UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

REGULACION DEL PROMOTOR DEL GEN DE IL-10 POR PAPILOMAVIRUS HUMANO EN CELULAS EPITELIALES TRANSFORMADAS DERIVADAS DE CERVIX

PRESENTA

BIOL. VICTOR HUGO BERMUDEZ MORALES

COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., MEXICO
JUNIO DEL 2000

TM
RC280
.U8
B47
2000
c.1

1080124394

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ESTIMACION DEL RECEPTOR DEL GEN DE LDL POR PAPILOMAVIRUS HUMANO EN CELULAS EPITELIALES TRANSFORMADAS DERIVADAS DE CERVIX.

PRESENTA

BIOL. VICTOR HUGO BERMUDEZ MORALES

COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., MEXICO
JUNIO DEL 2000

TM
RC280
.U8
B47
2000

B U Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

REGULACION DEL PROMOTOR DEL GEN DE IL-10 POR PAPILOMAVIRUS HUMANO EN CELULAS EPITELIALES TRANSFORMADAS DERIVADAS DE CERVIX

PRESENTA

BIOL. VICTOR HUGO BERMUDEZ MORALES

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN INMUNOBIOLOGIA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L. MEXICO

JUNIO DEL 2000

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

REGULACION DEL PROMOTOR DEL GEN DE IL-10 POR PAPILOMAVIRUS HUMANO EN CELULAS EPITELIALES TRANSFORMADAS DERIVADAS DE CERVIX

COMISION DE TESIS

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Presidente

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dr. Reyes S. Taméz Guerra
Vocal

Dr. Vicente Madrid Marina
Vocal

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L. MEXICO JUNIO DEL 2000

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

REGULACION DEL PROMOTOR DEL GEN DE IL-10 POR PAPILOMAVIRUS HUMANO EN CELULAS EPITELIALES TRANSFORMADAS DERIVADAS DE CERVIX

DIRECCION DE TESIS

DIRECTOR INTERNO

DR. JUAN MANUEL ALCOCER GONZALEZ

DIRECTOR EXTERNO

DR. VICENTE MADRID MARINA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L. MEXICO

JUNIO DEL 2000

AREA DE TRABAJO

El presente trabajo se desarrolló en:

Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencia biológicas de la UANL
Bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Alcocer González

Laboratorio de Inmunología y Virología del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, INSP. Bajo la dirección del Dr. Vicente Madrid Marina

CREDITOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca de maestría, cubriendo los gastos de inscripción, materias, seguro y manutención, que me permitió lograr la obtención de este grado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por haberme aceptado en su programa de postgrado en la Facultad de Ciencias Biológicas.

Al Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas del INSP, por brindarme la posibilidad de realizar una estancia de trabajo en el laboratorio de Inmunología y Virología Molecular, bajo la dirección del Dr. Vicente Madrid Marina.

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado en primer lugar a Dios por permitirme alcanzar una meta más en mi vida profesional. También a mi familia que aunque no estoy con ellos, recibo todo su cariño y apoyo para seguir adelante, creo que sin ellos no podría haber realizado este pequeño sueño. Así como a mi hermana que es una parte muy importante de la familia que tengo, gracias dios por esté verdadero regalo.

Gracias, Señor.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar les doy gracias a mis padres: Jose Miguel Bermúdez Ceja e Irma Morales Calixto, por apoyarme en todo momento en mi vida personal y profesional, creo que la mejor herencia que me han dado es mi preparación profesional, la libertad y el apoyo incondicional para realizar mis sueños.

A mis hermanos por su apoyo que aunque soy la oveja que esta fuera de casa, ellos están para apoyarme y guiarme con su ejemplo. Gracias a todos.

Agradezco al Dr. Juan Manuel Alcocer y por invitarme a realizar los estudios de postgrado en la Universidad Autónoma de Nuevo León, y por permitirme formar parte de su grupo de investigación y sobre todo por aguantarme.

Agradezco a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y al Dr. Reyes Taméz, por abrirme las puertas de su laboratorio y por apoyarme en la realización del trabajo experimental.

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Vicente Madrid Marina por ser una de las personas más generosas que he conocido. Gracias por escucharme, por que cuento con un gran amigo que no importando el lugar donde me encuentre siento su apoyo incondicional y sobre todo por creer en mi.

Agradezco a la familia Madrid por haberme abierto las puertas de su hogar para conmigo. Creo que soy muy afortunado en conocer gente como ustedes.

Agradezco al QBP. Angel Rubalcaba por que cuando yo llegue a Monterrey tu fuiste la persona que me enseño y ayudo en el trabajo experimental.

Con afecto agradezco al Dr. Oskcar Peralta y al Q. Hubaldo por su valiosa ayuda en la realización de los análisis de EMSA del trabajo experimental.

Doy las gracias a la M en C. Juany Reyna por ser una de las personas del laboratorio que fueron claves durante la maestría y sobre todo por ser mi amiga.

Gracias al Dr. Pablo Zapata y al QBP. Herminio Fuentes por su valiosa ayuda durante mi estancia en el laboratorio, ya que en el instante que necesite algo estuvieron para apoyarme.

Agradezco a la Dra. Diana Resendez por su apoyo y guiarme en los problemillas que surgen durante el trabajo experimental.

Agradezco a la Dra. Liliana Guzmán Rojas por su apoyo y por su gran virtud de generosidad: Te quiero mucho Lili.

Agradezco a mi cuate el Biol. Luis G. Bermúdez por su ayuda durante todo el postgrado, gracias Luisin.

Gracias a todos los que forman parte del laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, por que de alguna u otra forma me apoyaron, nunca tuve una negativa para conmigo.

Gracias al Dr. Martín Canizal del departamento de bioquímica de la Facultad de Medicina, por su valiosa ayuda para la realización de este trabajo experimental.

Gracias a todos mis amigos y compañeros del laboratorio: QBP. Itza Iuna, QBP, Nelly González, QBP. Angel Rubalcaba, QBP. Sigifredo Lazcano, al Med. Daniel Molina, QBP. Martha Garza, QBP. Janete Burget, M en C. Juany Reyna, Nayma Cortes, Biol. Luis Bermúdez. M en C. Julian. M en C. Moisés Franco, QBP. Laura Hernández, QBP. Linda Velma, M en C. Ester Treviño, M en C. Irma Martinéz, M en C. Eugenio Roman, M en C. Leonardo Cartillo, M en C. Jose Luis Mendez, Dra. Lidia Rivera, QBP. Herminio Fuentes, Sabino Sandoval, Martha Fraustro, Miriam Cedillo, Dr. Pablo Zapata, DR. Roberto Montes de Oca. A las secretarias: Ileana Cavazos, Beatriz Reyna. A don Cato Reta, Quijano, Berta Morales y Perita Velmares.

Gracias a mis amigos y compañeros del laboratorio del Dr. Madrid: Dr. Orkar Peralta, M en C. Carmen Barbosa, Biol.. Margarita Bahena, Biol. Cinthya Díaz, Q. Hubaldo. A todas las Chapanecas: Daisy, Flor, Alma y Arseni.

Especialmente a todos mis compañeros de la maestría: Natalia Cerutti, Guadalupe Rojas, Ivon Lechuga, Enriqueta Martínez, Beatriz Gómez, Miriam Elias, Rubi Salazar, Porfiria, Miriam Rutiago, Genoveva Alvarez y Sigifredo Lazcano.

INDICE GENERAL

PORTADA I
COMISION DE TESIS II
DIRECCION TESIS III
AREA DE TRABAJO IV
CREDITOS V
DEDICATORIA VI
AGRADECIMIENTOS VII
INDICE GENERAL IX
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS XII
ABREVIATURAS XIV

RESUMEN 1
INTRODUCCION 2
ANTECEDENTES
I. ASPECTO GENERALES DEL CANCER CERVICAL
1.1 ASOCIACION DEL HPV CON CANCER CERVICAL 4
1.2 INFECCION DEL HPV EN CELULAS EPITELIALES 5
1.3 PROCESO DE TRANSFORMACION POR HPV 7
II. ORGANIZACION Y REGULACION GENETICA DE LOS PAPILOMAVIRUS
2.1 BIOLOGIA MOLECULAR DE PAPILOMAVIRUS 8
2.2 PROTEINAS DE TRANSCRIPCION TEMPRANA (E1, E2 ,E4, E5, E6 y E7) 10
2.3 PROTEINAS DE LA CAPSIDE VIRAL (L1 y L2) 18
2.4 REGION LARGA DE CONTROL (LCR) 19
2.5 ELEMENTOS DE TRANSCRIPCION BASAL 22
2.6 TRANSCRIPCION TEJIDO ESPECIFICA 23
III. ESTRUCTURA DEL GEN Y PROTEINA DE E2
3.1 FUNCIONES BIOLOGICAS DE E2 24
3.2 PRODUCTOS DEL GEN 25
3.3 ESTRUCTURA DE LA PROTEINA 26
3.4 FOSFORILACION 27
3.5 LOCALIZACION 27
3.6 SITIOS DE UNION A DNA 28
3.7 DIMERIZACION 29

3.8 TRANSACTIVACION 30
3.9 REPRESION TRANSCRIPCIONAL 30
3.10 INTERACCION CON PROTEINAS CELULARES 31
3.11. REPLICACION 31
IV. RESPUESTA INMUNE A LA INFECCION POR PAPILOMAVIRUS
4.1 RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL 33
4.2 CITOCINAS Y CANCER 37
V. INTERLEUCINA IL-10
5.1 ESTRUCTURA DEL GEN HUMANO Y DE RATON 39
5.2 REGION REGULADORA DE IL-10 41
5.3 ESTRUCTURA DE LA PROTEINA IL-10 43
5.4 HOMOLOGIA CON EL VIRUS DE EPSTEIN BARR 45
5.5 CELULAS QUE EXPRESAN IL-10 45
5.6 ACTIVIDADES BIOLOGICAS DE IL-10 46
5.7 CITOCINAS EN CANCER CERVICAL 48
IMPORTANCIA 49
ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACION 49
HIPOTESIS 50
OBJETIVO GENERAL 50
OBJETIVOS ESPECIFICOS 50
REACTIVOS Y EQUIPO 51
METODOS
1. DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS 54
2. AMPLIFICACION DE LA REGION REGULADORA DEL GEN DE hIL-10 54
3. CLONACION EN EL VECTOR pGEM-T 54
4. SUB-CLONACION EN EL VECTOR pGL-2 BASIC 55
5. ANALISIS DE DELECIONES DE LA REGION REGULADORA DEL GEN DE IL-10 55
6. CULTIVO DE LINEAS CELULARES 56
7. TRANSFECCION EN CELULAS C33-A 56
8. CUANTIFICACION DE LUMINISCENCIA 56
9. INDUCCION Y PURIFICACION DE LA PROTEINA GST-E2 DE HPV-31 57
10. WESTERN BLOTT 57
11. PREPARACION DE EXTRACTOS NUCLEARES 58
12. SINTESIS Y MARCAIE DE OLIGONUCLEOTIDOS 58
13. ELECTROFORESIS DE MOVILIDAD RETARDADA (EMSA) 58
RESULTADOS 60
FUGURAS 67
DISCUSION 85
CONCLUSIONES 92

PERSPECTIVAS 93
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 94
APENDICE 121

INDICE DE FIGURAS

1. Representación de la infección de HPV. 6
2. Representación esquemática de la organización genómica de HPV 16 y proteínas virales. 9
3. Proteína E6 de HPV 16. 15
4. Diagrama del LCR de HPV 16. 20
5. Estructura de las tres proteínas de E2 de BPV1. 26
6. Modelo de la estructura del dímero de E2 de HPV 31 y su unión a DNA. 27
7. Degradación, transporte y presentación de los antígenos de HPV al MHC clase I. 34
8. Degradación, transporte y presentación de los antígenos de HPV al MHC clase II. 35
9. Respuesta inmune antitumoral. 38
10. Localización cromosomal del gen de IL-10. 40
11. Estructura esquemática de la proteína hIL-10. 43
12. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de IL-10 humano, murino, ratón y porcino. 45
13. Secuencia de la región reguladora del gen de hIL-10. 67
14. Amplificación de la región reguladora del gen de hIL-10. 68
15. Patrón de restricción de la región reguladora del gen de hIL-10. 69
16. Secuencia de las primeras 530 pb de la región 5´ distal de la región reguladora del gen de hIL-10. 70
17. Elementos de regulación transcripcional presentes en la región reguladora del gen de hIL-10. 71
18. Clonación de la región reguladora del gen de hIL-10 en el vector pGEM-T. 72
19. Clonación de la región reguladora del gen de hIL-10 en el vector pGL-2 vector. 73
20. Análisis de deleciones de la región reguladora del gen de hIL-10 en el vector pGL-2 vector. 74
21. A).Análisis de funcionalidad: Transfección en células C33-A. 75
22. B). Análisis de funcionalidad: Transfección en células C33-A. 76
23. Caracterización de la construcción pGEX-31E2. 77
24. Inducción y determinación de la proteína quimérica GST-31E2 de HPV 31. 78
25. Purificación de la proteína quimérica GST-E2 de HPV 31. 79
26. Ensayo de EMSA utilizando las sondas E2HPV, E2TGF-β y E2IL-10 con extractos nucleares de células HeLa. 80

27. Competencia heteróloga con la sonda E2HPV utilizando un gradiente de poli dI-dC y extractos nucleares de la línea celular HeLa. 81
28. Ensayo de EMSA utilizando las sondas E216 y E2IL-10 con extractos nucleares de la línea celular HeLa. 82
29. Ensayo de EMSA utilizando las sondas E2HPV, E216 y E2IL-10 con extractos nucleares de las líneas celulares HeLa y C33-A. 83
30. Ensayo de EMSA utilizando la sonda E2Il-10 con la proteína quimérica GST-E2 de HPV. 84
31. Niveles de expresión de IL-10, E2, E6 y E7 durante la evolución del cáncer de cervix. 89
32. Vías por las cuales se puede inducir la expresión de la hIL-10 en cáncer cervical. 91

INDICE DE TABLAS

1. Proteínas que interaccionan con E6 de HPV. 16
2. Secuencias putativas de sitios de unión de factores de transcripción en el LCR de HPVs. 22
3. Número de células positivas par los marcadores de superficie CD4+ y CD8+. 36
4. Secuencias de control de la transcripción del gen de hIL-10. 42
5. Secuencias de control de la transcripción del gen de mIL-10. 42
6. Secuencias de oligonucleótidos. 59
7. Actividad de E2, E5, E6 y E7 de HPV en la regulación de promotores putativos. 90

ABREVIATURAS

Ad	Adenovirus
APC	Célula presentadora de antígeno
B-1	Linfocito B (Ly-1)
B7	Molécula coestimuladora B7
BCRF-1	Gen BCRF1 del virus de Epstein Barr
bIL-10	Interleucina 10 bovina
BPV	Virus de papiloma bovino
BR2	Segunda señal del dominio de transactivación
CaCu	Cáncer cervico uterino
CD	Antígeno de Diferenciación Celular
cDNA	Cadena complementaria del DNA
CMV	Citomegalovirus
Con A	Concanavalina A
CRE	Elementos de respuesta a AMPc
CRPV	Papilomavirus específico de conejo
CSIF	Factor inhibidor de la síntesis de citocinas
CTL	Linfocito T citotóxico
DMEM	Medio modificado Eagle's Dulbecco's
DNA	Acido deoxiribunucleico
E2 16	Elemento de respuesta a la proteína E2 en el LCR de HPV16
E2HPV	Secuencia consenso para E2 de papilomavirus genitales
E2IL-10	Elemento de respuesta a la proteina E2 en la región reguladora de la IL-10.
EBV	Virus de Epstein Barr
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGF-R	Receptor del factor de crecimiento epidermico
EMSA	Electroforesis de movilidad retardada
EV-HPV	Virus de papiloma humano asociado a epidermoplasias verriciformes
G-CSF	Factor estimulante de granulocitos
GRE	Elementos de respuesta a glucocorticoides
GST	Glutatión-S-Transferasa
hIL-10	Interleucina 10 humana
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HLIS	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado

HPV	Virus de papiloma humano
ICAM	Moléculas de adhesión celular
IL	Interleucina
LCR	Región larga de control
LIS	Lesión intraepitelial escamosa
LLIS	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado
LPS	Lipopolisacaridos
LTR	Región terminal repetida
MAP-Cinasas	Proteínas cinasas activadas en mitosis
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
mIL-10	Interleucina 10 murina
MMLV	Virus de leucemia murina
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	Células asesinas naturales
NLS	Secuencias de localización nuclear
ORF	Marco de lectura abierta
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPA	Proteína de replicación celular RPA
RE	Retículo endoplásmico
rIL-10	Interleucina 10 de rata
RNA	Acído ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
SV40	Virus de simio 40
TAP	Proteínas transportadoras asociadas a la presentación del antígeno
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TcR	Receptor de células T
TFIIB	Factor de transcripción TFIIB
TFIID	Factor de transcripción TFIID
TGF-β	Factor de crecimiento transformate β
TIIF	Factor de transcripción TIIF
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
UV	Luz ultravioleta