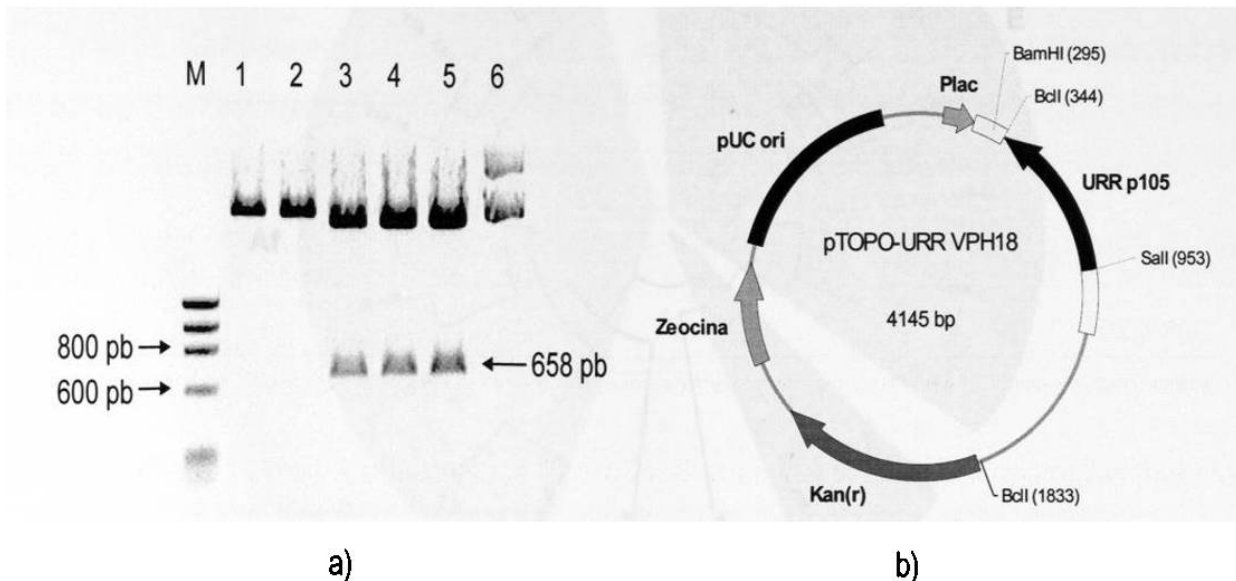


Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

identidad de las clonas y su orientación [figura 21]. Posteriormente se secuenciaron las regiones clonadas para confirmar su presencia e identificar a la región URR del HPV-18 clonada.

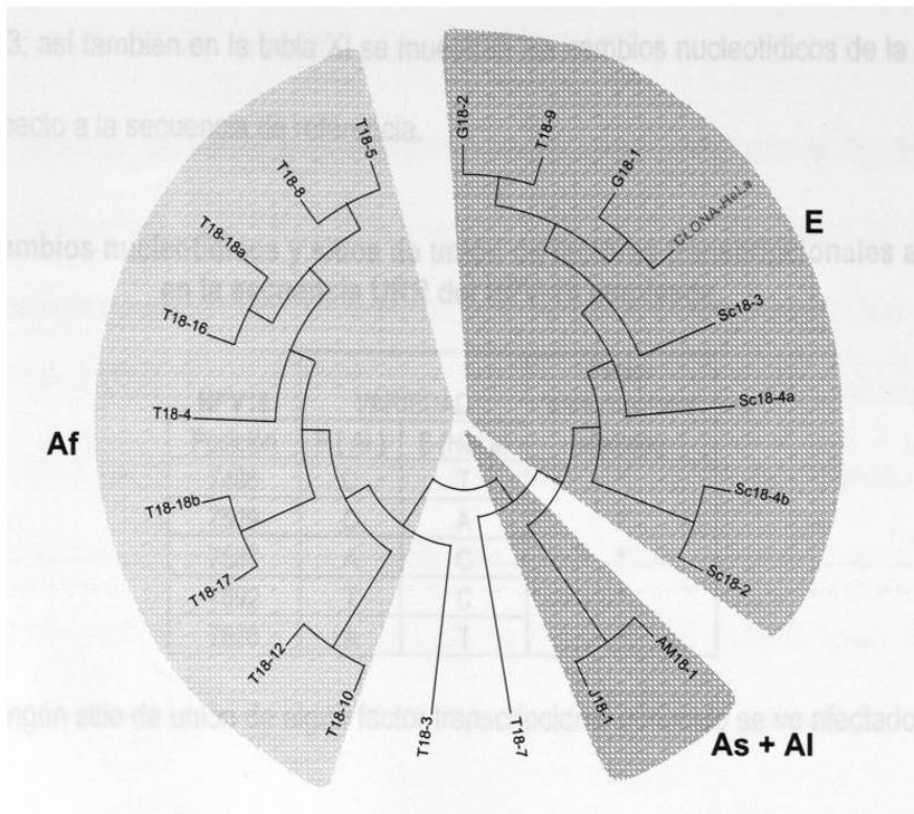


**Figura 21. Caracterización de clonas pTOPO-URR HPV 18 por liberación de inserto URR clonado.** a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se muestran diferentes clonas digeridas con Sal I + Bam H I, en las cuales, las que liberan un fragmento de 658 pb tienen la región URR del HPV-18 clonada, y se consideran positivas. Carril 1: marcador de peso molecular PhiX174 + Hae III; carriles 1 y 2: clonas pTOPO-URR HPV18 negativas; carriles 3-5: clonas pTOPO-URR HPV18 positivas. b) Mapa de restricción de la construcción pTOPO-URR HPV18 donde se muestran los sitios de restricción Bam H I y Sal I utilizados para su caracterización; además de los sitios Bcl I y Sal I contenidos en los iniciadores con los que se amplificó dicha región.

#### 4.1.3.3 Secuenciación e identificación de la región URR del HPV-18 clonada.

La secuenciación se realizó con los mismos iniciadores con los que se amplificó la región URR. Los resultados de la secuenciación se alinearon en el programa en línea BLAST, para verificar la identidad y la variedad de HPV-18 con las que alineaban (ver anexo), para posteriormente realizar un árbol filogenético empleando un análisis tipo Parsimony, utilizando las secuencias referidas por Ong y Cols.<sup>112</sup> para la clasificación de los HPV-18 en variedades. El árbol resultante se muestra en la figura 22, donde se señala la ubicación de la clona resultante.

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 22. Árbol filogenético de las variedades de HPV-18.** El árbol filogenético se realizó utilizando las regiones URR empleadas por Ong y cols.<sup>112</sup> para clasificar a los HPV-18 en variedades. El análisis empleando fue realizado en el programa MEGA 2.1 con el método Maximun Parsimony y el método de cálculo de distancias se basó en el número de diferencias nucleotídicas. En esta figura se señala la ubicación de la clona proveniente de HeLa (variante europea). La organización del árbol en variantes se realizó tomando como referencia las secuencias reportadas por Ong y colaboradores<sup>105</sup>.

#### 4.1.3.4 Análisis de la región URR del HPV-18 clonada.

Una vez identificada la variedad de la secuencia de la región URR del HPV-18 proveniente de HeLa, 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.<sup>105</sup>, 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.

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. El resultado obtenido se muestra de manera gráfica

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

en la figura 23; así también en la tabla XI se muestran los cambios nucleotídicos de la secuencia utilizada, respecto a la secuencia de referencia.

Tabla XI. Cambios nucleotídicos y sitios de unión de factores transcripcionales afectados en la secuencia URR del HPV-18 empleada.

| HPV18 | VARIEDAD |        | Factor transcripcional afectado |
|-------|----------|--------|---------------------------------|
|       | Posición | P (AI) |                                 |
| 7486  | C        | T      | *                               |
| 7529  | C        | A      | *                               |
| 7567  | A        | C      | *                               |
| 7592  | T        | C      | *                               |
| 7670  | A        | T      | *                               |

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

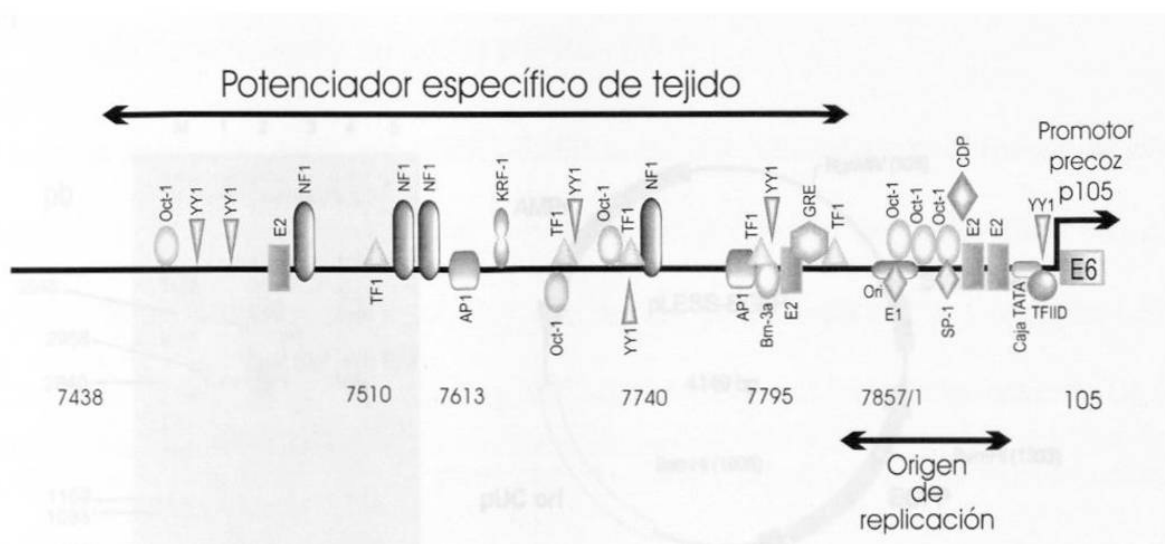


Figura 23. Representación gráfica de la región URR de la variedad europea del HPV-18 clonada. En la figura se muestran los sitios de unión de varios factores de transcripción celulares y virales.

#### 4.2 Construcción de los vectores de expresión.

Una vez que ya se tenían a las regiones promotoras clonadas, identificadas y caracterizadas, se procedió a la construcción de un vector que contuviera al gen EGFP, para posteriormente subclonar en éste a las regiones URR.

### 4.2.1 Caracterización del vector pLESS-EGFP.

La generación del vector pLESS-EGFP se llevó a cabo mediante la ligación de dos productos purificados: uno de 2615 pb proveniente de la digestión de pBlueScript SK (+) con las enzimas de restricción *Ngo M IV* y *Sal I*; y otro de 1534 pb proveniente de la digestión secuencial de pGREEN lantern-1 con las enzimas *Ngo M IV* y *Sal I*. Posteriormente fueron transformados en bacterias XL1-Blue. Se analizaron 18 colonias, obteniendo 2 como posibles clonas, las cuales tras una posterior caracterización con la enzima *Bam H I* (la cual se encontraba como sitio único en cada producto purificado ligado, pero después de la ligación se observó como sitio doble), donde en dos clonas se observó que liberaban un fragmento de 603 pb y otro de 3546 pb [figura 24].

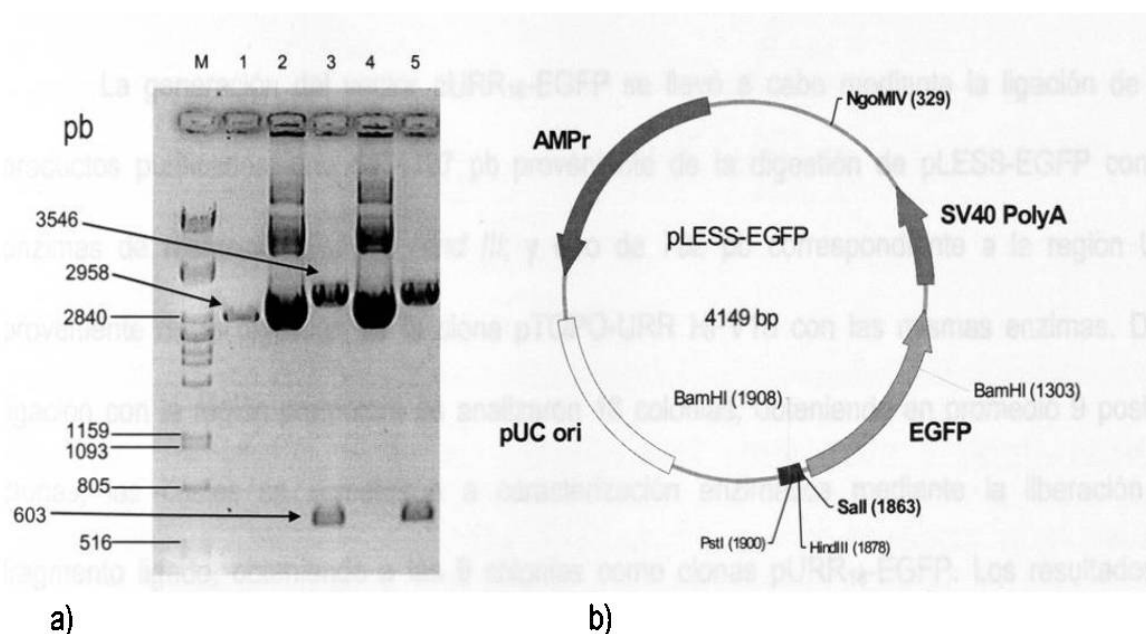


Figura 24. **Caracterización de la construcción pLESS-EGFP.** a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra en el carril 1: Control de corte [pBS SK (+) + *Bam H I*]; carriles 2 y 4: clonas 1-pLESS-EGFP y 2-pLESS-EGFP respectivamente, sin digerir; carriles 3 y 5: clonas 1-pLESS-EGFP y 2-pLESS-EGFP digeridas, donde se muestra su caracterización con *Bam H I*, donde al ser positivas liberan dos fragmentos, uno de 603 pb y otro de 3546. b) Mapa de restricción del vector pLESS-EGFP donde se muestran la localización de los sitios *Bam H I* utilizados para caracterizar a las clonas positivas. También se muestran los sitios *Ngo M IV* y *Sal I* empleados en la ligación para la generación de este vector.

#### 4.2.2 Caracterización de los vectores pURRaa – EGFP y pURRe – EGFP.

La generación de los vectores pURR-EGFP se llevó a cabo mediante la ligación de dos productos purificados: uno de 4127 pb proveniente de la digestión de pLESS-EGFP con las enzimas de restricción *Pst* I y *Hind* III; y otro de 650 pb correspondiente a la región URR proveniente de la digestión de las clonas pBS-URR con las mismas enzimas. La metodología para la inserción de ambas regiones promotoras fue la misma en la variedad europea y asiático-americana. De la ligación con cada región promotora se analizaron 18 colonias, obteniendo en promedio 16 posibles clonas, de las cuales se escogió una de cada variedad para su caracterización, las cuales se muestran en la figura 25.

#### 4.2.3 Caracterización del vector pURR<sub>18</sub> – EGFP.

La generación del vector pURR<sub>18</sub>-EGFP se llevó a cabo mediante la ligación de dos productos purificados: uno de 4127 pb proveniente de la digestión de pLESS-EGFP con las enzimas de restricción *Pst* I y *Hind* III; y otro de 702 pb correspondiente a la región URR proveniente de la digestión de la clona pTOPO-URR HPV18 con las mismas enzimas. De la ligación con la región promotora se analizaron 18 colonias, obteniendo en promedio 9 posibles clonas, las cuales se sometieron a caracterización enzimática mediante la liberación del fragmento ligado, obteniendo a las 9 colonias como clonas pURR<sub>18</sub>-EGFP. Los resultados se muestran en la figura 26.

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

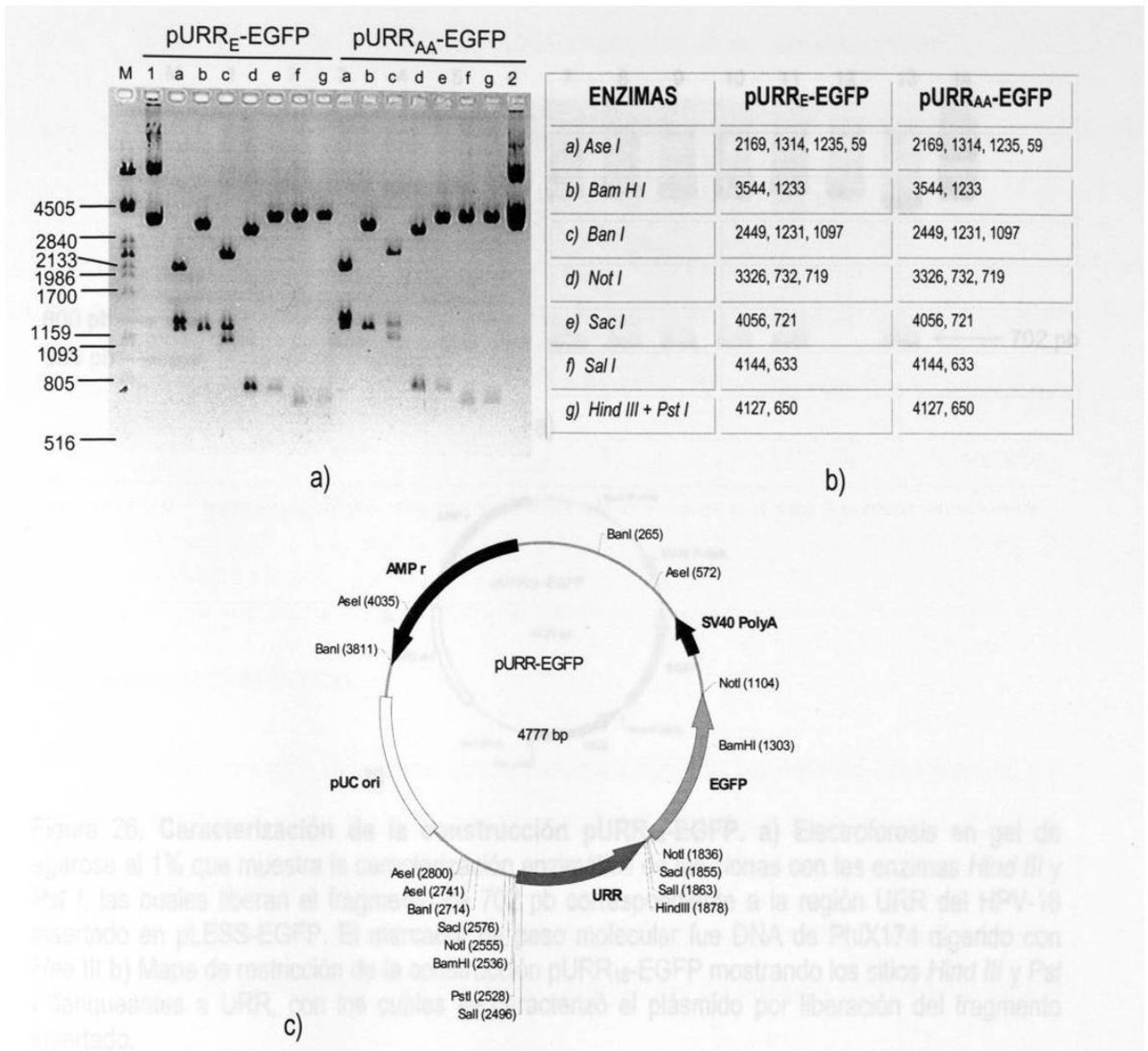


Figura 25. Caracterización de las construcciones pURRE-EGFP y pURRAA-EGFP. a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la caracterización enzimática de las construcciones pURRE-EGFP y pURRAA-EGFP con las enzimas localizadas en el mapa de restricción (figura 21 c) común para ambas construcciones; el marcador de peso molecular utilizado fue DNA de lambda digerido con *Pst I*. b) La tabla muestra las enzimas de restricción empleadas y los tamaños de los productos de las digestiones generados.

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

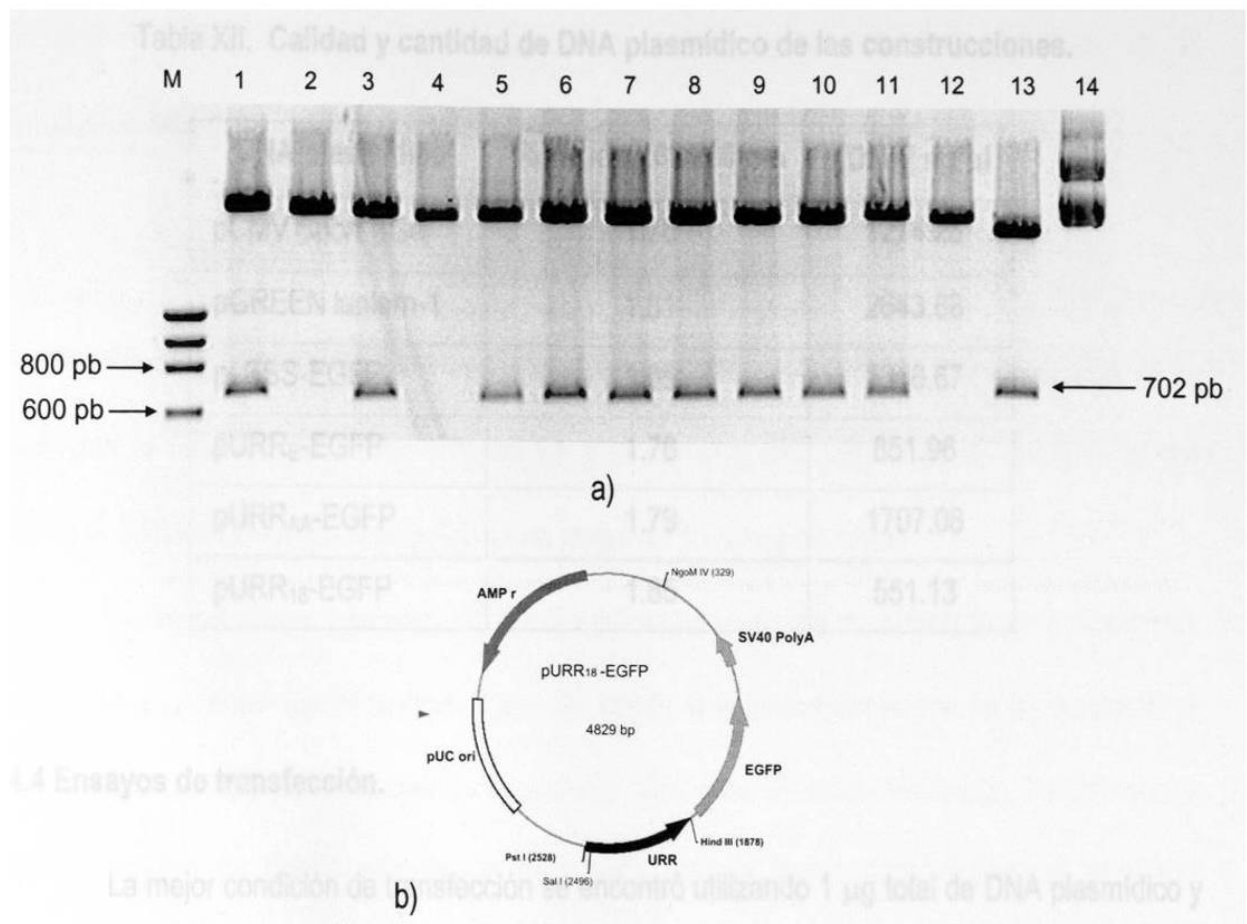


Figura 26. **Caracterización de la construcción pURR<sub>18</sub>-EGFP.** a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la caracterización enzimática de las clonas con las enzimas *Hind III* y *Pst I*, las cuales liberan el fragmento de 702 pb correspondiente a la región URR del HPV-18 insertado en pLESS-EGFP. El marcador de peso molecular fue DNA de PhiX174 digerido con *Hae III* b) Mapa de restricción de la construcción pURR<sub>18</sub>-EGFP mostrando los sitios *Hind III* y *Pst I* flanqueantes a URR, con los cuales se caracterizó el plásmido por liberación del fragmento insertado.

### 4.3 Purificación, cuantificación y calidad de los plásmidos.

Las preparaciones a gran escala y purificación de todos los plásmidos resultaron de buena calidad y cantidad, ya que los resultados de la relación de absorbancias a 260/280 nm fueron superiores a 1.7. La cantidad obtenida de DNA plasmídico para cada construcción fue variable pero aceptable. Los resultados de pureza y cantidad de DNA obtenidos para cada construcción se muestran en la tabla XII.

Tabla XII. Calidad y cantidad de DNA plasmídico de las construcciones.

| DNA plasmídico           | Relación 260/280 nm | [DNA] ng/ $\mu$ l |
|--------------------------|---------------------|-------------------|
| pCMV Sport $\beta$ Gal   | 1.76                | 1274.25           |
| pGREEN lantern-1         | 1.81                | 2643.88           |
| pLESS-EGFP               | 1.85                | 2356.67           |
| pURR <sub>E</sub> -EGFP  | 1.76                | 851.96            |
| pURR <sub>AA</sub> -EGFP | 1.79                | 1707.08           |
| pURR <sub>18</sub> -EGFP | 1.85                | 551.13            |

#### 4.4 Ensayos de transfección.

La mejor condición de transfección se encontró utilizando 1  $\mu$ g total de DNA plasmídico y empleando 1  $\mu$ l de lipofectamina y 3  $\mu$ l de reactivo PLUS, evaluando la eficiencia en base a la actividad específica de la  $\beta$ -galactosidasa.

Dicha condición de transfección se ensayó en 8 líneas celulares, las cuales presentaron igual eficiencia de transfección, y en las cuales se realizaron los ensayos de expresión dirigida por URR.

#### 4.5 Evaluación de la expresión dirigida por las diferentes variedades de URR.

Los ensayos de transfección se realizaron tanto en líneas celulares derivadas de tejido cervical, como en otras de origen no cervical, entre las que se incluyen dos de origen hepático.

Los plásmidos transfectados fueron pGREEN Lantern-1, pLESS-EGFP, pURRE-EGFP, pURRAA-EGFP y pURR18-EGFP. Para la normalización de los resultados, cada uno de los plásmidos anteriores se cotransfectaron con pCMV Sport  $\beta$ -Gal. Pasadas 48 hrs de la transfección, se lisaron las células y se hicieron lecturas del extracto en fluorómetro para cuantificar la cantidad de EGFP producida. Una vez tomada la lectura de EGFP en fluorómetro, el



extracto se reutilizó para cuantificar proteínas totales y la actividad específica de la  $\beta$ -galactosidasa.

#### **4.5.1 Rango de cuantificación de EGFP.**

Para verificar el rango de cuantificación de EGFP en fluorómetro, se hizo una curva estándar, la cual se muestra en la figura 27, y se observa una correlación del 99.80%, lo que indica la certidumbre de los resultados en un rango de 10  $\mu$ g/ml a 1 ng/ml.

Todas las líneas celulares empleadas presentaron la misma eficiencia de transfección, las cuales se pueden visualizar en la figura 28, donde la actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa es muy similar entre los diferentes tipos celulares. Con base en estos resultados, las diferencias en la cantidad de EGFP cuantificada para cada ensayo fueron comparables, al no haber diferencias en la cantidad de plásmido ingresado. De esta manera las diferencias en las cantidades de EGFP producidas estuvieron determinadas por la fuerza de los diferentes promotores empleados.

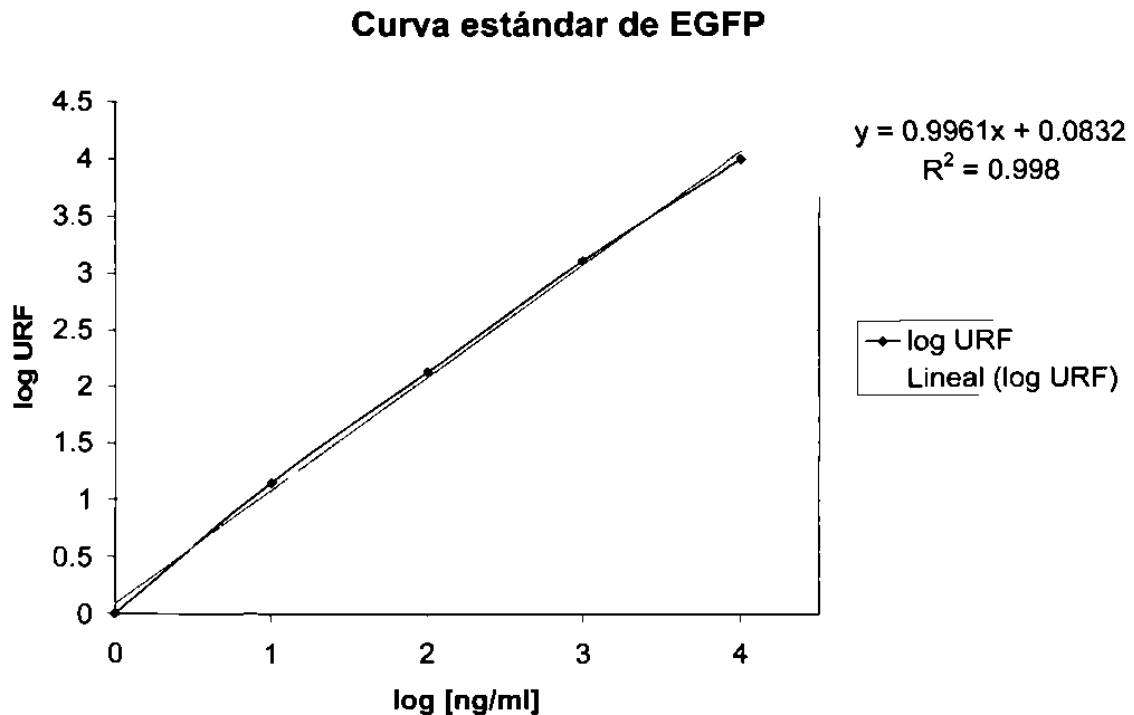


Figura 27. **Curva estándar de cuantificación de EGFP en fluorómetro.** La curva estándar se realizó calibrando el fluorómetro con un estándar de 10  $\mu\text{g/ml}$ , y haciendo diluciones seriales hasta 1  $\text{ng/ml}$  con un factor de dilución de 10. Los resultados de URF y las concentraciones de los estándares fueron convertidas a su forma logarítmica base 10 y se graficaron. El coeficiente de correlación observado con respecto a la recta corregida es de 99.80% en el rango de 10  $\mu\text{g/ml}$  a 1  $\text{ng/ml}$  de EGFP lo que indica una confiable veracidad de las lecturas en este rango.

#### 4.5.2 Eficiencias de transfección.

En la figura 27 se muestra una gráfica donde se observan las eficiencias de transfección de las nueve líneas celulares empleadas, en las que destaca la homogeneidad de las eficiencias de transfección, lo que da pauta para la comparación de la fuerza promotora de las diversas regiones promotoras empleadas.

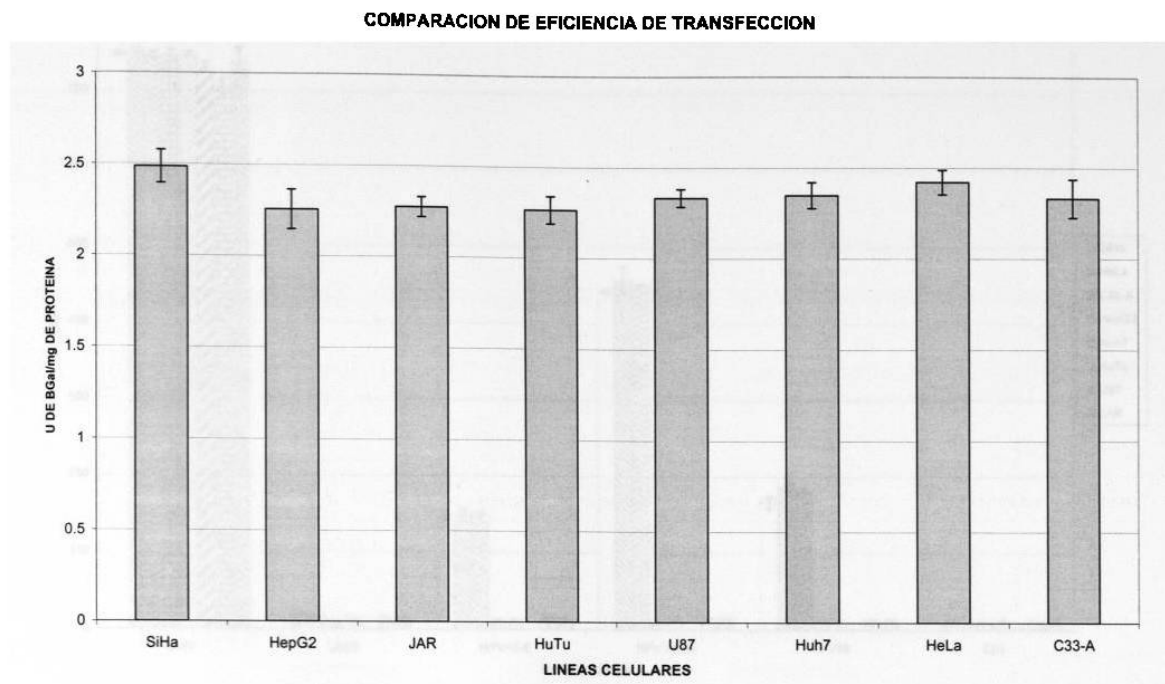


Figura 28. **Eficiencias de transfección.** En la gráfica se muestran los resultados de las eficiencias de transfección en las nueve líneas celulares ensayadas, siendo éstos muy homogéneos. Cada barra representa el promedio de 15 datos (5 condiciones por triplicado, en la que cada condición significa una cotransfección de pCMV Sport β-Gal con una construcción diferente). La desviación mostrada en cada barra indica la poca variación en los datos, lo que demuestra que los resultados de las diferencias en las fuerzas promotoras estarán dadas por el efecto mismo de cada región promotora evaluada y no por diferencias en la cantidad de plásmido transfectado en cada línea celular.

#### 4.5.3 Fuerza de promotores.

En la figura 29 se pueden observar el conjunto de todos los resultados de la fuerza promotora de las cinco construcciones transfectadas que contienen al gen EGFP dirigido por cinco diferentes promotores en los nueve tipos celulares utilizados. En ella se pueden observar la fuerza y especificidad de la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV-16, y la región URR de la variedad europea del HPV-18, y su comparación en relación al promotor CMV.

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

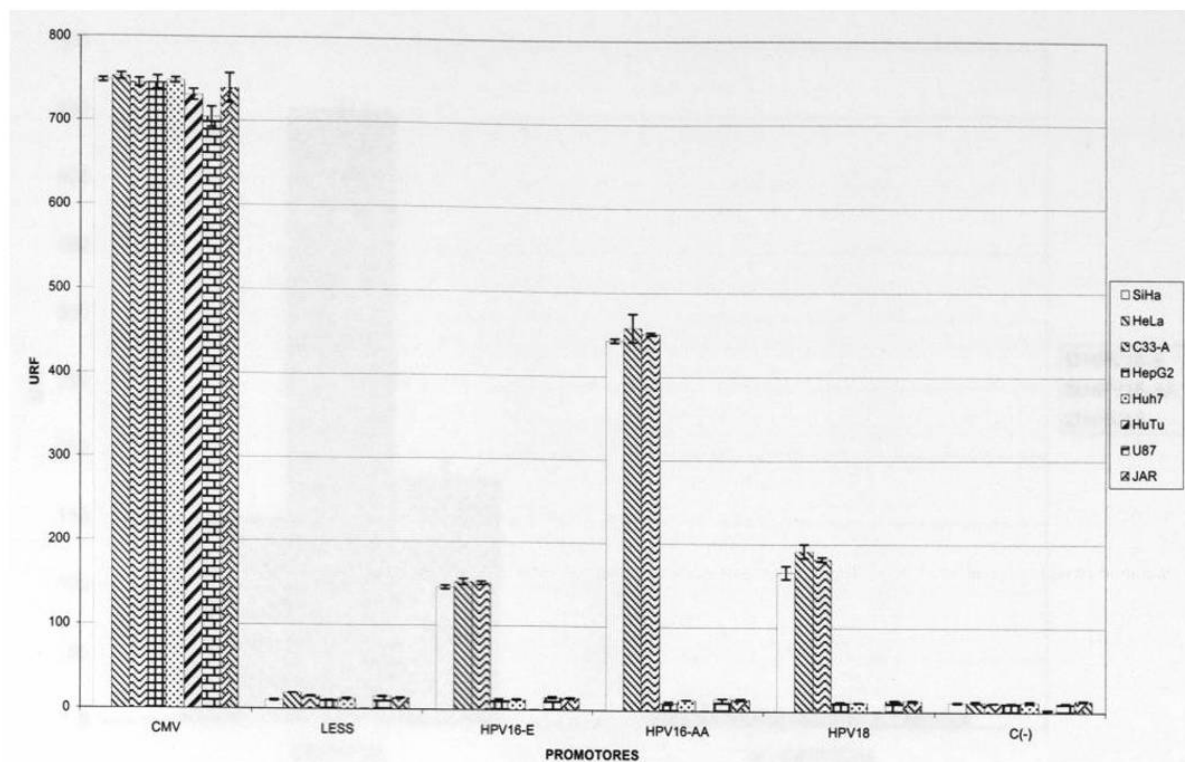


Figura 29. **Fuerza promotora y especificidad de la región URR.** En esta figura destaca la especificidad de tipo celular de las regiones URR empleadas, y el incremento en la fuerza promotora de la variedad asiático-americana de la región URR del HPV-16. Así también la comparación de la fuerza promotora de dichas regiones en relación al promotor CMV. Cada barra representa ensayos independientes por triplicado.

En la figura 30 se muestran en promedio la fuerza promotora y especificidad de las regiones URR del HPV-16 (variedades europea y asiático-americana) y 18. El promedio se realizó entre las fuerzas promotoras de estas tres regiones URR, agrupándolas en líneas de origen cervical y no cervical. En ésta se destaca la especificidad de las tres regiones URR ensayadas y la potencia de la variedad asiático-americana de la región URR del HPV-16.

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

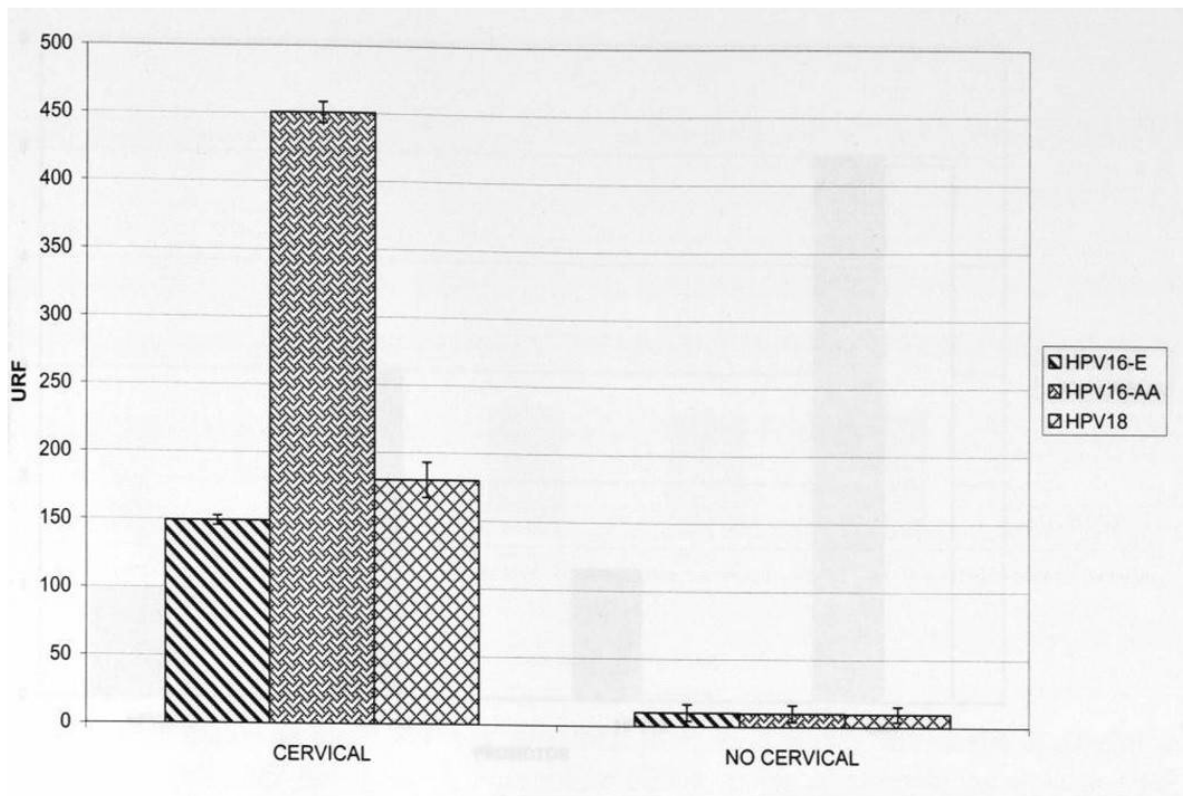


Figura 30. **Especificidad de la región URR.** En la figura se muestra el promedio de la fuerza promotora de las regiones URR en líneas celulares de origen cervical y no cervical, donde se observa la especificidad promotora de tipo celular.

De la comparación de las fuerzas promotoras de las tres regiones URR ensayadas en líneas celulares de origen cervical y no cervical y el promotor CMV con respecto a la variedad europea de la región URR del HPV-16 (que representa la unidad), se desprende la figura 31, donde se observa que la variedad asiático-americana es tres veces más potente ( $p=0.000$ ). Se nota un 20 % de incremento en la potencia de la región URR de la variedad europea del HPV-18 ( $p=0.017$ ) y que el promotor CMV es cinco veces más potente. También se observa el carácter constitutivo del promotor CMV.

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

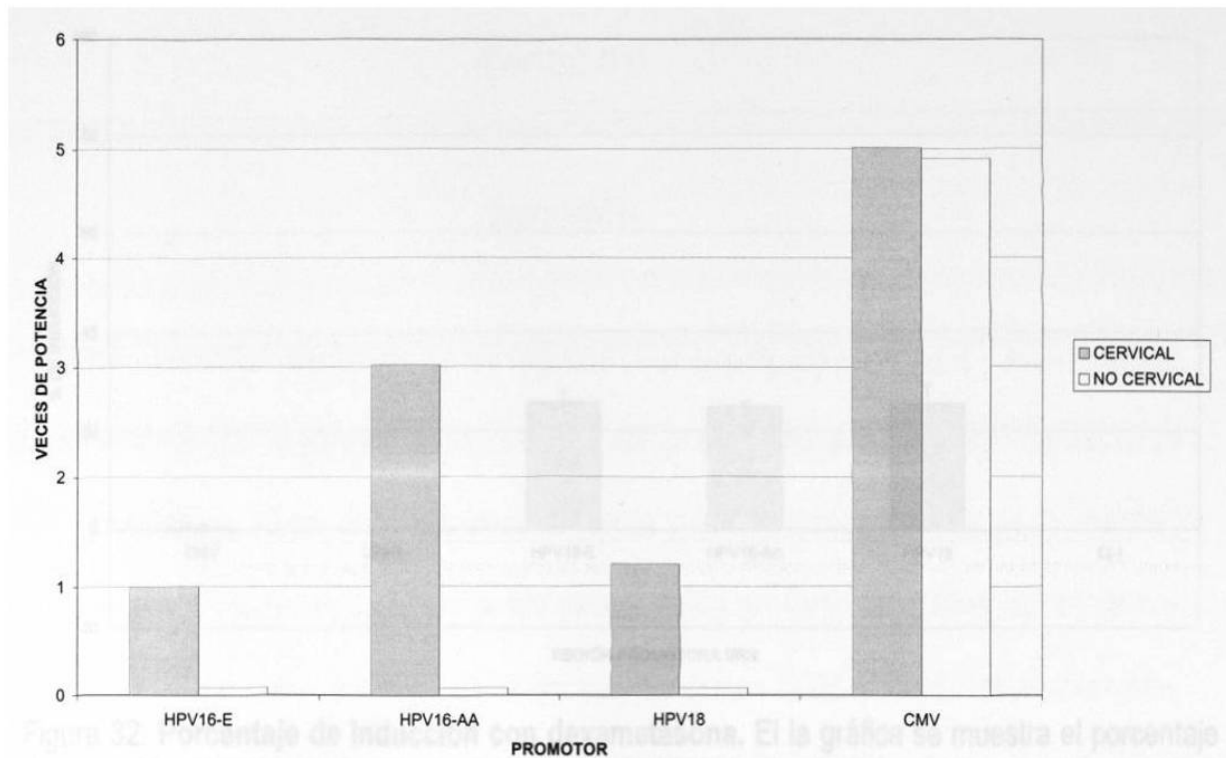


Figura 31. **Potencia de los promotores en relación a la variedad europea del HPV-16.** En la figura se observa que la región URR de la variante asiático-americana del HPV-16 es tres veces más potente ( $p=0.000$ ). También se observa un incremento apreciable de un 20 % en la potencia promotora de la región URR de la variante europea del HPV-18, casi despreciable comparándolo con el 200 % de incremento de la variedad asiático-americana del HPV-16, pero significativa estadísticamente ( $p=0.04$ ).

#### 4.5.4. Inducción con dexametasona.

Para evaluar si las diferencias en secuencia afectaban la potencia y el nivel de inducción con glucocorticoides de las regiones URR de las variedades ensayadas, se realizaron inducciones con dexametasona a una concentración  $1 \mu\text{M}$  en la línea celular C33-A. Los resultados se observan en la figura 32, donde solamente se muestra el porcentaje de inducción con dexametasona en las tres regiones URR ensayadas y en las cuales no hubo diferencia significativa ( $p=0.935$ ).

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

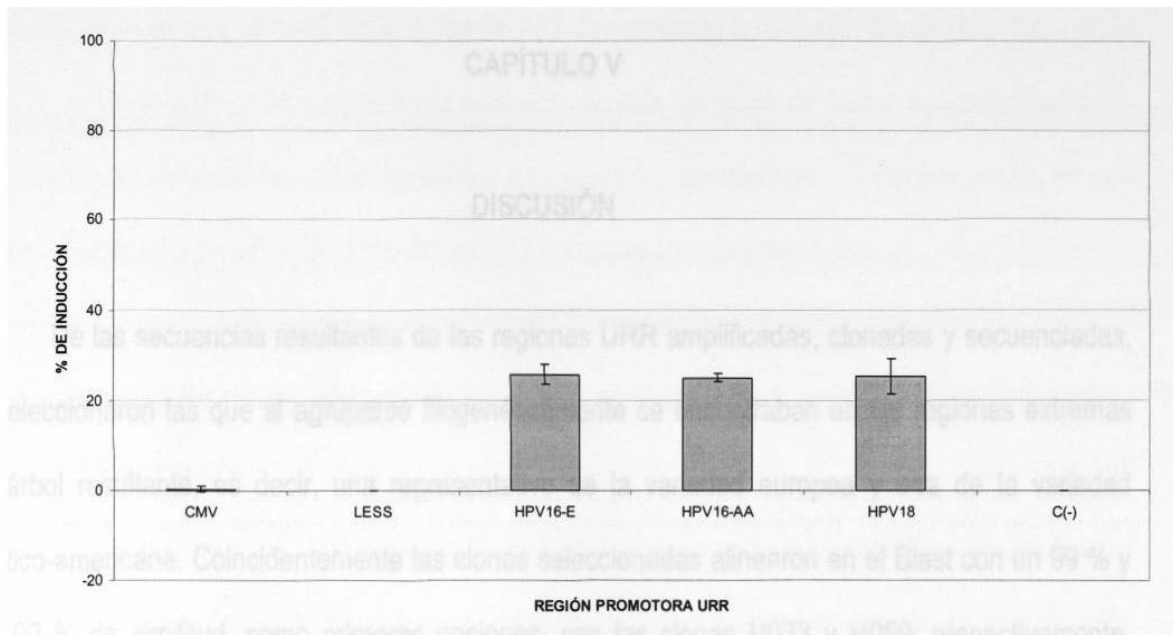


Figura 32. **Porcentaje de inducción con dexametasona.** En la gráfica se muestra el porcentaje de inducción con dexametasona en la línea celular C33-A, donde únicamente las regiones URR se muestran inducibles, y tanto el promotor CMV como los controles negativos no se inducen. El porcentaje de inducción de las tres regiones URR es casi el mismo, y se encuentran en un rango del 22 al 30 %. El ensayo se hizo por triplicado de manera independiente.

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

De las secuencias resultantes de las regiones URR amplificadas, clonadas y secuenciadas, se seleccionaron las que al agruparse filogenéticamente se encontraban en las regiones extremas del árbol resultante, es decir, una representativa de la variedad europea y otra de la variedad asiático-americana. Coincidentemente las clonas seleccionadas alinearon en el Blast con un 99 % y un 100 % de similitud, como primeras opciones, con las clonas H033 y H059, respectivamente, empleadas por Veress y Cols.<sup>28</sup>, las cuales son representantes de la variedad europea y asiático-americana, respectivamente. La región amplificada carece de un fragmento de la región 5' de URR, ya que es responsable de una disminución en la fuerza promotora al encontrarse de manera episomal según lo reportado por Stukel y cols.<sup>110</sup>.

A partir de la secuencia de las clonas seleccionadas se realizó un análisis para evidenciar cambios en la unión de factores de transcripción, los cuales son los responsables de la potencia y especificidad de esta región promotora. Del análisis se desprende que la variedad asiático-americana presenta el cambio de A/C en la posición 7729 reportado por Kämmer y cols.<sup>81</sup> como responsable del incremento en tres veces de la potencia promotora de esta variedad, mientras que en la variedad europea no hay cambio nucleotídico alguno en dicha posición. De los diferentes cambios nucleotídicos presentes en la región URR de la clona de la variedad asiático-americana, solamente cinco se encuentran en la vecindad de los sitios de unión de los primeros dos GRE y un sitio TEF-1. La clona de la variedad asiático-americana es idéntica en secuencia a la clona H033, como se mencionó en el párrafo anterior, mientras que la clona de la variedad europea G131



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

ensayada tiene un solo cambio nucleotídico de A/G con respecto a la secuencia de referencia en la posición 7810, la cual se encuentra en la vecindad del sitio de unión del factor transcripcional AP1, cuya función es de activador transcripcional, y que según lo reportado por O'Connor y cols. <sup>104</sup>, es blanco de represión en URR por parte de los YY1 ubicados a su alrededor.

La secuencia representativa del HPV tipo 18 perteneciente a la variedad europea, presenta varios cambios nucleotídicos, ninguno de los cuales se encuentra en sitios de unión conocidos a factores de transcripción.

De los resultados de la evaluación de la fuerza promotora de las variedades analizadas del HPV tipo 16, la variedad asiático-americana presenta un incremento de tres veces en comparación con la variedad europea, lo cual está a favor de lo reportado por Kämmer y Cols. <sup>81</sup>, pero contrasta en la potencia según los resultados de Veress y Cols. <sup>28</sup>, que reporta un incremento de 1.7 veces. Esto a pesar de que la secuencia ensayada es idéntica a la utilizada por este último. La especificidad de la región URR de las dos variedades ensayadas se conserva, es decir, la expresión dirigida por URR se limita a líneas derivadas de cervix, ya que no fue detectable expresión alguna en líneas no cervicales.

La región URR ensayada, representativa del HPV tipo 18, presenta una fuerza promotora similar a la de la variedad europea del HPV tipo 16, con un leve incremento en su potencia de un 20 %, pero el cual le otorga una diferencia significativa ( $p=0.017$ ). Estos resultados están de acuerdo con los hallazgos reportados por Shillitoe y Noonan <sup>103</sup>, que encuentran niveles de expresión similares entre los tipos 16 y 18 de HPV, pero de las variedades prototipo (europea y amerindia, respectivamente para HPV tipo 16 y HPV tipo 18). La especificidad de esta región se conserva aún en HPV 18 según los resultados, con una potencia similar en las diferentes líneas de origen cervical y expresión indetectable en las líneas de origen no cervical ensayadas.

En los ensayos de inducción transcripcional con dexametasona, el estímulo a la potencia fue similar en las tres regiones URR, con un 25 % de incremento, los cuales no presentan diferencia significativa (0.935), con lo que se puede decir que los cambios nucleotídicos presentes en la variedad asiático-americana del HPV tipo 16 no afectan la unión del factor transcripcional GRE, con respecto a la inducción observable en la variedad europea. De la misma manera se comporta la variedad europea del HPV tipo 18, cuyo incremento en potencia es de un 25 %, lo que indica que presenta el mismo nivel de inducción.

Con base en los resultados, se realizó una representación gráfica de los factores de transcripción que se unen a las regiones URR ensayadas, obteniendo que tanto a la variedad europea G131 como la variedad asiático-americana del HPV tipo 16 se le unen los mismos factores transcripcionales en las mismas posiciones genómicas, respecto a los factores transcripcionales que se saben se unen a URR, con lo que se puede decir que las regiones URR de las variedades europea prototipo, europea G131 y asiático-americana presentan de manera general, la misma distribución de factores transcripcionales, según los hallazgos hasta el momento. A pesar de que se sabe que el factor transcripcional YY1 ubicado sobre la caja TATA es responsable de un incremento de dos veces en la potencia transcripcional, éste no se encontró ausente en la variedad asiático-americana del HPV tipo 16, lo que está aún más a favor de que el cambio nucleotídico A7729C es el responsable del incremento en la potencia de dicha variedad, pero ninguno de los factores transcripcionales ya conocidos por su unión a la región URR parece verse afectado por dicho cambio, lo cual da pauta a la búsqueda de un factor transcripcional que se una a dicha región, y que se encuentre presente en la variedad europea, pero ausente en la variedad asiático-americana del HPV tipo 16. Una búsqueda en la base de datos MatInspector™ reveló que la variedad europea del HPV tipo 16 posee un potencial sitio de unión del factor nuclear hepático – 1 (HNF-1), el cual según la secuencia de ambas variedades ensayadas, se une a la europea, pero no a la asiático-americana.

HNF-1, además de restringir su expresión en células hepáticas, también se expresa en queratinocitos, y cumple funciones de regulador transcripcional.

El análisis de los factores de transcripción que se unen a la región URR del HPV tipo 18 no presenta cambios al compararla con la reportada por O'Connor y cols.<sup>105</sup>, a pesar de que la variedad del HPV tipo 18 aquí ensayada es de la variedad europea, y la que describen en el artículo de O'Connor y cols. es de la variedad prototipo del HPV tipo 18, es decir, de la variedad Amerindia.

El presente estudio indica que los cambios nucleotídicos presentes en la región URR de la variedad asiático-americana del HPV-16 no afectan la especificidad transcripcional, pero si la potencia. La región URR de la variedad asiático-americana del HPV-16 presenta un incremento en la potencia transcripcional de 3 y 2.5 veces comparada con la variedad europea del HPV-16 y con la variedad europea del HPV-18, respectivamente. La región URR de la variedad europea del HPV-18 presenta un incremento en potencia transcripcional de 0.2 veces en comparación con la variedad europea del HPV-16. Los cambios nucleotídicos presentes en los dos primeros sitios de unión del elemento de respuesta a glucocorticoides en la región URR de la variedad asiático-americana del HPV-16 no afectan la respuesta a dexametasona. Las regiones URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV-16 y de la variedad europea del HPV-18 presentan el mismo nivel de inducción transcripcional con dexametasona.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES

1. Los cambios nucleotídicos presentes en la región URR de la variedad asiático-americana del HPV-16 no afectan la especificidad transcripcional, pero si la potencia.
2. La región URR de la variedad asiático-americana del HPV-16 presenta un incremento en la potencia transcripcional de 3 y 2.5 veces comparada con la variedad europea del HPV-16 y con la variedad europea del HPV-18, respectivamente.
3. La región URR de la variedad europea del HPV-18 presenta un incremento en potencia transcripcional de 0.2 veces en comparación con la variedad europea del HPV-16.
4. Los cambios nucleotídicos presentes en los dos primeros sitios de unión del elemento de respuesta a glucocorticoides en la región URR de la variedad asiático-americana del HPV-16 no afectan la respuesta a dexametasona.
5. Las regiones URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV-16 y de la variedad europea del HPV-18 presentan el mismo nivel de inducción transcripcional con dexametasona.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hubert WG y Laimins LA. Human papillomavirus type 31 replication modes during the early phases of the viral life cycle depend on transcriptional and posttranscriptional regulation of E1 and E2 expression. *J Virol.* 2002; 76: 2263-2273.
2. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1288: F55-F78.
3. Gissmann L y zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (Condylomata acuminata). *Int J Cancer.* 1980; 25: 605-609.
4. Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulon HJ, zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J Virol.* 1982; 44: 393-400.
5. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; 80: 3812-3815.
6. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 1984; 3: 1151-1157.
7. Myers, G., Lu, H., Calef, C., and Leitner, T., Heterogeneity of Papillomaviruses. *Seminars in Cancer Biology* 1997; 7: 349-358.
8. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87: 796-802.
9. Das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, Luthra UK. Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol.* 1992; 73: 2327-2336.
10. Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C and Singer A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer.* 1996; 69: 364-368.
11. Lowy D.R., Howley P.M., Papillomaviruses and their replication, En: Fields Virology, Fields B.N., Peter M., Howley M.D., Diane E.G. Eds., 4rd Edition, *Lippincott-Williams & Wilkins Publishers*, 2001. pp 2197-2229.
12. zur Hausen H, Schneider A. The role of papillomavirus in human anogenital cancer. En: Salzman NP, Howley PM, ed. *The Papovaviridae.* New York: *Plenum Press* 1987: 245-263.

13. zur Hausen H. Papillomaviruses as carcinomaviruses. En : Klein G, ed. *Advances in viral oncology*. New York: *Raven Press* 1989; 8: 1-26.
14. Chow L, Hirochika H, Nasser M, Stoler M, Wolinsky S, Chin M et al. Human papillomavirus gene expression in papillomaviruses. *Cancer cells* 1987; 5: 55-72.
15. Alvarez-Salas LM, Velazquez A, Lopez-Bayghen E, Woodworth CD, Garrido E, Gariglio P, DiPaolo JA. Transcriptional repression in normal human keratinocytes by wild-type and mutant p53. *Cancer Lett.* 1995; 91: 85-92.
16. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, et al. Structures of bovine and human papillomaviruses: Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 1991; 60: 1445-1456.
17. Strubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: Active and latent phases. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 379-386.
18. Howley P.M., Lowy D.R. Papillomaviruses, En: *Fields Virology*, Fields B.N., Peter M., Howley M.D., Diane E.G. Eds., 4rd Edition, *Lippincott-Williams & Wilkins Publishers*, 2001. pp 2231-2264.
19. Chiang CM, Dong G, Broker TR, Chow LT. Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J Virol.* 1992; 66: 5224-5231.
20. Kuo SR, Liu JS, Broker TR, Chow LT. Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J Biol Chem.* 1994; 269: 24058-24065.
21. Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem.* 1999; 274: 2696-2705.
22. Liu JS, Kuo SR, Broker TR, Chow LT. Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J Biol Chem.* 1994; 269: 24058-24065.
23. Swindle CS, Zou N, Van Tine BA, Shaw GM, Engler JA, Chow LT. Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J Virol.* 1999; 73: 1001-1009.
24. B. A. Spalholz, Y. C. Yang, and P. M. Howley. Transactivation of a Bovine Papilloma Virus Transcriptional Regulatory Element by the E2 Gene Product. *Cell* 1985; 42: 183.
25. Phelps WC, Howley PM. Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *J Virol.* 1987; 61: 1630-1638.

26. McBride AA, Schlegel R, Howley PM. The carboxy-terminal domain shared by the bovine papillomavirus E2 transactivator and repressor proteins contains a specific DNA binding activity. *EMBO J.* 1988; 7: 533-539.
27. Thierry F, Yaniv M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J.* 1987; 6: 3391-3397.
28. Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol.* 1999; 80: 1035-1043.
29. Bernard B, Bailly C, Lenoir M, Darmon M, Thierry F and Yaniv M. The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol.* 1989; 63: 4317-4324.
30. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* 1991 Aug 29;352(6338):824-7.
31. Bubb V, McCance DJ, Schlegel R. DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation of its encoded protein. *Virology.* 1988; 163: 243-246.
32. Horwitz BH, Burkhardt AL, Schlegel R, DiMaio D. 44-amino-acid E5 transforming protein of bovine papillomavirus requires a hydrophobic core and specific carboxyl-terminal amino acids. *Mol Cell Biol.* 1988; 8: 4071-4078.
33. Burkhardt A, Willingham M, Gay C, Jeang KT, Schlegel R. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology.* 1989; 170: 334-339.
34. P. Martin, W. C. Vass, J. T. Schiller, D. R. Lowy, and T. J. Velu. The Bovine Papillomavirus E5 Transforming Protein Can Stimulate the Transforming Activity of EGF and CSF-1 Receptors. *Cell* 1989; 59: 21.
35. Goldstein DJ, Finbow ME, Andresson T, McLean P, Smith K, Bubb V, Schlegel R. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16K component of vacuolar H(+)-ATPases. *Nature.* 1991; 352: 347-349.
36. Goldstein DJ, Schlegel R. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus binds to a 16 kd cellular protein. *EMBO J.* 1990; 9: 137-145.
37. Goldstein DJ, Andresson T, Sparkowski JJ, Schlegel R. The BPV-1 E5 protein, the 16 kDa membrane pore-forming protein and the PDGF receptor exist in a complex that is dependent on hydrophobic transmembrane interactions. *EMBO J.* 1992; 11: 4851-4859.
38. Cohen BD, Lowy DR, Schiller JT. The conserved C-terminal domain of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein can associate with an alpha-adaptin-like molecule: a possible

- link between growth factor receptors and viral transformation. *Mol Cell Biol.* 1993; 13: 6462-6468.
39. Cohen BD, Goldstein DJ, Rutledge L, Vass WC, Lowy DR, Schlegel R, Schiller JT. Transformation-specific interaction of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein with the platelet-derived growth factor receptor transmembrane domain and the epidermal growth factor receptor cytoplasmic domain. *J Virol.* 1993; 67: 5303-5311.
  40. Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol.* 1993; 67: 6170-6178.
  41. Greenfield I, Nickerson J, Penman S, Stanley M. Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88: 11217-11221.
  42. Fujikawa K, Furuse M, Uwabe K, Maki H, Yoshie O. Nuclear localization and transforming activity of human papillomavirus type 16 E7-beta-galactosidase fusion protein: characterization of the nuclear localization sequence. *Virology.* 1994; 204: 789-793.
  43. Smotkin D, Wettstein FO. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83: 4680-4684.
  44. Androphy EJ, Hubbert NL, Schiller JT, Lowy DR. Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *EMBO J.* 1987; 6: 989-992.
  45. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 1991; 10: 4129-4135.
  46. Hubbert NL, Sedman SA, Schiller JT. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol.* 1992; 66: 6237-6241.
  47. Gage JR, Meyers C, Wettstein FO. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol.* 1990; 64: 723-730.
  48. Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *J Virol.* 1991; 65: 292-298.
  49. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol.* 1992; 66: 2125-2134.
  50. Crook T, Wrede D, Vousden KH. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene.* 1991; 6: 873-875.



51. Crook T, Wrede D, Tidy J, Scholefield J, Crawford L, Vousden KH. Status of c-myc, p53 and retinoblastoma genes in human papillomavirus positive and negative squamous cell carcinomas of the anus. *Oncogene*. 1991; 6: 1251-1257.
52. Crook T, Wrede D, Tidy JA, Mason WP, Evans DJ, Vousden KH. Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human-papillomavirus-negative tumours. *Lancet*. 1992; 339: 1070-1073.
53. Grossman SR, Laimins LA. E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene*. 1989; 4: 1089-1093.
54. Kämmer C, Tommasino M, Syrjanen S, Delius H, Hebling U, Warthorst U, Pfister H, Zehbe I. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *Br J Cancer*. 2002; 86: 269-273.
55. Kissel'jov FL. Virus-Associated Human Tumors: Cervical Carcinomas and Papilloma Viruses. *Biochemistry (Moscow)* 2000; 65: 68-77
56. Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol*. 1989; 63: 1404-1407
57. Phelps WC, Yee CL, Munger K, Howley PM. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*. 1988; 53: 539-547.
58. Phelps WC, Bagchi S, Barnes JA, Raychaudhuri P, Kraus V, Munger K, Howley PM, Nevins JR. Analysis of trans activation by human papillomavirus type 16 E7 and adenovirus 12S E1A suggests a common mechanism. *J Virol*. 1991; 65: 6922-6930.
59. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol*. 1991; 65: 473-478.
60. Barbosa MS, Schlegel R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene*. 1989; 4: 1529-1532.
61. Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NL, Haas JA, Lowy DR, Schiller JT. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol*. 1991; 65: 4860-4866.
62. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989; 243: 934-937.
63. Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*. 1989; 63: 4417-4421.

64. Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC, Nevins JR. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89: 4549-4553.
65. Morozov A, Shiyonov P, Barr E, Leiden JM, Raychaudhuri P. Accumulation of human papillomavirus type 16 E7 protein bypasses G1 arrest induced by serum deprivation and by the cell cycle inhibitor p21. *J Virol*. 1997; 71: 3451-3457.
66. Ruesch MN, Laimins LA. Initiation of DNA synthesis by human papillomavirus E7 oncoproteins is resistant to p21-mediated inhibition of cyclin E-cdk2 activity. *J Virol*. 1997; 71: 5570-5578.
67. Broudy VC, Lin NL, Buhring HJ, Komatsu N, Kavanagh TJ. Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer. *Blood*. 1998; 91: 898-906.
68. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89: 12180-12184.
69. Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, Lowy DR, Schiller JT. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol*. 1993; 67: 6929-6936.
70. Christensen ND, Hopfl R, DiAngelo SL, Cladel NM, Patrick SD, Welsh PA, Budgeon LR, Reed CA, Kreider JW. Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *J Gen Virol*. 1994; 75: 2271-2276.
71. Le Cann P, Coursaget P, Lochmann S, Touze A. Self-assembly of human papillomavirus type 16 capsids by expression of the L1 protein in insect cells. *FEMS Microbiol Lett*. 1994; 117: 269-274.
72. Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol*. 1998; 72: 142-150.
73. Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A and Jenison SA. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol*. 1995; 69: 7743-7753.
74. Chong T, Chan WK, Bernard HU. Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP1, steroid receptors and a possibly novel transcription factor, PVF: a model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18: 465-470.

75. Chong T, Apt D, Gloss B, Isa M, Bernard HU. The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol.* 1991; 65: 5933-5943.
76. Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, Howley P. Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J Virol.* 1992; 66: 3740-3748.
77. Apt D, Chong T, Liu Y, Bernard HU. Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 1993; 67: 4455-4463.
78. SH Tan, LE Leong, PA Walker, and HU Bernard. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIIID. *J. Virol.* 1994; 68: 6411-6420.
79. MJ O'Connor, SH Tan, CH Tan, and HU Bernard. YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J. Virol.* 1996; 70: 6529-6539.
80. Garcia-Carranca A, Thierry F, Yaniv M. Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J Virol.* 1988; 62: 4321-4330.
81. Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol.* 2000; 81: 1975-1981.
82. Gloss B, Bernard H, Seedorf K and Klock R. The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J.* 1987; 6: 3735-3743.
83. Cripe TP, Alderborn A, Anderson RD, Parkkinen S, Bergman P, Haugen TH, Pettersson U, Turek LP. Transcriptional activation of the human papillomavirus-16 P97 promoter by an 88-nucleotide enhancer containing distinct cell-dependent and AP-1-responsive modules. *New Biol.* 1990; 2: 450-463.
84. Gius D, Grossman S, Bedell MA, Laimins LA. Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J Virol.* 1988; 62: 665-672.
85. Romanczuck H and Howley P. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 3159-3163.
86. Bauknecht T, Angel P, Royer HD, zur Hausen H. Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J.* 1992; 11: 4607-4617.
87. May M, Dong XP, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG, Pfister H. The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J.* 1994; 13: 1460-1466.

88. Hoppe-Seyler F, Butz K and zur Hausen H. Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. *J Virol.* 1991; 65: 5613-5618.
89. Hoppe-Seyler F, Butz K. Activation of human papillomavirus type 18 E6-E7 oncogene expression by transcription factor Sp1. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 6701-6706.
90. Medina-Martinez O, Morales-Peza N, Yaniv M, Garcia-Carranca A, Thierry F. A single element mediates glucocorticoid hormone response of HPV18 with no functional interactions with AP1 or hbrm. *Virology.* 1996; 217: 392-396.
91. Mack D and Laimins L. A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88: 9102-9106.
92. Yukawa K, Butz K, Yasui T, Kikutani H, Hoppe-Seyler F. Regulation of human papillomavirus transcription by the differentiation-dependent epithelial factor Epoc-1/skn-1a. *J Virol.* 1996; 70: 10-16.
93. Chong T, Apt D and Gloss B. J The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol.* 1991; 65: 5933-5943.
94. Ishiji T, Lace M, Purkkinen S, Anderson R, Haugen T, Cripe T, Xiao J, Davidson I, Chambon P and Turek L. Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J.* 1992; 11: 2271-2281.
95. Wheeler CM, Yamada T, Hildesheim A and Jenison SA. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 11-19.
96. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol.* 1997; 71: 2463-2472.
97. Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, Bernard HU. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 1765-1772.
98. Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol.* 1993; 67: 6413-6423.

99. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, Kiviat NB. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89: 796-802.
100. Xi LF, Critchlow CW, Wheeler CM, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Hawes SE, Surawicz C, Goldbaum G, Holmes KK, Kiviat NB. Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Res.* 1998; 58: 3839-3844.
101. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* 1998; 58: 829-833.
102. Stoppler MC, Ching K, Stoppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol.* 1996; 70: 6987-6993.
103. Shillitoe EJ, Noonan S. Strength and specificity of different gene promoters in oral cancer cells. *Oral Oncol.* 2000 Mar;36: 214-220.
104. O'Connor MJ, Tan SH, Tan CH, Bernard HU. YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J Virol.* 1996 Oct;70: 6529-6539.
105. O'Connor MJ, Chan SY, Bernard HU. Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. Institute of Molecular Cell Biology, National University of Singapore. HPV Database Oct 95. III-21 – III-39.
106. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep;189: 12-19.
107. Kurvinen K, Yliskoski M, Saarikoski S, Syrjanen K, Syrjanen S. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *Eur J Cancer.* 2000 Jul;36: 1402-1410.
108. Swift FV, Bhat K, Youngusband HB, Hamada H. Characterization of a cell type-specific enhancer found in the human papilloma virus type 18 genome. *EMBO J.* 1987 May;6: 1339-1344.
109. Cid A, Auewarakul P, Garcia-Carranca A, Ovseiovich R, Gaissert H, Gissmann L. Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J Virol.* 1993 Nov;67: 6742-6752.
110. Stunkel W, Huang Z, Tan SH, O'Connor MJ, Bernard HU. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 repress or activate the E6 promoter, depending on the physical state of the viral DNA. *J Virol.* 2000 Mar;74: 2489-2501.

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

111. HPV Sequence Database. Los Alamos National Laboratory. Sequences of HPV-16 variants. OCT 95I-A9-62 – I-A9-149.
112. Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Pfister H, Tay SK, ter Meulen J, Villa LL, Bernard HU. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol.* 1993 Nov;67: 6424-6231.

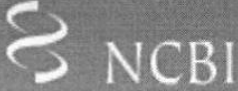
# APÉNDICES





## ANEXO 2

ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN URR DE LA VARIEDAD ASIÁTICO-AMERICANA DEL HPV-16  
UTILIZADA




```

>gi|4092490|gb|AF067027.1|AF067027 Human papillomavirus type 16 isolate H033 long control
region, complete sequence
Length = 863

Score = 1255 bits (633), Expect = 0.0
Identities = 633/633 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1  tatatttgctacatntttgTTTTGTTTTATATATACTATATTTTGTAGCGCCAGCGGCCA 60
          |||
Sbjct: 231 tatatttgctacatntttgTTTTGTTTTATATATACTATATTTTGTAGCGCCAGCGGCCA 290

Query: 61  ttttgtagcttcaaccgaattcggttgcatgctttttggcacaaactgtatnttttttaa 120
          |||
Sbjct: 291 ttttgtagcttcaaccgaattcggttgcatgctttttggcacaaactgtatnttttttaa 350

Query: 121 tagttctatgtcagcaactatagtttaaactgtacgtttcctgcttgccatgctgcca 180
          |||
Sbjct: 351 tagttctatgtcagcaactatagtttaaactgtacgtttcctgcttgccatgctgcca 410

Query: 181 aatccctgTTTTCTGACCTGCACGTGCTTGCCAACCATTCATTGTTTTTACTGCAC 240
          |||
Sbjct: 411 aatccctgTTTTCTGACCTGCACGTGCTTGCCAACCATTCATTGTTTTTACTGCAC 470

Query: 241 tatgtgcaactactgaatcactatgtacattgtgtcatataaaataaattactatgccc 300
          |||
Sbjct: 471 tatgtgcaactactgaatcactatgtacattgtgtcatataaaataaattactatgccc 530

Query: 301 aacgccttaaataccgctgtaggcacatnttttggttGTTTAACTCACCTAATTGC 360
          |||
Sbjct: 531 aacgccttaaataccgctgtaggcacatnttttggttGTTTAACTCACCTAATTGC 590

Query: 361 atagttggcataagggtttaacttttaaggccaactaaatgtcaccttagttcatacatg 420
          |||
Sbjct: 591 atagttggcataagggtttaacttttaaggccaactaaatgtcaccttagttcatacatg 650

Query: 421 aactgtgtaaagggttagtcatacatggttcatttGTAaaaactgcacatgggtgtgtgcaa 480
          |||
Sbjct: 651 aactgtgtaaagggttagtcatacatggttcatttGTAaaaactgcacatgggtgtgtgcaa 710

Query: 481 accgTTTTGGGTTACACATTTACAAGGAACCTTATATAATAACTAACTACAATAATTC 540
          |||
Sbjct: 711 accgTTTTGGGTTACACATTTACAAGGAACCTTATATAATAACTAACTACAATAATTC 770


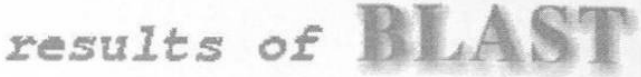
Query: 541 atgtataaaactaaggcgtaaccgaaatcggttgaaccgaaaccggttagtataaaagc 600
          |||
Sbjct: 771 atgtataaaactaaggcgtaaccgaaatcggttgaaccgaaaccggttagtataaaagc 830

Query: 601 agacatntttatgcaCcaaaagagaactgcaatg 633
          |||
Sbjct: 831 agacatntttatgcaCcaaaagagaactgcaatg 863

```

## ANEXO 3

## ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN URR DE LA VARIEDAD EUROPEA DEL HPV-18 UTILIZADA

>gi|2052453|gb|U89349.1|HPU89349 Human papillomavirus type 18 variant, partial sequence  
Length = 5210

Score = 1241 bits (626), Expect = 0.0  
Identities = 626/626 (100%)  
Strand = Plus / Plus

```

Query: 1      tgtttggtatgggtgttcttgggctatatattgtcctgtatttcaagttataaa 60
             ||||| | |||||  ||  ||||||||| | ||||||||| ||
Sbjct: 1609   tgtttggtatgggtgttcttgggctatatattgtcctgtatttcaagttataaa 1668

Query: 61     actgcacaccttacagcatccattttatcctacaatcctccattttgctgtgcaaccgat 120
             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
Sbjct: 1669   actgcacaccttacagcatccattttatcctacaatcctccattttgctgtgcaaccgat 1728

Query: 121    ttcggttgcctttggcttattgtttgtggtttctgcacaatacagtacgctggcactatt 180
             |  || |  ||| |||||  ||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
Sbjct: 1729   ttcggttgcctttggcttattgtttgtggtttctgcacaatacagtacgctggcactatt 1788

Query: 181    gcaaaatttaatctttgggcaactgctcctacatattttgaaccattggcgcgcctcttt 240
             ||  | | || ||| || | | |  ||||||||| ||||||||| |||||||||
Sbjct: 1789   gcaaaatttaatctttgggcaactgctcctacatattttgaaccattggcgcgcctcttt 1848

Query: 241    ggcgcatacaaggcgcacctggtattagtcattttcctgtccagggtgcgctacaacaatt 300
             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
Sbjct: 1849   ggcgcatacaaggcgcacctggtattagtcattttcctgtccagggtgcgctacaacaatt 1908

Query: 301    gcttgcataactatatccactccctatgtaataaaaactgcttttaggcacatattttagt 360
             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
Sbjct: 1909   gcttgcataactatatccactccctatgtaataaaaactgcttttaggcacatattttagt 1968

Query: 361    ttgttttacttaagctaattgcatacttggtgtgacaactactttcatgtccaacatt 420
             ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct: 1969   ttgttttacttaagctaattgcatacttggtgtgacaactactttcatgtccaacatt 2028

Query: 421    ctgtctacccttaacatgaactataatagactaagctgtgcatacatagtttatgcaac 480
             ||| |  || |  | |||| | |  |  ||||||||| ||||||| |||||
Sbjct: 2029   ctgtctacccttaacatgaactataatagactaagctgtgcatacatagtttatgcaac 2088

Query: 481    cgaaataggttggcagcacatactatacttttcattaatacttttaacaattgtagtat 540
             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
Sbjct: 2089   cgaaataggttggcagcacatactatacttttcattaatacttttaacaattgtagtat 2148

Query: 541    ataaaaaggagtaaccgaaaacggtcgggaccgaaaacggtgtatataaaagatgtga 600
             ||||| || ||||||| || | ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||
Sbjct: 2149   ataaaaaggagtaaccgaaaacggtcgggaccgaaaacggtgtatataaaagatgtga 2208

Query: 601    gaaacacaccacaataccatggcgcg 626
             ||||| || ||||| | | |||
Sbjct: 2209   gaaacacaccacaataccatggcgcg 2234

```



