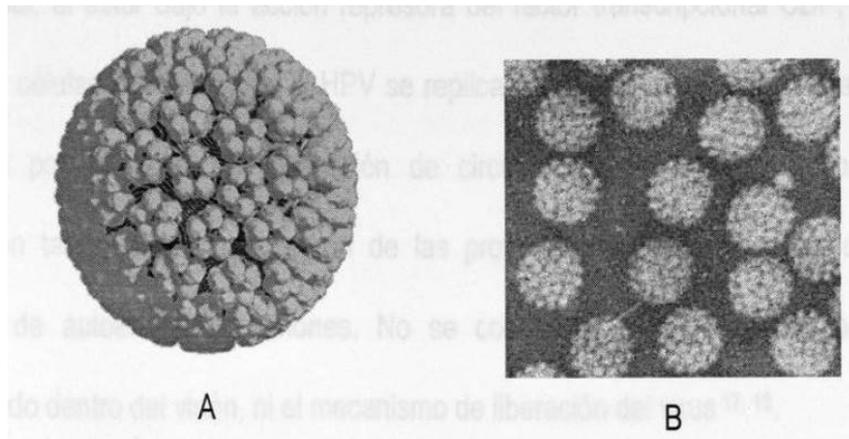


Figura 2. **Estructura del HPV A)** Dibujo tridimensional de la estructura del HPV, en el que se distingue perfectamente la conformación de la proteína L1 en la cápside viral. **B)** Fotografía en microscopio electrónico del HPV. (Tomado de Baker *et al*, 1991).

1.3 Ciclo viral.

El ciclo viral del papilomavirus comienza con la infección de la célula huésped. Este proceso es ampliamente desconocido, pero es aceptado que no hay un receptor blanco específico en la membrana celular. Cuando el DNA viral es liberado dentro del núcleo, numerosos factores de transcripción celulares interactúan con URR, comenzando entonces la transcripción de los dos genes tempranos transformantes del HPV-16: E6 y E7 [Figura 6]. Después de la traducción, las proteínas transformantes productos de éstos genes interactúan con los reguladores celulares antioncogénicos p53 y pRB, alterando el ciclo celular e inhibiendo el arresto de la división celular. Concomitantemente, la expresión de los genes virales E1 y E2 regulan la replicación y transcripción del DNA viral. En los HPVs genitales, la proteína E2 reprime la transcripción temprana del propio virus, interactuando con sitios blancos específicos dentro de URR y desplazando a la maquinaria de transcripción basal. En los papilomavirus animales y HPVs cutáneos, la proteína E2 activa varios promotores, incluyendo a los promotores tardíos. No está claro si la proteína E2 estimula la transcripción tardía de los HPVs. El genoma de los papilomavirus se replica a bajo nivel (~20 copias por célula) en un modo de replicación "theta" en

epitelio basal, al estar bajo la acción represora del factor transcripcional CDP, abundante este epitelio. En células diferenciadas, el HPV se replica en un alto número de copias (> 100 copias por célula) por el modo de replicación de círculo rodante. En esta etapa, comienza la transcripción tardía con la producción de las proteínas de la cápside, las cuales tienen la capacidad de autoensamblar viriones. No se conoce como el DNA del papilomavirus es empaquetado dentro del virión, ni el mecanismo de liberación del virus ^{17, 18}.

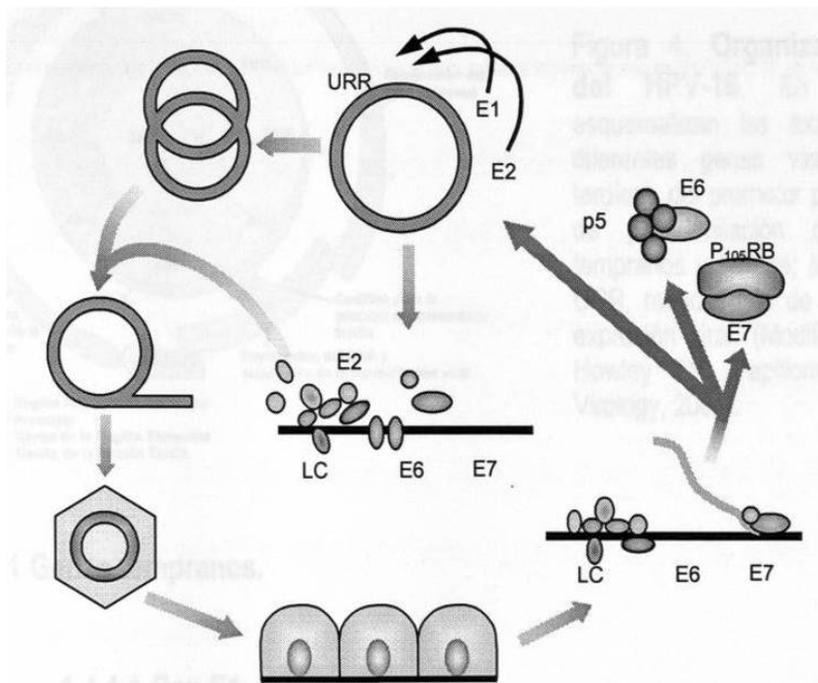


Figura 3. Modelo del ciclo viral de los HPV genitales. El virus infecta células basales del epitelio genital. En la fase temprana del ciclo se producen las oncoproteínas E6 y E7, las cuales interactúan con los reguladores celulares p53 y pRB, respectivamente, inactivándolos. Más tarde se producen las proteínas E1 y E2, esenciales para la replicación del genoma; asimismo la proteína E2 regula negativamente los genes E6 y E7 con la finalidad de permitir la diferenciación celular necesaria para la síntesis de las proteínas tardías y ensamble viral (Tomado de Alvarez-Salas *et al*, 1995).

1.4 Organización genómica de los papilomavirus.

La estructura genómica es una característica muy conservada entre los papilomavirus, pudiéndose distinguir tres regiones: la región temprana, la región tardía y la región reguladora río arriba, [Figura 3]. En la región temprana (E) reside el potencial de transformación e inmortalización del HPV. Esta contiene genes reguladores involucrados en la replicación viral,

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

transcripción de proteínas y transformación celular. La región tardía (L) contiene genes que codifican para las dos proteínas de la cápside viral. La región reguladora río arriba (URR) contiene todos los elementos reguladores cis actuantes necesarios para la transcripción del HPV, incluyendo el promotor temprano, además del origen de replicación (ori) ¹⁸.

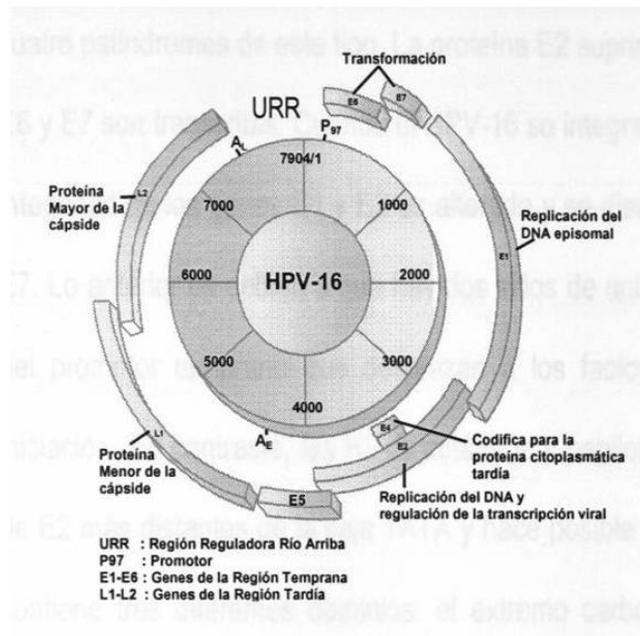


Figura 4. Organización Genómica del HPV-16. En esta figura se esquematizan las localizaciones de los diferentes genes virales (tempranos y tardíos), del promotor p97 y de las señales de poliadenilación de los transcritos tempranos y tardíos; además de la región URR, responsable de la regulación de la expresión viral. (Modificado de Lowy DR, Howley PM. Papillomaviruses. En Field Virology, 2001).

1.4.1 Genes tempranos.

1.4.1.1 Gen E1.

El gen E1 codifica la proteína más grande del HPV (68-76 kDa). E1 es una fosfoproteína nuclear esencial para la replicación viral que interactúa con E2 y se une con gran afinidad al origen de replicación localizado en LCR. Las funciones de E1 están asociadas con la replicación del DNA y consisten de actividad de helicasa ATP-dependiente e interacción física con numerosos componentes de la maquinaria de replicación del DNA celular (p. e. primasa y DNA polimerasa alfa) ^{19, 20, 21, 22, 23}.

1.4.1.2 Gen E2.

El gen E2 codifica una proteína altamente fosforilada de 48 kDa. E2 regula la replicación y transcripción del DNA viral a través de la interacción con secuencias parcialmente palindrómicas 5'- ACCN₆G(G/T)T-3' localizadas en LCR. En HPV-16 y HPV-18 hay cuatro palíndromes de este tipo. La proteína E2 suprime al promotor a partir del cual las proteínas E6 y E7 son transcritas. Cuando el HPV-16 se integra dentro del genoma de la célula huésped, la integridad de los genes E1 y E2 es alterada y se disminuye la represión de la expresión de E6 y E7. Lo anterior es debido a que hay dos sitios de unión de E2 localizados cerca de la caja TATA del promotor temprano que desplazan a los factores de transcripción basales, e inhiben la iniciación. En contraste, los HPVs cutáneos y papilomavirus animales tienen sus sitios de unión de E2 más distantes de la caja TATA y hace posible a E2 activar la transcripción. La proteína E2 contiene tres diferentes dominios: el extremo carboxilo es un dominio de unión al DNA y el extremo amino con capacidad de activación transcripcional, los cuales están separados por un dominio "bisagra" rico en prolina.^{2, 24, 25, 26, 27, 28, 29}

1.4.1.3 Gen E4.

El gen E4 codifica una proteína de 10-34 kDa, la cual parece que cumple una función en la liberación del virus al inducir el colapso de la red de citoqueratina, aunque *in vivo* no se ha visto que cumpla esta función³⁰.

1.4.1.4 Gen E5.

El gen E5 codifica una pequeña proteína hidrofóbica comúnmente encontrada en compartimentos de membrana, incluyendo al aparato de Golgi^{31, 32, 33}. En BPV-1,

ésta es una proteína celular transformante de 7 kDa, la cual parece ejercer su efecto a través de la estimulación de receptores de factor de crecimiento, vía transducción de señal³⁴. Esta se une y activa al receptor PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), y también se une a la subunidad ATPasa de la proteína poro de 16 kDa y a la proteína relacionada a adaptina de 120 kDa de fibroblastos. Este es uno de los marcos de lectura abiertos (ORFs) más pobremente conservados entre los papilomavirus^{35, 36, 37, 38, 39, 40}.

1.4.1.5 Genes E6 y E7.

Los genes E6 y E7 codifican para proteínas pequeñas nucleares de entre 16-19 y 10-14 kDa, respectivamente^{41, 42}. Ambos genes se encuentran y expresan en todas las células que contienen HPV^{43, 44}. El producto de E6 de HPVs de alto riesgo (HPV-16 y HPV-18) interactúa con la proteína reguladora antioncogénica p53 y la proteína E6AP de la ruta de degradación de proteínas de ubiquitina, permitiendo la degradación de la propia p53^{45, 46, 47}. La proteína E6 de tipos de HPV de bajo riesgo (HPV-6 y HPV-11) no induce la degradación de p53, lo cual está correlacionado con su débil potencial transformante^{48, 49, 50}. La ausencia de la proteína p53 funcional hace a la célula altamente susceptible de daño a su DNA y previene la activación de la apoptosis mediada por p53. Es notable que la mayoría de los tumores cervicales HPV-positivos tienen p53 de tipo silvestre, mientras que los tumores cervicales HPV-negativos contienen p53 mutado.^{51, 52, 53, 54, 55}

El gen E6 de HPV-16 tiene dos sitios de empalme alternativo responsables de la producción de dos proteínas adicionales llamadas E6*I y E6*II. Sin embargo, sólo la proteína E6 completa tiene la capacidad de interactuar con p53 y debido a ésto, es la única isoforma de este gen con relevancia clínica. La proteína E6 contiene cuatro motivos Cys-X-X-Cys formando

estructuras de dedos de zinc similares a los presentes en varios factores de transcripción. Sin embargo, el papel de E6 en la transcripción del HPV no ha sido claramente establecido. ^{58, 56, 57}.

El gen E7 de HPV-16 es expresado como parte de un transcrito primario policistrónico que también contiene a E6. Como ambos genes transformantes son expresados a partir del mismo RNAm, este transcrito ha venido a ser un blanco para terapias de inhibición de genes. La proteína E7 contiene dos motivos Cys-X-X-Cys que también generan dos dedos de zinc y presentan funciones reguladores transformantes y transcripcionales similares a la proteína E1A de adenovirus y al antígeno T grande de SV40 ^{58, 59}. Aunque E7 puede por sí solo transformar e inmortalizar células *in vitro* ⁶⁰, la transformación e inmortalización de las células epiteliales requiere de la proteína E6 ^{61, 62}. Al igual que E1A y el antígeno T grande, E7 controla el ciclo celular por interacción con el regulador antioncogénico P₁₀₅RB ^{63, 64} y otras proteínas asociadas a RB, tales como P₁₀₇ y P₁₃₀, desplazando al factor de transcripción E2F ⁶⁵. Esto resulta en la activación derregulada del ciclo celular en la célula infectada. ^{3, 57, 58, 66, 67}.

1.4.2 Genes tardíos.

1.4.2.1 Genes L1 Y L2.

El gen L1 codifica para la proteína mayor de la cápside de 56-60 kDa. L1, la más antigénica de las proteínas de papilomavirus, está débilmente fosforilada y no se une al DNA ⁶⁸. ⁶⁹; puede ser glucosilada y formar puentes disulfuro, pero las implicaciones de estos cambios no están claras todavía. L1 está relativamente bien conservada entre todos los papilomavirus, tiene la capacidad de autoensamblaje y es la molécula predominante en la cápside viral ^{70, 71}. Por su parte el gen L2 codifica para la proteína menor de la cápside de 49-60 kDa, la cual está altamente fosforilada y se une al DNA. A diferencia de L1, L2 no se autoensambla. ^{72, 73}.

1.4.3 Región reguladora río arriba.

La región reguladora río arriba (URR por sus siglas en inglés: upstream regulatory region), también referida como región de control larga (LCR) o región no codificante (NCR), abarca desde la región de la terminación del gen L1 hasta la primera metionina del gen E6. URR es la región menos conservada entre los papilomavirus. Ésta contiene el promotor temprano y varios motivos reguladores transcripcionales, incluyendo elementos para la familia AP-1, YY1, NF-1/CTF, Oct-1, TEF-2, KRF-1 y Sp1 y los sitios de unión para el regulador E2 viral. El origen de replicación también está localizado en URR, normalmente centrado entre dos sitios de unión de E2 ^{20, 30, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80}.

1.4.3.1 Características de la región URR.

La longitud de URR varía entre 800 a 1000 pb para los diferentes tipos de HPVs. Esta región se encuentra localizada directamente río arriba de los genes E6 y E7. Los genes E1, E2 y E5 se encuentran localizados río abajo de los genes E6 y E7. La región URR puede ser dividida en tres partes: la región 5', el segmento central y la región 3' [Figura 4]. La transcripción del RNA comienza a partir de un promotor situado en la región 3' del URR, directamente río arriba del gen E6. Este promotor es referido como P₉₇ para el HPV-16 y P₁₀₅ para HPV-18. El promotor consiste de una caja TATA y un sitio de inicio de la transcripción que es regulado por una región potenciadora localizada en la región central y 3' del URR. A éste se le unen factores de transcripción celulares. La región 3' de URR también contiene dos sitios de unión para los factor de transcripción viral E2 y los factores celulares SP1 y YY1. El origen de replicación contiene un sitio de unión para la proteína viral E1. ^{58, 82, 81}.

genes E6 y E7 ⁸⁵. Por otro lado, algunos datos indican que la proteína E2 de HPV-16 y HPV-18 activan al promotor URR ⁵⁸. Probablemente estas diferencias son causadas por la síntesis de RNAm empalmados alternativamente del gen E2, permitiendo la formación de formas incompletas de la proteína E2. El dominio N-terminal transactivador de la proteína E2 puede interferir con el potencial activador de la proteína E2 completa. ⁵⁸.

Entre los numerosos factores celulares que podrían interactuar con URR, hay unos que se ha visto que son esenciales para la manifestación de los genes E6 y E7. El primero es el factor transcripcional AP-1. Esta proteína dimérica compleja consiste de una copia de cada miembro de los productos de la familia de genes *jun* y *fos*. Los URR de HPV-16 y HPV-18 contienen tres y dos sitios de unión para AP-1, respectivamente. Los sitios de unión para AP-1 regulan la actividad transcripcional de URR ^{58, 78, 86}. Otro importante regulador de URR, el factor transcripcional YY1, funciona como un activador y un represor de la transcripción, dependiendo del tipo viral, tipo celular y la actividad de otros factores de transcripción, especialmente de AP-1 ^{86, 87}. Es posible que a otro grupo de sitios se les una C/EBP (Proteína de Unión al Aumentador – CCAAT). Los factores de este tipo se pueden asociar no solo con la región correspondiente del DNA en el URR, sino por su unión a otros factores celulares. La principal función de este grupo de genes es regular la diferenciación celular y activar genes de varias citocinas. El factor de transcripción SP1 puede interactuar con un elemento de la caja GC y su sitio está directamente localizado río abajo de la caja TATA. Este factor es esencial para la transcripción del genoma viral ^{88, 89}.

Entre los factores de transcripción del grupo de receptores nucleares, dos clases (receptores de hormonas esteroides y receptores de retinoides y hormonas tiroideas) tienen sitios de unión dentro del URR. Los GRE pertenecen al grupo de receptores de hormonas esteroides. Un sitio responsable de la unión de glucocorticoides (GRE) está localizado en la región 3' entre

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

los sitios de unión AP-1 y Sp1. Ambos tipos de receptores activan la transcripción. Un factor de transcripción específico de queratinocitos, KRF1, se puede unir a AP-1 para la activación transcripcional^{91,90, 91, 92}.

URR también tiene varios sitios de unión para proteínas que contienen el llamado "dominio POU" que se une a la secuencia octamérica ATGCAAAT. Una de estas proteínas (Oct1) reprime al URR de HPV-18, mientras que otra (Epc1) tiene un efecto opuesto. Los factores de la familia NF1 tienen varios sitios de unión en la región de un represor constitutivo. Estos sitios tienen una relativa baja afinidad y son necesarios probablemente para la especificidad transcripcional en células epiteliales. Los factores transcripcionales TEF1 y TEF2 tienen cuatro sitios dentro del aumentador de HPV-16 y se piensa que activan al promotor P₉₇^{95, 93, 94}.

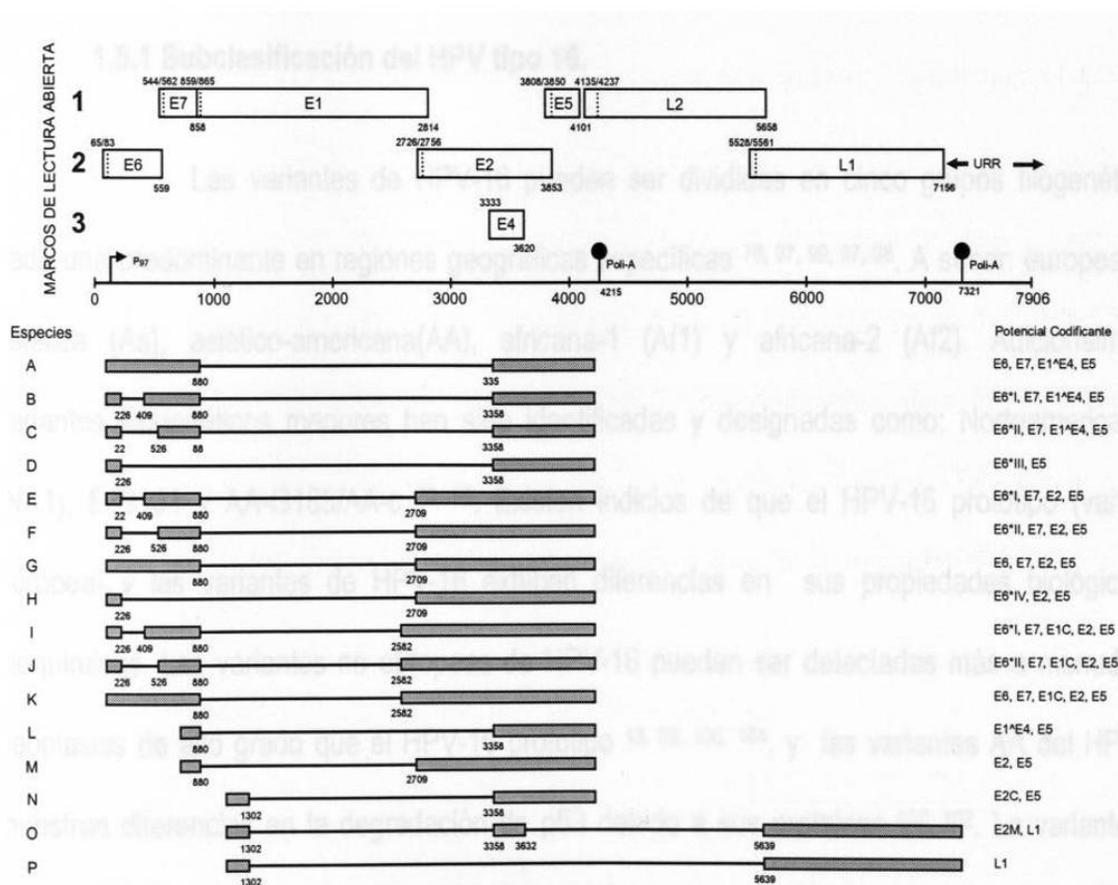


Figura 6. Esquema de los diferentes empalmes alternativos de la expresión del HPV. En este esquema se muestran los diferentes RNAm resultantes de la expresión del HPV, así como los diferentes marcos de lectura se generan (Tomado de Kiri Y and Matsukura T, 1998).

Los factores reguladores de la transcripción de los genes transformantes del HPV mencionados en el párrafo anterior proveen evidencia de que el control transcripcional es complicado y está regulado por numerosos factores que tienen efectos positivos y negativos. Estos no solo se unen a URR, sino que también interactúan con otros factores transcripcionales.

1.5 Clasificación de los HPV.

Los tipos de HPV son definidos por variaciones de secuencia de más de 10% entre sí. La secuencia de nucleótidos en sólo una región del genoma puede ser usada para definir el tipo de HPV y la variante intratipo. Las variantes intratipo varían hasta en un 2% en regiones conservadas del genoma (tales como E1 y L1) y más del 5% en la región URR ^{57, 76, 84, 95, 96}.

1.5.1 Subclasificación del HPV tipo 16.

Las variantes de HPV-16 pueden ser divididas en cinco grupos filogenéticos, cada una predominante en regiones geográficas específicas ^{76, 97, 99, 97, 98}. A saber: europea (E), asiática (As), asiático-americana(AA), africana-1 (Af1) y africana-2 (Af2). Adicionalmente variantes filogenéticas menores han sido identificadas y designadas como: Norteamericana-1 (NA1), E-G131 y AA-G183/AA-c ^{76, 99}. Existen indicios de que el HPV-16 prototipo (variante europea) y las variantes de HPV-16 exhiben diferencias en sus propiedades biológicas y bioquímicas. Las variantes no europeas de HPV-16 pueden ser detectadas más a menudo en neoplasias de alto grado que el HPV-16 prototipo ^{13, 99, 100, 101}, y las variantes AA del HPV-16 muestran diferencias en la degradación de p53 debido a sus proteínas E6 ¹⁰². La variante AA también exhibe una actividad incrementada del promotor p97 comparada con el HPV-16 prototipo, al igual que la variante NA1. Dicha variación en la actividad promotora se atribuye a un cambio nucleotídico de A/C en la posición 7729, la cual le incrementa la potencia tres veces

comparándola con la ejercida por el HPV-16 prototipo ^{31, 84}, por lo cual se le atribuye a este tipo una mayor virulencia en comparación con la variante E.

1.6 Justificación.

Este estudio pretende determinar si los cambios nucleotídicos en la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV-16 y europea del HPV-18 afectan la expresión tisular-específica del potenciador transcripcional. El estudio también persigue corroborar la potencia del promotor de cada variedad en líneas HPV positivas y determinar el efecto inductor de glucocorticoides que interactúan con el potenciador.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construir los vectores de expresión portadores de las regiones URR de interés, dirigiendo la expresión del gen reportero EGFP.
2. Evaluar los niveles de expresión del gen reportero dirigidos por la región URR en diferentes líneas celulares de origen humano.

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Origen de los reactivos

El material plástico utilizado para cultivo bacteriano y extracción de DNA fueron adquiridos de Costar™ (Cambridge, MA, EUA), Falcon™ (Lincoln Park, NJ, EUA) y CEL Associates, Inc. (Pearland, TX, EUA).

Los reactivos utilizados para la preparación de medio de cultivo bacteriano y preparación de soluciones se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (Missouri, MI, EUA).

Las enzimas de restricción empleadas se obtuvieron de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, EUA).

El material plástico utilizado para cultivo celular (frascos, tubos, pipetas desechables y unidades de filtración) fueron adquiridos de Costar™ y Falcon™.

Los reactivos para la preparación de medio de cultivo, así como suero bovino fetal (SBF), tripsina, se adquirieron en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA), Hyclone, Inc. (Logan, UT, EUA) e Invitrogen™ (Carlsbad, CA, EUA), respectivamente. El reactivo LIPOFECTAMINE™ y el reactivo PLUS™ se adquirieron de Invitrogen.

El reactivo Rojo de Clorofenol- β -D-galactopiranosido fue adquirido de Calbiochem® (San Diego, CA, EUA). Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por Invitrogen™.

Los kits Endofree Maxi Plasmid Kit y QIAEX II utilizados fueron de la marca QIAGEN (Valencia, CA, EUA).

3.2 Origen del material biológico

Los plásmidos empleados fueron pBlueScript (STRATAGENE®, Cedar Creek, TX, EUA), pCMV Sport β -Gal (Invitrogen™) y pGREEN lantern-1 (Gibco – BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, EUA). Las líneas celulares SiHa, C33-A y HeLa fueron donadas por el Dr. Patricio Gariglio Vidal del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN; HepG2 por el Dr. Alejandro García Carrancá del Instituto Nacional de Cancerología, México, DF.; HuTu-80, JAR y U87MG por el Dr. José Luis Castrillo Diez (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España); y Huh7 por la Dra. Ana María Rivas Estilla del Laboratorio de Infectología Molecular de la ULIEG.

La cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue empleada en los ensayos de transformación y propagación de los plásmidos recombinantes fue obtenida del cepario de la ULIEG.

3.3 Equipo

Se utilizó una balanza digital Sartorius modelo 1206 MP (Camibh Göttingen, Alemania), una balanza analítica OHAUS modelo AP1105 (Florham Park, Suiza), micropipetas Eppendorf Research (Camibh Göttingen, Alemania), un horno de microondas Goldstar modelo MA-857M, una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C (Camibh Göttingen, Alemania), un microscopio invertido Karl Zeiss (alemania), un lector de placas de ELISA Multiskan EX (Termo Labsystems, Vantaa, Finlandia), un fluorómetro (BIORAD), una campana de flujo laminar (Labconco Co, Kansas City, MO, EUA), un termociclador MJ Research modelo PTC-100 (Watertown, MA, EUA).

La captura de datos y de la tesis en su totalidad se realizó en una computadora SONY VAIO PCG-FXA32. El software utilizado fue el conjunto de programas de Office XP de Microsoft™, CorelDraw Graphics Suite 11, Redasoft Visual Cloning 2000. Para el diseño de

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

iniciadores y análisis de las secuencias de ácidos nucleicos se utilizaron los programas Oligo 4.0, Amplify 1.0, Amplify 2.53 β y DNAstrider 1.3, de la plataforma Macintosh. Para la búsqueda de sitios de unión de factores transcripcionales se utilizó el programa Primer Premier 5™ y la base de datos en línea MatInspector de la compañía Genomatix.

El análisis de los resultados se realizó en el programa estadístico SPSS 11.5 para PC. Para la búsqueda de información se recurrió a la página de Internet del National Center for Biotechnology Information, NIH, MD, EUA.

3.4 Métodos

El trabajo se realizó en tres etapas, como se muestra en la figura 7: 1) Construcción de los vectores de expresión experimentales y sus respectivos controles, 2) evaluación de los niveles de expresión dirigidos por URR en diferentes líneas celulares humanas y 3) análisis y correlación estadística de los resultados obtenidos.

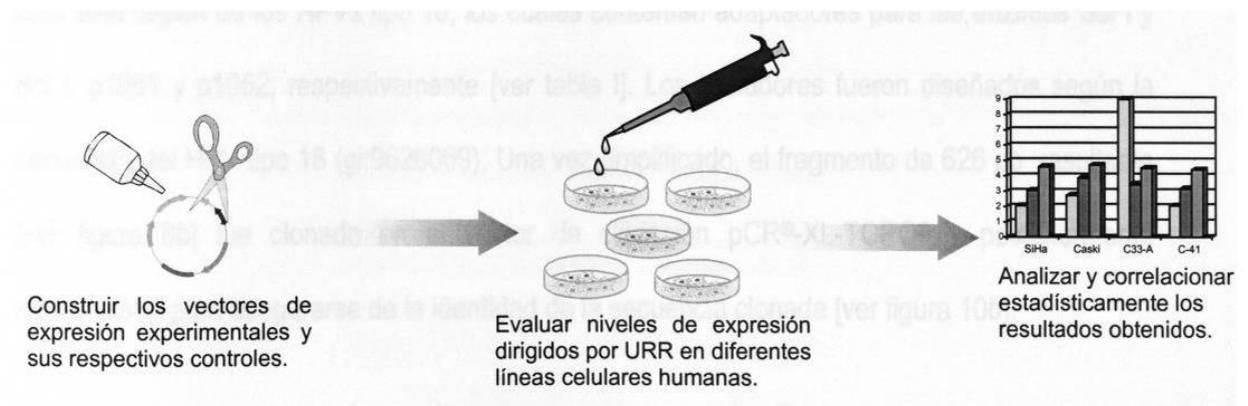


Figura 7. **Estrategia General.** Se indican las tres etapas principales en las que consistió el presente trabajo.

3.4.1 Clonación de las regiones URR del HPV-16 y 18.

Para la obtención de las regiones URR del HPV-16 se partió de biopsias de pacientes con cáncer cervical, a las cuales se les extrajo el DNA. Posteriormente se amplificó la región URR [ver figura 8a] con iniciadores específicos para esta región de los HPV's tipo 16, los cuales contenían adaptadores para las enzimas de restricción *Sal* I y *Bcl* I, respectivamente P971 y P972 [ver tabla I y figura 9]. Los iniciadores fueron diseñados según la secuencia del HPV-16 de referencia ¹¹¹. Una vez amplificados, los fragmentos de 618 pb [ver figura 8a] resultantes fueron clonados en el vector de clonación pBlueScript SK+ por vector T y posteriormente secuenciados, para que a partir de su secuencia se pudiera identificar a las variedades de HPV-16. Para nuestro estudio se seleccionaron las clonas con las variedades europea y asiático-americana [ver figura 10a].

De igual manera, para la obtención de la región URR del HPV tipo 18 se partió de DNA de la línea celular HeLa, a partir del cual se amplificó la región URR con iniciadores específicos para esta región de los HPVs tipo 18, los cuales contenían adaptadores para las enzimas *Sal* I y *Bcl* I, p1051 y p1052; respectivamente [ver tabla I]. Los iniciadores fueron diseñados según la secuencia del HPV tipo 18 (gi:9626069). Una vez amplificado, el fragmento de 626 pb resultante [ver figura 8b] fue clonado en el vector de clonación pCR®-XL-TOPO® y posteriormente secuenciado para asegurarse de la identidad de la secuencia clonada [ver figura 10b].

Tabla I. **Secuencia de los iniciadores utilizados.** En esta tabla se muestran el nombre y la secuencia de los iniciadores diseñados para amplificar las regiones URR de los HPV-16 y 18.

TIPO DE HPV	INICIADOR	SECUENCIA	Tm
16	P971	5'-TTTGCTACGTCGACTTTTTGTTTTAT-3' <i>Sal I</i>	64.4 °C
	P972	5'-TCTTTTGGTGATCAAATGTCTGC-3' <i>Bcl I</i>	66 °C
18	P1051	5'-TGTTTGTGCGACTGGGTGTTGCTTGTTG-3' <i>Sal I</i>	74.9 °C
	P1052	5'-CGCGCCTGATCATTGTGGTGTGTT-3' <i>Bcl I</i>	75.6 °C

Tabla II. **Condiciones de PCR.** En esta tabla se muestran las condiciones de PCR empleadas para la amplificación de las regiones URR, tanto del HPV-16 como del HPV-18.

REACTIVOS	Volumen (1X)
Agua MiliQ	15.35 µl
PCR Buffer II 10X	2.5 µl
MgCl ₂ a 10 mM	2 µl
dNTPs a 100 mM	0.5 µl
AmpliTaq Gold™ a 5 U/µl	0.15 µl
Iniciador 5' a 5 µM	2 µl
Iniciador 3' a 5 µM	2 µl
DNA (~ 100 ng/µl)	0.5 µl
VOLUMEN TOTAL	25 µl

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

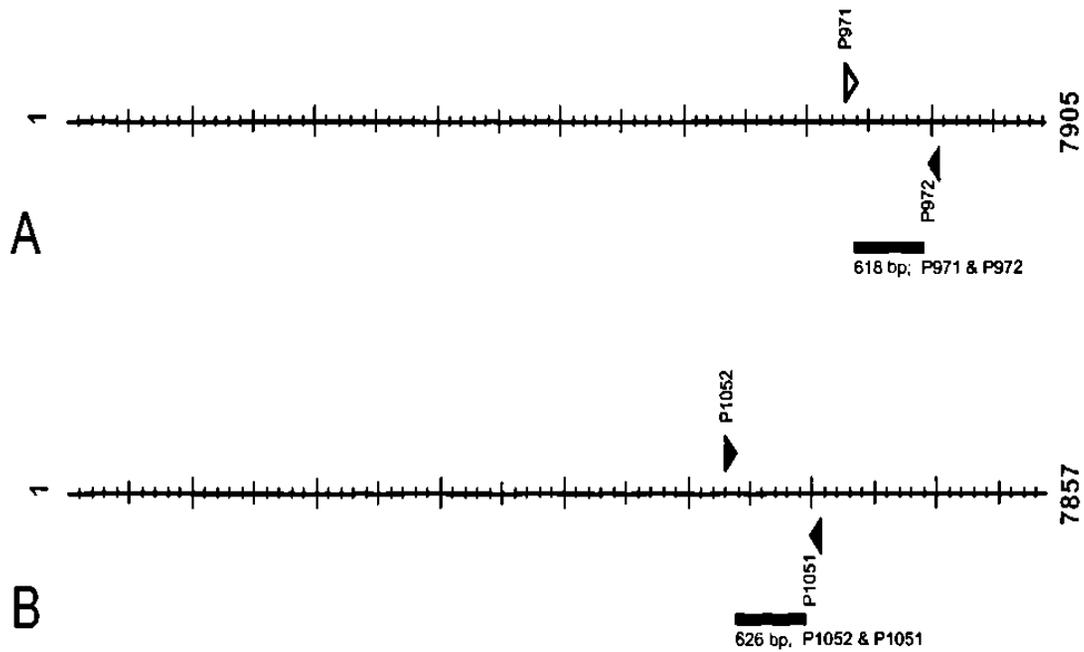


Figura 8. **PCR virtual generada por el programa Amplify 2.53β.** A) Se muestra de manera gráfica el fragmento de 618 pb generado al amplificar la región URR del HPV-16 con los iniciadores p971 y p972. B) De igual manera se muestra de manera gráfica el fragmento de 626 pb generado al amplificar la región URR del HPV-18 con los iniciadores p1051 y p1052.

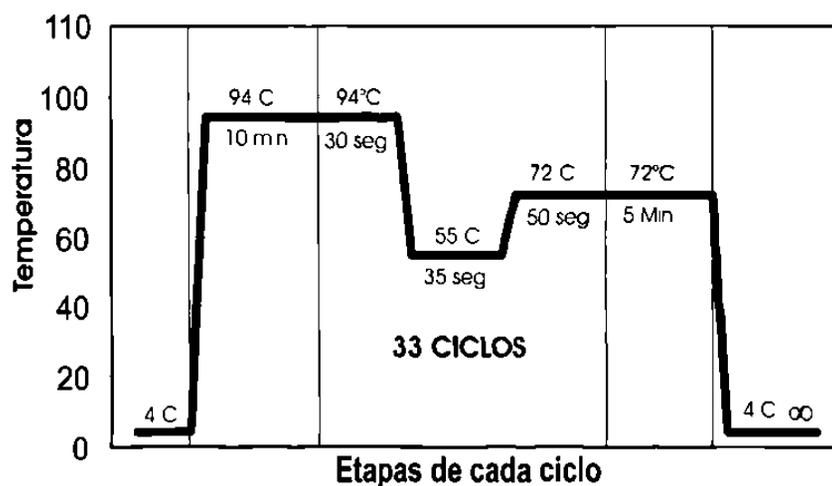


Figura 9. **Programa de temperaturas para PCR de URR.** Se muestra de manera gráfica el programa de temperaturas empleado para la PCR de la amplificación de las regiones URR tanto del HPV-16 como HPV-18.

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

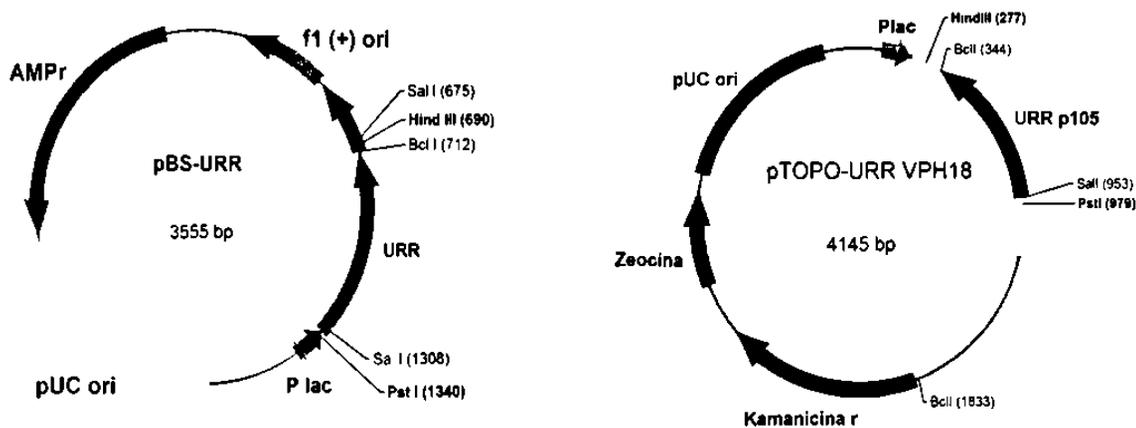


Figura 10. Mapas de restricción de las regiones URR clonadas en los vectores de clonación. **A)** Mapa de restricción de pBlueScript con la región URR del HPV tipo 16 clonada por vector T; en éste se muestran los sitios de restricción empleados para su subclonación en el vector de expresión. **B)** Mapa de restricción de la región URR del HPV tipo 18 clonado en el vector de clonación pCR[®]-XL-TOPO[®], indicando los sitios de restricción utilizados para su subclonación en el vector de expresión.

3.4.2 Construcción de los vectores de expresión

Para la evaluación de la fuerza promotora de las regiones URR se planteó la utilización del gen de la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) como gen reportero y el empleo del vector de clonación pBlueScript como esqueleto plasmídico.

A partir del plásmido pGREEN lantern-1 [figura 11] (el cual consiste del gen EGFP dirigido por el promotor de citomegalovirus y con una señal de poliadenilación de SV40) se obtuvo al gen reportero, el cual se usó para la construcción del plásmido control negativo y de los plásmidos problema. El control positivo fue el propio pGREEN lantern-1.

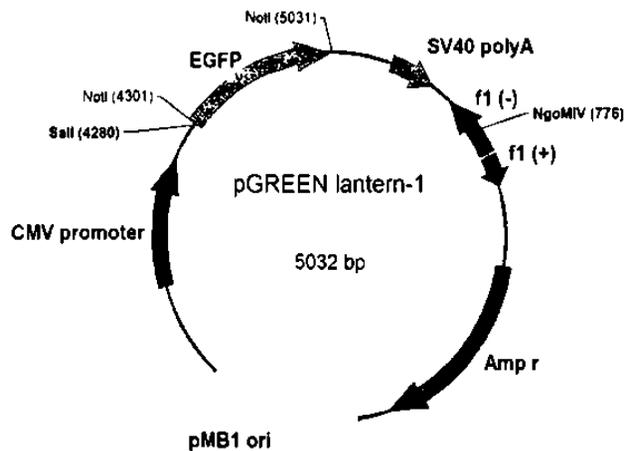


Figura 11. **Mapa de restricción del vector plasmídico pGREEN lantern-1.** En el mapa se muestran los sitios de restricción *Ngo M IV* y *Sal I* empleados para la liberación de EGFP y la secuencia de poliadenilación de SV40. También se muestran los sitios *Not I* con los que fue clonado el gen EGFP.

A continuación se describe la metodología seguida para la construcción del plásmido control negativo y de los plásmidos problema.

3.4.2.1 pLESS-EGFP (control negativo)

Con las enzimas de restricción *Ngo M IV* y *Sal I* se digirió al plásmido pBlueScript SK+, de manera secuencial, lo que generó dos fragmentos: 2615 pb y 346 pb [figura 12]. La reacción de digestión se incubó 12 h a 37°C [ver tablas III y IV], periodo tras el cual se inactivaron las enzimas de restricción por calentamiento a 80°C por 15 minutos. El fragmento de 2615 pb sirvió como esqueleto plasmídico.

Por otra lado el plásmido pGREEN lantern-1 se digirió de manera secuencial con las enzimas *Ngo M IV* y *Sal I* [ver tablas III y IV]. La reacción de digestión se incubó a 37°C por 12 h, periodo tras el cual se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer de corrida TBE 1X, con un voltaje constante de 75 V por un periodo de 1 h. Una vez transcurrido este periodo se tiñó el gel con bromuro de etidio a 2 µg/ml y se identificó la banda correspondiente a 1534 pb

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

(correspondiente al gen EGFP y la secuencia de poliadenilación de SV40) [figura 12], la cual se cortó del gel y se purificó siguiendo las instrucciones del estuche comercial QIAEX II.

Tabla III. Mezcla de digestión preparativa de los vectores pBlueScript SK (+) y pGREEN lantern-1 con la enzima *Sal* I.

Reactivo	Volumen
DNA plasmídico (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	10 μl
Buffer Único de <i>Sal</i> I 10X	5 μl
BSA 10X	5 μl
Enzima <i>Sal</i> I (100 U/ μl)	3 μl
Agua MiliQ	27 μl

Tabla IV. Mezcla de digestión preparativa de los vectores pBlueScript SK (+) y pGREEN lantern-1 con la enzima *Ngo* M IV.

Reactivo	Volumen
DNA plasmídico (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	10 μl
Buffer NEB 4 10X	5 μl
Enzima <i>Ngo</i> M IV (10 U/ μl)	5 μl
Agua MiliQ	30 μl

Una vez purificado el fragmento de interés, se procedió a ligarlo con el esqueleto plasmídico de 2615 pb proveniente de pBlueScript. La ligación se llevó a cabo a $17^{\circ}\text{C} \times 16$ hrs. con T4 DNA ligasa [Tabla V] y posteriormente fueron transformadas a bacterias calcio competentes XL1-Blue, para finalmente estriar en placas petri con medio de cultivo LB agar con ampicilina 0.1 mg/ml, y seleccionar colonias. Tras un posterior análisis con enzimas de restricción, se caracterizaron las clonas resultantes [figura 12] y sus identidades fueron confirmadas por secuenciación parcial.

Tabla V. Mezcla de ligación del esqueleto plasmídico y el gen EGFP .

Reactivo	Volumen
Esqueleto plasmídico <i>Ngo M IV</i> – <i>Sal I</i> (proveniente de pBS) (~ 300 ng)	2 μ l
Inserto EGFP – PoliA <i>Ngo M IV</i> – <i>Sal I</i> (proveniente de pGREEN lantern-1) [~ 300 ng]	8 μ l
Enzima T4 DNA ligasa (NEB)	2 μ l
Buffer de ligación 10X (NEB)	2 μ l
ATP 10 mM (Invitrogen)	2 μ l
Agua MiliQ	4 μ l

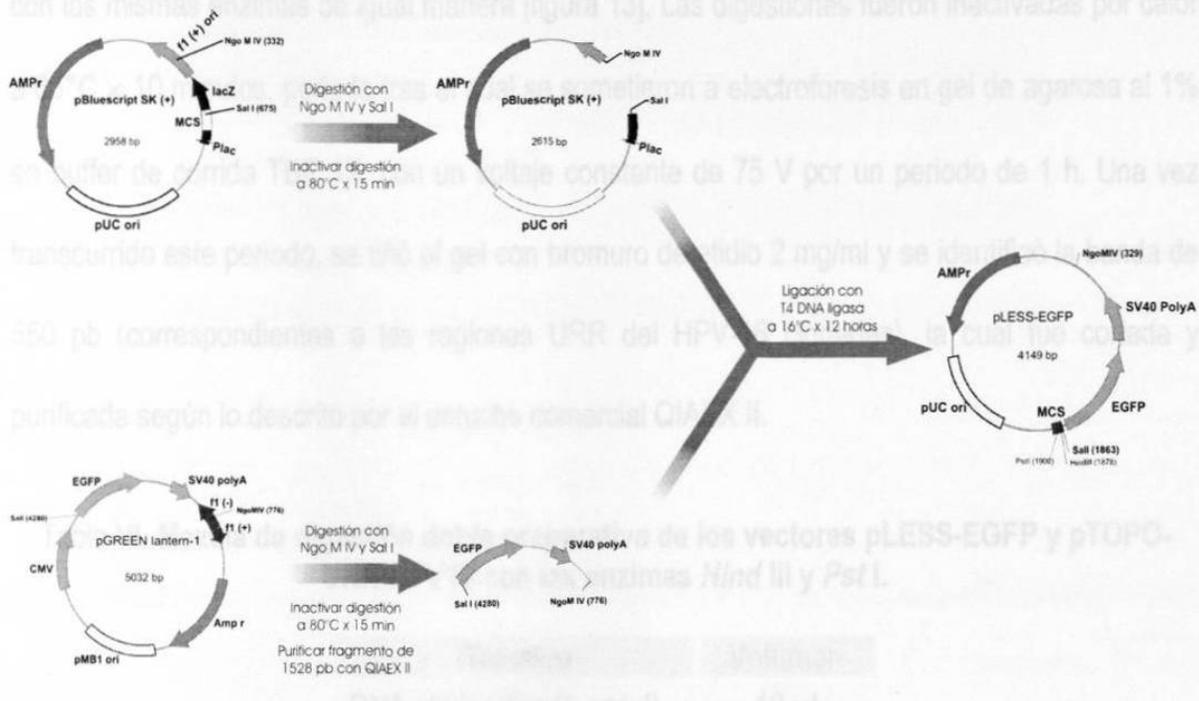


Figura 12. Estrategia para la construcción de pLESS-EGFP. El plásmido pBlueScript SK (+) fue empleado como esqueleto plasmídico. Primeramente pBlueScript SK (+) fue digerido con las enzimas de restricción *Ngo M IV* y *Sal I* en una digestión secuencial. Al mismo tiempo el plásmido pGREEN lantern-1 fue digerido con las mismas enzimas. La banda de 1528 pb correspondiente al gen EGFP y la secuencia de poliadenilación de SV40, fue purificada del gel con QIAEX II. Una vez recuperada la banda de 2615 pb proveniente de la digestión de pBlueScript SK (+) se ligó al fragmento de 1528 pb, para obtener finalmente la construcción pLESS-EGFP.

3.4.2.2 pURRaa – EGFP u pURRe-EGFP (plásmidos problema)

Una vez que se obtuvo la construcción pLESS-EGFP se procedió a la inserción de la región URR de ambas variedades.

El plásmido pLESS-EGFP fue digerido en una doble digestión con las enzimas *Hind* III y *Pst* I [tabla VI] a 37°C por 16 hrs., lo que generó un fragmento de 4127 pb y otro de 22 pb [figura 13]. La digestión fue inactivada por calor a 65°C × 10 minutos. Por otra parte, los plásmidos donde fueron clonadas las regiones URR de las variedades AA y E del HPV-16 fueron digeridos con las mismas enzimas de igual manera [figura 13]. Las digestiones fueron inactivadas por calor a 65°C × 10 minutos, periodo tras el cual se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer de corrida TBE 1X, con un voltaje constante de 75 V por un periodo de 1 h. Una vez transcurrido este periodo, se tiñó el gel con bromuro de etidio 2 mg/ml y se identificó la banda de 650 pb (correspondientes a las regiones URR del HPV-16 clonadas), la cual fue cortada y purificada según lo descrito por el estuche comercial QIAEX II.

Tabla VI. Mezcla de digestión doble preparativa de los vectores pLESS-EGFP y pTOPO-URR-HPV18 con las enzimas *Hind* III y *Pst* I.

Reactivo	Volumen
DNA plasmídico (1 µg/µl)	10 µl
Buffer NEB 2 10X	5 µl
BSA 10X	5 µl
Enzima <i>Hind</i> III (100 U/µl)	3 µl
Enzima <i>Pst</i> I (100 U/µl)	3 µl
Agua MilliQ	24 µl

Una vez purificados los fragmentos de interés se procedieron a ligarlos directamente con una porción de la digestión de pLESS-EGFP sin purificar, para que por competencia se generaran las clonas de interés. Las ligaciones se llevaron a cabo con T4 DNA ligasa a 17°C por

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

16 hrs [figura 13]. Posteriormente, las clonas fueron introducidas en bacterias calcio competentes XL1-Blue y estriadas en placas petri con medio de cultivo LB agar con Ampicilina 0.1 mg/ml, siendo incubadas a 37°C por 16 hrs. Finalmente se seleccionaron colonias, las cuales tras un posterior análisis, se caracterizaron con enzimas de restricción. Las clonas resultantes fueron confirmadas por secuenciación.

Tabla VII. Mezcla de ligación de pLESS-EGFP y la región URR del HPV tipo 16.

Reactivo	Volumen
Esqueleto plasmídico <i>Hind</i> III – <i>Pst</i> I (proveniente de pLESS-EGFP) (~ 300 ng)	2 µl
Inserto URR <i>Hind</i> III – <i>Pst</i> I (proveniente de las clonas pBS-URR AA y E) [~ 300 ng]	8 µl
Enzima T4 DNA ligasa (NEB)	2 µl
Buffer de ligación 10X (NEB)	2 µl
ATP 10 mM (Invitrogen)	2 µl
Agua MiliQ	4 µl

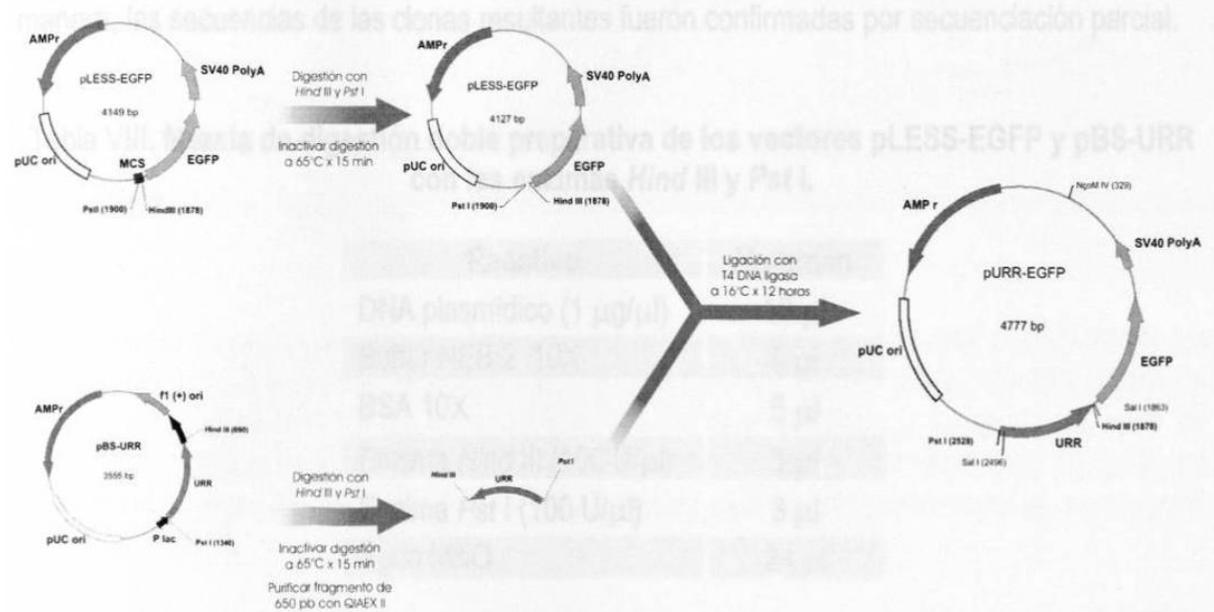


Figura 13. Estrategia para la construcción de pURR-EGFP. El plásmido pLESS-EGFP fue digerido con las enzimas de restricción *Hind* III y *Pst* I en una digestión doble. Al mismo tiempo las clonas pBS-URR AA y E fueron digeridos con las mismas enzimas y la banda de 650 pb correspondiente a la región URR fue purificada de gel con QIAEX II. Posteriormente se ligó a una porción de la digestión de pLESS-EGFP sin purificar, para obtener finalmente las construcciones pURR-EGFP con las dos variedades de URR empleadas.

3.4.2.3 pURR₁₈- EGFP

Para la construcción de este vector, se siguió la misma estrategia que para la construcción de los plásmidos problema pURR-EGFP, con la diferencia de que la región URR de HPV-18 fue tomada del plásmido donde anteriormente había sido clonada, mediante digestión con las enzimas *Hind* III y *Pst* I a 37°C por 16 h [tabla VIII], lo que generó un fragmento de 3443 pb y otro de 702 pb. El fragmento de 702 pb correspondiente a la región URR del HPV-18 clonada se ligó a una porción sin purificar de pLESS-EGFP previamente digerido con las enzimas *Hind* III y *Pst* I a 37°C por 16 h [tabla VIII] e inactivadas a 80°C × 15 minutos. La ligación se llevó a cabo con T4 DNA ligasa a 17°C por 16 h [tabla IX]. Posteriormente el plásmido fue transferido a bacterias calcio competentes, estriado en placas petri con medio de cultivo LB agar con ampicilina 0.1 mg/ml, e incubadas a 37°C por 16 hrs. Finalmente se seleccionaron colonias, las cuales se caracterizaron tras un posterior análisis con enzimas de restricción. De la misma manera, las secuencias de las clonas resultantes fueron confirmadas por secuenciación parcial.

Tabla VIII. Mezcla de digestión doble preparativa de los vectores pLESS-EGFP y pBS-URR con las enzimas *Hind* III y *Pst* I.

Reactivo	Volumen
DNA plasmídico (1 µg/µl)	10 µl
Buffer NEB 2 10X	5 µl
BSA 10X	5 µl
Enzima <i>Hind</i> III (100 U/µl)	3 µl
Enzima <i>Pst</i> I (100 U/µl)	3 µl
Agua MilliQ	24 µl

Tabla IX. Mezcla de ligación de pLESS-EGFP y la región URR del HPV tipo 18.

Reactivo	Volumen
Esqueleto plasmídico <i>Hind</i> III – <i>Pst</i> I (proveniente de pLESS-EGFP) (~ 300 ng)	2 μ l
Inserto URR <i>Hind</i> III – <i>Pst</i> I (proveniente de la clona pTOPO-URR-HPV18) [~ 300 ng]	8 μ l
Enzima T4 DNA ligasa (NEB)	2 μ l
Buffer de ligación 10X (NEB)	2 μ l
ATP 10 mM (Invitrogen)	2 μ l
Agua MiliQ	4 μ l

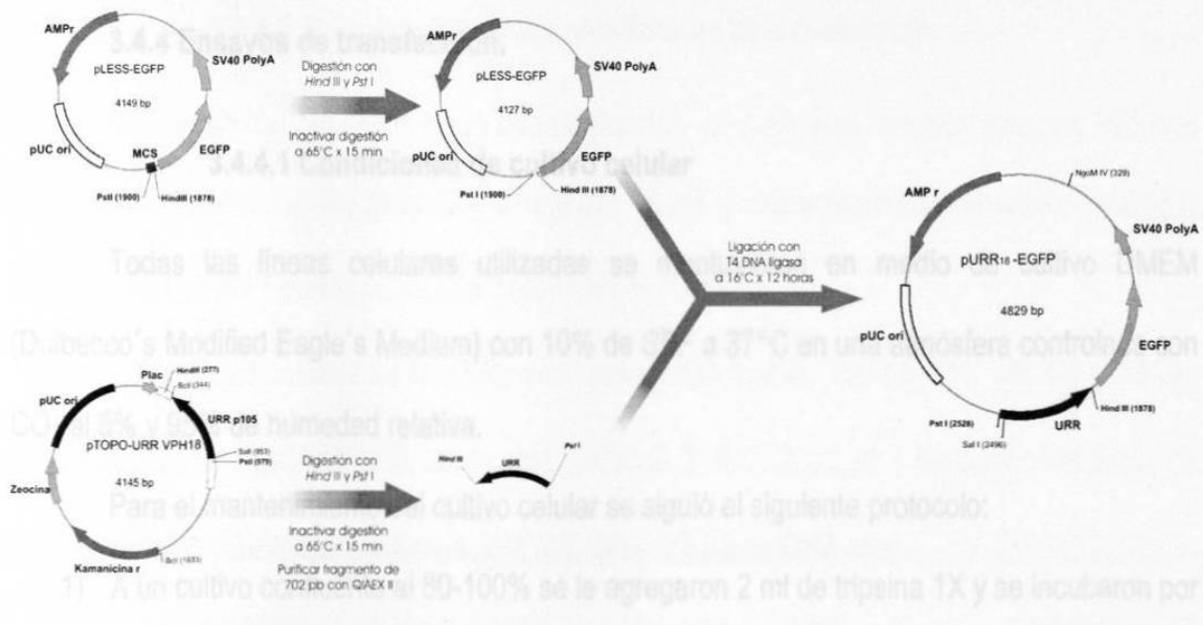


Figura 14. Estrategia para la construcción de pURR₁₈-EGFP. El plásmido pLESS-EGFP fue digerido con las enzimas de restricción *Hind* III y *Pst* I en una digestión doble. Al mismo tiempo la clona pTOPO-URR-HPV18 fue digerida con las mismas enzimas y la banda de 702 pb correspondiente a la región URR fue purificada de gel con QIAEX II. Posteriormente se ligó a una porción de la digestión de pLESS-EGFP sin purificar, para obtener finalmente la construcción pURR₁₈-EGFP.

3.4.3 Purificación de los plásmidos.

Una vez que ya habían sido obtenidos todos los plásmidos de interés, se procedió a crecerlos a gran escala en un volumen de 500 ml de medio LB con ampicilina 0.1 mg/ml y purificarlos por columna con el estuche comercial Endofree Maxi Plasmid Kit (QIAGEN), según las especificaciones descritas por el fabricante. Posteriormente se cuantificaron al espectrofotómetro mediante lectura a 260 nm para determinar la concentración del DNA y también se determinó su pureza mediante el índice resultante de las absorbancias a 260 y 280 nm.

3.4.4 Ensayos de transfección.

3.4.4.1 Condiciones de cultivo celular

Todas las líneas celulares utilizadas se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 10% de SBF a 37°C en una atmósfera controlada con CO₂ al 5% y 95% de humedad relativa.

Para el mantenimiento del cultivo celular se siguió el siguiente protocolo:

- 1) A un cultivo confluyente al 80-100% se le agregaron 2 ml de tripsina 1X y se incubaron por 5 minutos a 37°C.
- 2) Se recuperaron las células despegadas en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugaron a 2500 RPM x 1 minuto. Se descartó la tripsina y se resuspendieron en 5 ml de medio DMEM sin suero. Se centrifugaron a 2500 RPM x 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 3 ml de medio DMEM con 10% de SBF.
- 3) Se contaron las células y la viabilidad celular en una cámara de Neubauer y se transfirió una alícuota de 1×10^6 células a una nueva botella de 75 cm².

- 4) Se agregaron 20 ml de medio DMEM con 10% de SBF sin antibióticos.
- 5) Se incubaron en una atmósfera controlada de 5% de CO₂, 95% de humedad relativa a 37°C; y se les realizó cambio de medio cada 72 h.

Para preparar las células para los ensayos de transfección se partió de cultivos al 80% y en fase logarítmica. Se procedió a despegar las células con tripsina 1X y realizar la cuenta celular. Se inocularon 1×10^5 células en placas de 24 pocillos y se incubaron por un periodo de 24 h antes de los ensayos de transfección.

3.4.4.2 Optimización de las condiciones de transfección.

Para optimizar las condiciones de transfección, se realizaron diversos ensayos variando las concentraciones de lipofectamina y reactivo PLUS y cotransfectando al vector pGREEN lantern-1 con pCMV Sport β Gal en diferentes concentraciones.

Las concentraciones de lipofectamina ensayadas fueron: 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0 y 0.5 μ g; las cantidades de reactivo PLUS ensayadas fueron 6, 5, 4, 3, 2 y 1 μ l; y las concentraciones de DNA empleadas fueron las siguientes: 2.0, 1.5, 1.0 y 0.5 μ g de DNA total.

La mejor condición de transfección fue ensayada para todas las líneas celulares y se escogieron las que tuvieron la misma eficiencia de transfección.

De esta manera fue posible encontrar las condiciones óptimas para la introducción de los plásmidos, empleando el siguiente protocolo:

- 1) En un tubo de 1.5 ml se colocaron 396 μ l de medio de cultivo DMEM sin suero y 4 μ l de lipofectamina 2 μ g/ μ l, se mezcló y se incubó por 15 min a temperatura ambiente.
- 2) Al mismo tiempo a otro tubos de 1.5 ml se agregaron 320 μ l de medio de cultivo DMEM sin suero y 20 μ l del plásmido a estudiar y 20 μ l de pCMV Sport β Gal, ambos a una

concentración de 0.100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, para generar una solución de 1 μg de DNA totales/100 μl .

La solución se mezcló y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente.

- 3) Pasados los 15 minutos se agregaron 12 μl del reactivo PLUS, se mezcló y se dejó incubar otros 15 minutos.
- 4) Transcurridos los 15 minutos, se mezcló el contenido de ambos tubos y se dejó incubar 30 minutos para permitir la formación del complejo DNA-lipofectamina.
- 5) Consumados los 30 minutos de incubación, se añadieron 200 μl de la mezcla a 3 pocillos de la placa de 24 pozos con células preparadas para la transfección 24 h antes.
- 6) Las células se incubaron por 4 horas con el complejo DNA-lipofectamina a 37°C en una atmósfera controlada al 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.
- 7) Pasado este tiempo se añadieron 300 μl de medio de cultivo DMEM con SBF al 16.66%, para tener una concentración final de SBF del 10% en un volumen de 500 μl . Las células se continuaron incubando a 37°C en una atmósfera controlada al 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.
- 8) A las 24 horas del comienzo de la transfección se cambió el medio de cultivo por medio de cultivo DMEM al 10% de SBF, y se continuó la incubación hasta las 48 h, tiempo en que se interrumpió el ensayo.

3.4.4.3 Optimización del método de lisis celular

Dado que la sensibilidad del método depende de una eficiente liberación de las proteínas de interés, se tuvo la necesidad de optimizar el método de lisis celular, variando la composición del buffer de lisis, volumen del buffer de lisis al momento de hacer el lisado, empleo o no de ciclos de congelación-descongelación.

3.4.5 Evaluación de la eficiencia de transfección.

3.5.5.1 Cuantificación de la actividad de β -galactosidasa.

Para la determinación de la actividad de β -galactosidasa se siguió el protocolo descrito por Huvar y Lernhardt, 1994. Una vez terminado el tiempo de incubación de la transfección las células fueron lavadas con 300 μ l de PBS 1X pH 7.5 y posteriormente se adicionaron 200 μ l de buffer de lisis (0.25 M Tris [pH 7.4], 0.25 % (v/v) NP-40, 2.5 mM EDTA). Se procedió a 2 ciclos de incubación a -20°C por 30 minutos y se descongeló a temperatura ambiente. El lisado se traspasó a tubos de 0.5 ml, para posteriormente clarificar por centrifugación a 12,000 rpm x 5 minutos. Del extracto proteico se tomaron 50 μ l para llevar a cabo una reacción con 150 μ l de sustrato para β -galactosidasa CPRG a una concentración de 1 mg/ml en buffer A [pH 7.5] (25 mM MOPS, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2). La reacción se llevó a cabo a 37°C y se determinó la intensidad de color midiéndose la absorbancia a 570 nm. La actividad de β -galactosidasa se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{\left[\left\{ (\text{Abs } 570 \text{ nm} \times 55) \times \text{volumen total del ensayo} \right\} \right]}{\left[\begin{array}{l} \text{Tiempo de incubación a } 37^{\circ}\text{C en minutos} \\ \text{Concentración de proteínas en mg}/\mu\text{g} \end{array} \right]} \times \text{Volúmen del lisado usado en el ensayo en } \mu\text{l}$$

Para calcular la actividad específica de β -galactosidasa en U/mg de proteína, se cuantificó la concentración de proteína total en el extracto celular mediante la técnica de Bradford.

3.4.5.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

En tubos de 0.5 ml se colocaron 1.0, 2.5, 5.0, 12.5 y 15 μ l de una solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 0.5 mg/ml, aforando a 50 μ l con una solución de NaCl 150 mM. Cada solución tenía una cantidad equivalente de 0.5, 1.25, 2.5, 6.25 y 7.5 μ g de proteína, respectivamente.

La reacción se llevó a cabo con la adición de 250 μ l de colorante azul brillante de Coomassie G-250, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. En paralelo, con la elaboración de la curva de calibración se determinó la concentración de proteínas de cada una de las muestras problema.

3.4.6 Evaluación de la fuerza promotora dirigida por URR

Para evaluar la fuerza promotora de las regiones URR se midió directamente la fluorescencia emitida por EGFP.

3.5.6.1 Medición directa de la fluorescencia de EGFP

La medición de la fluorescencia emitida por EGFP se hizo mediante lectura directa de 150 μ l del extracto proteico en fluorómetro, empleando una longitud de excitación de 488 nm, y una longitud de emisión de 507 nm, calibrado con un estándar de 10 μ g/ml de EGFP (Clontech).

La evaluación de la fuerza promotora de las diversas regiones URR se hizo previa normalización de la actividad de β -galactosidasa, para poder comparar entre sí la fuerza de las regiones promotoras en las diferentes líneas celulares y entre variedades de URR.

3.4.7 Análisis de los resultados obtenidos.

El análisis de los resultados se realizó en la hoja de cálculo Excel, así como las gráficas comparativas de todos los ensayos. Para determinar los valores de significancia estadística, se utilizó la prueba de ANOVA (comparación entre dos o más grupos). Éstos cálculos se realizaron con el programa estadístico SPSS versión 11.5 para PC. El valor fijado de significancia estadística para todas las pruebas fue ≥ 0.05 .

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Clonación de las regiones URR del HPV-16 y 18.

4.1.1 Clonación de la región URR del HPV-16

4.1.1.1 Amplificación de las regiones URR del HPV-16

Para la amplificación de la región URR se emplearon los iniciadores p971 y p972. Para encontrar la temperatura óptima de alineamiento se realizó un gradiente de temperaturas de 40 a 60°C, escogiendo como temperatura óptima 50°C [figura 15].

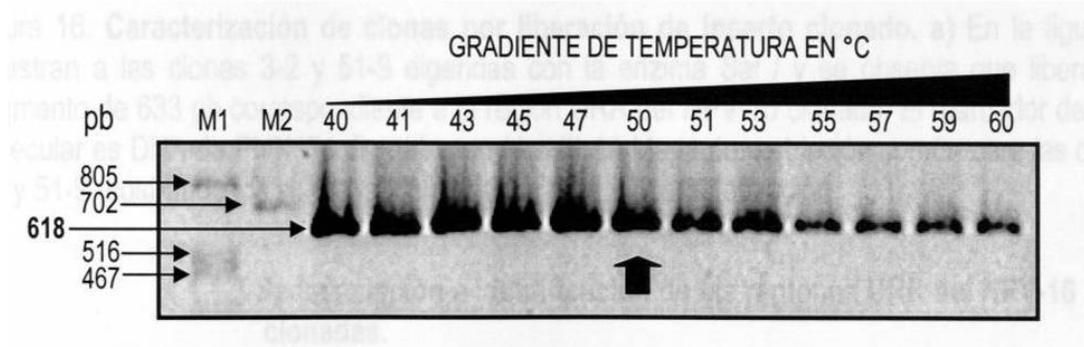


Figura 15. **Gradiente de temperaturas de alineamiento de los iniciadores p971 y p972.** En la figura se muestra un gel de agarosa al 1%, donde se aprecia la especificidad de los iniciadores y como aumenta la astringencia conforme se incrementa la temperatura. Carril M1: marcador de peso molecular λ + *Pst* I; Carril M2: marcador de peso molecular λ + *Bst* E II; carriles 3 – 14: productos de PCR empleando los iniciadores p971 y p972, variando únicamente la temperatura de alineamiento de los iniciadores de 40 a 60°C. Para la optimización de la PCR se empleó DNA de la línea celular CasKi.

4.1.1.2 Clonación de las regiones URR del HPV-16.

Una vez que se logró estandarizar la PCR para la amplificación de las regiones URR del HPV-16, se procedió a amplificar dichas regiones a partir de DNA de 12 biopsias de cervix

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

previamente tipificadas con infección de HPV-16, tras lo cual se procedió a clonaras por vector T [pBlueScript SK (+)]. Posterior al levantamiento de colonias de la ligación de vector T [pBlueScript SK (+)] con el producto de 618 pb proveniente de la PCR para la amplificación de la región URR de HPV-16, se caracterizaron con la enzima *Sal I*, para determinar la identidad de las clonas y su orientación [figura 16]. Finalmente se secuenciaron las regiones clonadas para confirmar su presencia e identificar a las variedades de HPV-16.

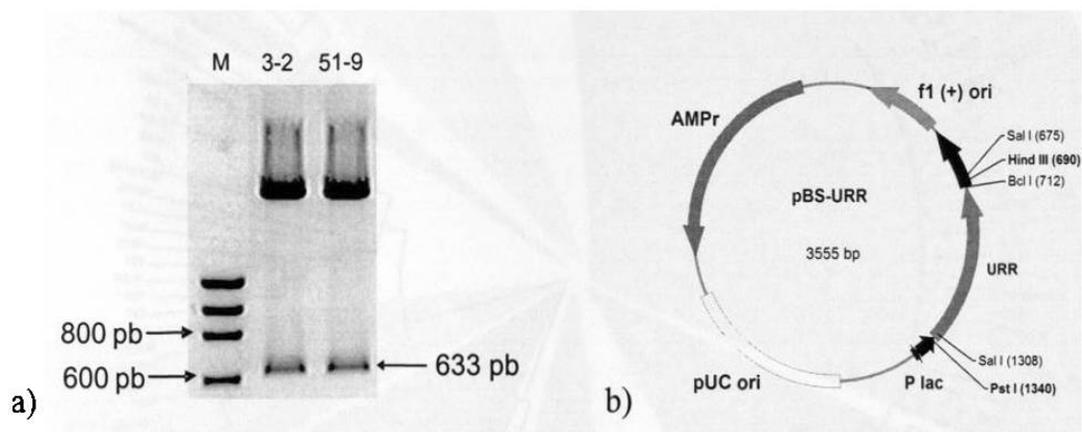


Figura 16. **Caracterización de clonas por liberación de inserto clonado.** a) En la figura se muestran a las clonas 3-2 y 51-9 digeridas con la enzima *Sal I* y se observa que liberan un fragmento de 633 pb correspondiente a la región URR del HPV-16 clonada. El marcador de peso molecular es DNA de PhiX174 digerido con *Hae III*. b) Mapa de restricción común para las clonas 3-2 y 51-9 mostrando los sitios *Sal I* empleados para su caracterización.

4.1.1.3 Secuenciación e identificación de las regiones URR del HPV-16 clonadas.

La secuenciación se realizó con los mismos iniciadores con los que se amplificaron las regiones URR. Las secuencias resultantes se alinearon en el programa en línea BLAST, para verificar la identidad y la variedad de HPV-16 (ver anexos), para posteriormente realizar un árbol filogenético empleando un análisis tipo Parsimony, utilizando todas las secuencias reportadas actualmente en el Genbank para la región URR del HPV-16, incluyendo las utilizadas por Yamada y Cols ^{73, 96}, para agruparlos en variedades. El árbol resultante se muestra en la figura 17, donde se señala la ubicación de las clonas 3-2 y 51-9, las cuales se escogieron como

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

representantes de las variedades europea y asiático americana, respectivamente. En el apéndice I se muestran las secuencias de las clonas 3-2 y 51-9.

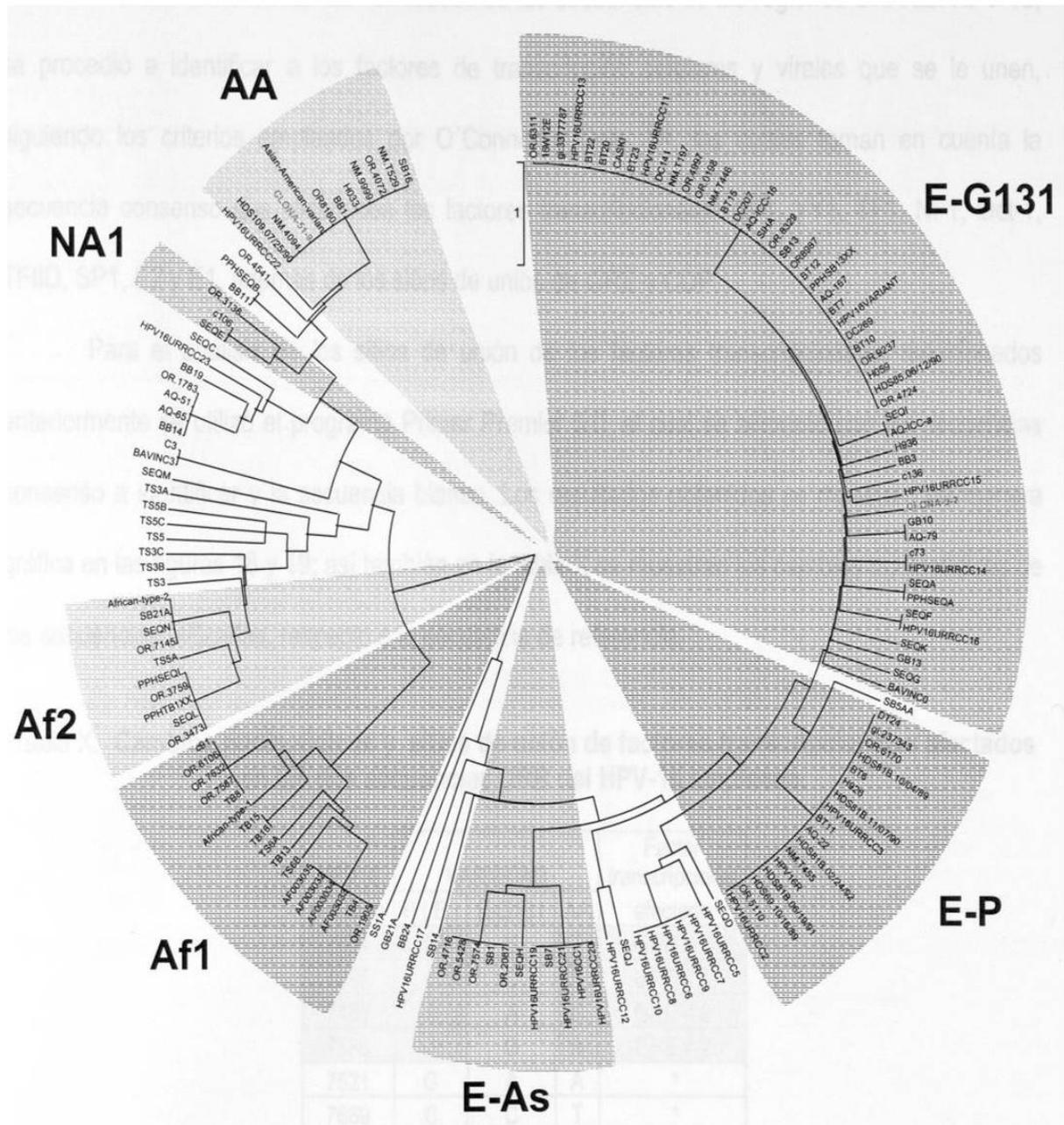


FIGURA 17. **Árbol filogenético de las variedades de HPV-16.** El árbol filogenético se realizó utilizando las regiones URR reportadas hasta el momento en el Genbank y en el HPV database para los HPV-16. El análisis fue realizado en el programa MEGA 2.1 con el método UPGMA y el método de cálculo de distancias se basó en el número de diferencias nucleotídicas. En esta figura se señalan la ubicación de las clonas 3-2 (variante europea G131) y 51-9 (variante asiático-americana). La organización del árbol en variantes se realizó tomando como referencia las secuencias reportadas por Yamada y Cols ^{73, 96}.

4.1.2 Análisis de las regiones URR del HPV-16 clonadas.

Una vez identificadas las variedades de las secuencias de las regiones URR del HPV-16, se procedió a identificar a los factores de transcripción celulares y virales que se le unen, siguiendo los criterios empleados por O'Connor y Cols. ¹⁰⁵, los cuales toman en cuenta la secuencia consenso que reconocen los factores transcripcionales AP1, YY1, TF1, NF1, Oct-1, TFIID, SP1, E2 y E1, además de los sitios de unión de GRE y CDP.

Para el análisis de los sitios de unión de los factores transcripcionales mencionados anteriormente se utilizó el programa Primer Premier 5.0, el cual se alimentó con las secuencias consenso a identificar y la secuencia blanco. Los resultados obtenidos se muestran de manera gráfica en las figuras 18 y 19; así también en la tabla X se muestran los cambios nucleotídicos de las secuencias utilizadas, respecto a la secuencia de referencia.

Tabla X. **Cambios nucleotídicos y sitios de unión de factores transcripcionales afectados en las dos secuencias URR del HPV-16 empleada.**

HPV16 Posición	VARIEDAD			Factor transcripcional afectado
	P (E)	E-G131	AA	
7394	C	C	T	GRE # 1
7395	C	C	T	GRE # 1
7485	A	A	C	GRE # 2
7489	G	G	A	GRE # 2
7521	G	A	A	*
7669	C	C	T	*
7689	C	C	A	TEF-1
7729	A	A	C	*
7743	T	T	G	*
7764	C	C	T	*
7786	C	C	T	*
7810	A	G	A	AP1
7886	C	C	G	*

* Ningún sitio de unión de algún factor transcripcional conocido se ve afectado.

4.1.3 Clonación de la región URR del HPV-18.

4.1.3.1 Amplificación de la región URR del HPV-18.

Para la amplificación de la región URR del HPV-18 se emplearon los iniciadores p1051 y p1052. Para encontrar la temperatura óptima de alineamiento se realizó un gradiente de temperaturas, de 40 a 55°C, escogiendo como temperatura óptima 50°C [figura 20].

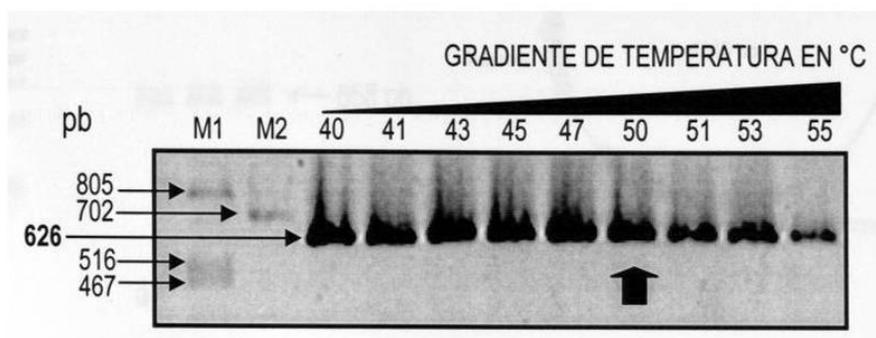


Figura 20. **Gradiente de temperaturas de alineamiento de los iniciadores p1051 y p1052.** En la figura se muestra un gel de agarosa al 1%, donde se aprecia la especificidad de los iniciadores y como aumenta la astringencia conforme se incrementa la temperatura, al igual que con la amplificación de URR para el HPV-16 (figura 14). Carril M1: marcador de peso molecular λ + Pst I; Carril M2: marcador de peso molecular λ + Bst E II; carriles 3 – 11: productos de PCR empleando los iniciadores p1051 y p1052, variando únicamente la temperatura de alineamiento de los iniciadores de 40 a 55°C. Para la optimización de la PCR se empleó DNA de la línea celular HeLa.

4.1.3.2 Clonación de las región URR del HPV-18.

Una vez que se logró estandarizar la PCR para la amplificación de la región URR del HPV-18, se procedió a amplificar dicha región a partir de DNA de la línea celular HeLa, la cual tiene integrada varias copias del genoma de HPV-18. Posteriormente se procedió a clonarlas con el estuche comercial de clonación TOPO® XL PCR Cloning Kit. Posterior al levantamiento de colonias de la ligación con el vector TOPO, se les extrajo el DNA y se sometieron a caracterización con una doble digestión con las enzimas *Sal* I y *Bam* H I, para determinar la