



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**EFFECTO DE LAS ONCOPROTEÍNAS E6 Y E7 DEL
VPH16 SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR P1 DEL
GEN DE LA ST6GAL I**

Tesis que para obtener el título de

BIÓLOGA
PRESENTA:

NANCY ORDOÑEZ NUÑEZ

D. EN C. VERÓNICA VALLEJO RUIZ
Directora de Tesis



Febrero de 2015

Este proyecto fue financiado por el CONACyT, No. de proyecto SALUD-2012-01-180219.

Para la realización de esta tesis la alumna contó con una beca del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla

AGRADECIMIENTOS

D. en C. Verónica Vallejo Ruíz por permitirme trabajar en su laboratorio, por la paciencia que demostró tenerme, por la confianza que deposito en mí y por ayudar a mi desarrollo académico.

D. en C. Dolores López Morales por la disposición de su valioso tiempo, por sus comentarios y sugerencias.

D. en C. Lorena Milflores Flores por la disposición de su valioso tiempo, por sus comentarios y sugerencias.

Q. F. B. María Antonia Paredes Tello por su ayuda, disposición, amabilidad y paciencia, por sus valiosos consejos y por su amistad.

D. en C. María de los Ángeles Rivera Juárez por compartir conmigo su conocimiento y por sus comentarios siempre tan objetivos.

Agradezco a todos los integrantes del Centro de Investigación Biomédica de Oriente, del Instituto Mexicano del Seguro Social, en Metepec, Atlixco, Pue., por su gentileza y apoyo para la culminación de mi tesis.

Inconmensurable gratitud a todos mis mentores en la Escuela de Biología, sin ustedes no habría logrado llegar a culminar uno de mis sueños. Con sus conocimientos, disciplina, consejos y amistad tengo las herramientas para desarrollar esta bella y apasionante profesión.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y en mayor grado a la *Comunidad*, gracias porque sin su apoyo y el pago de sus impuestos sería imposible que personas como yo, tuvieran una formación profesional. Del pueblo soy, por el pueblo me forme y con él es mi deber.

“Gracias a la Educación Pública que me preparo durante estos 20 años.”

DEDICATORIA

Quiero agradecer a Dios y a la vida por permitirme llegar a este momento tan especial, donde culminan los sueños que hace años surgieron en mi mente y en mi corazón. Agradezco a Dios el darme la fortaleza para ir en busca de mis sueños, afrontar los retos y las adversidades que la propia vida tiene. Le agradezco a ese ser enigmático el nunca alejarse de mí, el ser mi amigo, de llevarme siempre de la mano, por todos los momentos que me ha regalado y oportunidades que me brindado, de poner en mi camino gente buena que me ha ofrecido su ayuda y de la cual he aprendido cosas en la vida, sé que aún quedan muchas más por aprender y por realizar, solo le pido a Dios que me siga llenando de fortaleza y valor en el camino de la vida.

A la vida quiero agradecerle la gran oportunidad que me ha dado de existir, de cumplir con un sueño, de demostrarme en todo momento, que a pesar de que la vida no está llena de momentos hermosos, son esos momentos difíciles los que nos hacen crecer, madurar y ser mejores humanos.

A mi esposo Rodrigo, por ser una persona muy especial en mi vida, la cual me ha enseñado que no hay cosa más importante que ir en busca de nuestros anhelos, por su comprensión y paciencia conmigo, por sus valiosos consejos, por compartir su vida, por su amistad, por su amor. Gracias por existir.

A mi padre Rafael, por su cariño y apoyo, por estar pendiente de mí, por invertir en mi educación, por ser un ejemplo a seguir, por mostrarme que la fórmula de estudio, disciplina y trabajo conducen a la recompensa del éxito, por sus sabios consejos y enseñanzas. Te amo papá.

A mi madre Alicia, por su enorme apoyo, por los sacrificios que durante años tuvo que hacer para que yo culminara mi licenciatura, por creer en mí e impulsarme a seguir mis sueños, por todos los consejos, por todos los desvelos

que paso para cuidarme de pequeña, por el enorme amor incondicional que me tiene. Te amo mamá.

A mis hermanos Denisse, Bannia y Rafael, por su cariño, por sus consejos llenos de comprensión, por su apoyo incondicional aun en los momentos más difíciles, por sus cuidados, por su desinteresado amor. Por conocer mis debilidades y aun así amarme, por ser mis compañeros a lo largo de la vida.

A mis sobrinos Rodrigo y Dante, por su amor puro e incondicional, por haber llenado mi vida de felicidad, porque aunque pequeños con la calidez de sus abrazos, la sinceridad de su sonrisa y el poder de sus besos, transforman hasta el día más nublado en un destello de luz y alegría.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA.....	4
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN	10
Cáncer.....	10
Cáncer cervicouterino (CaCu)	11
Virus del Papiloma Humano (VPH)	14
Oncoproteínas E6 y E7	17
Alteraciones en cáncer	20
Alteraciones de la glicosilación en cáncer	21
Glicosiltransferasas	23
Sialiltransferasas	24
Gen de la β -galactósido- α 2,6 sialiltransferasa.....	26
El gen <i>c-MYC</i>	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVO.....	35
Objetivo general	35

Objetivos particulares	35
MATERIAL Y MÉTODOS	36
Descripción del modelo de estudio.....	36
<i>Línea celular C33A (VPH negativo)</i>	<i>36</i>
<i>Plásmidos.....</i>	<i>36</i>
Diseño de muestreo	42
<i>Transfección de las líneas celulares</i>	<i>42</i>
Análisis experimental.....	44
<i>Ensayos de luminiscencia.....</i>	<i>44</i>
Análisis estadístico	44
RESULTADOS	45
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA.....	56
ANEXOS.....	61
Descripción de técnicas.....	61
<i>Células competentes.....</i>	<i>61</i>
<i>Cultivo celular.....</i>	<i>61</i>
<i>Ensayo de luciferasa con el Kit Dual Luciferasa Promega</i>	<i>62</i>

<i>Ensayos de transfección con lipofectamina</i>	62
<i>Purificación de ADN plasmídico con el kit Nucleobond Purification Xtra Maxi Plus</i>	63
<i>Siembra de E. coli TOP 10</i>	65
<i>Transformación de células competentes</i>	65
Soluciones	66
<i>Antibiótico para DMEM</i>	66
<i>Cloruro de Calcio (ClCa₂) 0.1 M para células competentes</i>	66
<i>Gel de Agarosa</i>	66
<i>Lipofectamina 2000</i>	66
<i>Medio de cultivo Dulbecco´s Modificado Eagle´s Medium (DMEM)</i>	66
<i>Medio de cultivo Luria Bertani (LB)</i>	67
<i>PBS 1x</i>	67
<i>Stock de Ampicilina</i>	67
<i>Suero Bovino Fetal (SFB)</i>	67
<i>Tripsina EDTA</i>	67
Abreviaturas	68

RESUMEN

En cáncer cervicouterino (CaCu) el nivel del ARNm de la β -galactósido α 2,6 sialiltransferasa (ST6Gal I) se encuentra incrementado. La enzima ST6Gal I es codificada por el gen *siat1*. La expresión de este gen es regulada por tres promotores denominados P1, P2 y P3, a través de los cuales se sintetizan tres isoformas de ARNm (H, X y YZ respectivamente), en CaCu se ha detectado un incremento en la isoforma H, resultado de la actividad del promotor P1. En este trabajo se evaluó el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del Virus del Papiloma Humano tipo 16 (VPH16) sobre la actividad transcripcional del promotor P1 completo de 1137 pb, además de medir su efecto sobre un fragmento de 123 pb de P1 y en ese mismo fragmento se evaluó el efecto de la mutación en el sitio de unión al factor transcripcional c-Myc. La actividad del promotor se midió con ensayos de luminiscencia en las células cervicales C33A que no contienen el genoma del virus del papiloma humano (VPH). La actividad tanto del promotor P1 completo como del fragmento de 123 pb descendió en presencia de las oncoproteínas E6 y E7, pero el efecto siempre fue mayor en presencia de E7. Los resultados mostraron que el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 en el fragmento de 123 pb mutado en el sitio c-Myc disminuyó la actividad alrededor del 90 %. Nuestros resultados indican que la proteína c-Myc participa en la regulación transcripcional de este promotor, sin embargo su relación con el desarrollo de CaCu no ha sido claramente establecida por lo que resulta importante entender los mecanismos de interacción con el promotor P1. Este trabajo aporta nuevos conocimientos sobre la compleja regulación transcripcional del gen *siat1*.

PALABRAS CLAVE: *Virus del papiloma humano, sialiltransferasa, c-Myc, oncoproteína E6 y E7.*

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial después de las enfermedades cardiovasculares, afecta a los humanos de todas las edades y a una extensa variedad de órganos. La frecuencia del cáncer aumenta considerablemente con la edad, de modo que conforme la gente sea más longeva un número mayor desarrollará la enfermedad, aparte del sufrimiento humano no solo para el paciente sino para sus familiares que son quienes lidian con la enfermedad, la carga económica para la sociedad es inmensa (Murray, et al., 2004).

Los agentes causales del cáncer pueden ser de tres tipos: la energía radiante o radiación (rayos ultravioleta o UV, rayos X y rayos gamma) es mutágena y carcinógena, lesiona al ADN de varias maneras, por ejemplo los rayos UV pueden causar la formación de dímeros de pirimidina, creando sitios apurínicos o apirimidínicos por eliminación de bases correspondientes, produciendo roturas en las tiras sencillas o dobles, o entrecruzamiento de ellas; a su vez los rayos X y gamma provocan la formación de radicales libres en los tejidos que interaccionan con el ADN y conllevan a alteraciones moleculares; otro agente causal son los compuestos químicos que son diversos, éstos usualmente se encuentran en el agua, en los alimentos o en el consumo de cigarrillos y por último pero no menos importantes los virus. Los virus oncogénicos pueden contener ADN o ARN como genoma, bajo ciertas circunstancias la infección con estos virus en las células apropiadas puede causar transformación maligna (Murray, et al., 2004).

Una característica del cáncer es el crecimiento incontrolado de la progenie de la célula transformada, durante este proceso las células acumulan mutaciones que pueden llevar a cambios en las proteínas o pueden expresar proteínas extrañas de virus oncogénicos (Regueiro, et al., 2010).

Cáncer cervicouterino (CaCu) y virus de papiloma humano

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una de las causas de mortandad más frecuentes entre las féminas de nuestro país, tan solo en el 2012 fue el responsable de la muerte de 3840 mujeres. La estadística nos dice que la mayoría de estas mujeres se encuentran entre los 45 a 64 años de edad, mientras que las mujeres de 25 a 34 años presentan una incidencia menor (Figura 1) (INEGI, 2014).

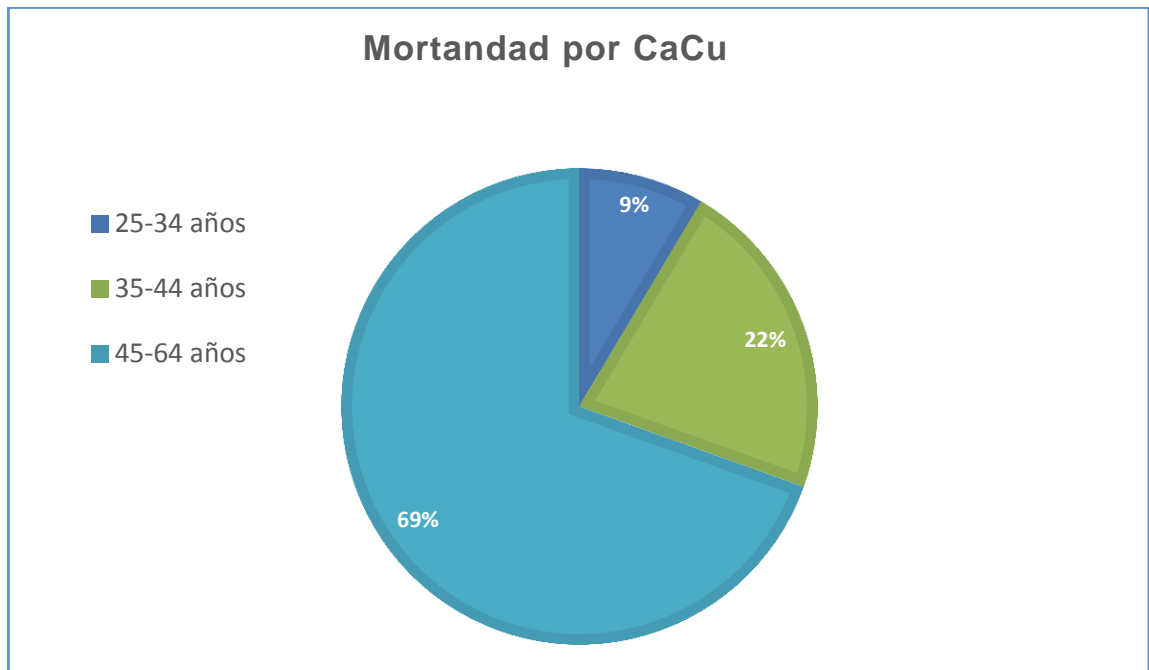


Figura 1. Mortalidad por CaCu en México según el último censo de INEGI realizado en 2012.

A la fecha se consideran factores relacionados con el comportamiento sexual, tales como la edad temprana de inicio de vida sexual, la cantidad de parejas sexuales a lo largo de la vida o el contacto sexual con individuos de alto

riesgo (Lizano, et al., 2009), sin embargo se sabe que la infección persistente con virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo es la principal causa para desarrollar CaCu (De la Fuente, et al., 2010).

La infección por VPH generalmente es asintomática en hombres, aunque tanto hombres como mujeres están involucrados en la cadena epidemiológica, siendo ambos portadores, trasmisores y víctimas de la infección. Esencialmente las infecciones genitales por VPH se manifiestan en el cérvix, vagina y vulva en mujeres; glande, prepucio, piel del pene y escroto en hombres; y en el canal anal y perianal de mujeres y hombres (Lizano, et al., 2009).

La infección por VPH es más frecuente en mujeres jóvenes aunque la mayoría la resuelve espontáneamente (cerca del 90%) persistiendo solamente en una pequeña fracción, es en este grupo que incrementa el riesgo de desarrollar lesiones del tracto genital que pudieran transformarse en CaCu. Algunas de las causas asociadas a la progresión de estas lesiones son el tipo viral y variaciones intra-tipo de VPH's de alto riesgo, integración del genoma viral al de la célula y probablemente, la carga viral. Además se piensa que factores como una mala alimentación, el tabaquismo, consumo de alcohol y la multiparidad, influyen seriamente en la progresión al cáncer (Lizano, et al., 2009). La progresión gradual del CaCu se da en una serie de etapas en donde las células de cérvix presentan ciertas anomalías histológicas conocidas como Neoplasia Intraepitelial Cervical o NIC (Figura 2) (Lizano, et al., 2009). Estas etapas se enuncian con números romanos y corresponden a:

- I. Cambios celulares diversos, compatibles con alteraciones de tipo inflamatorio.
- II. Incluye cambios celulares inciertos, algunos correspondientes a alteraciones inflamatorias y cambios regenerativos, sin incluir células con cáncer, que se describen en la siguiente etapa.

- III. Células con cambios iniciales de cáncer como el carcinoma *in situ*.
Células con cambios indudables de cáncer (Alonso, et al., 2001).

El VPH tiene tropismo por las células epiteliales y la infección se limita a epitelios escamosos (piel y mucosa) iniciándose en las células basales del epitelio (Taja, et al., 1996). Existen dos tipos de infecciones, las productivas o activas que ocurren en las capas intermedia y superficial del epitelio escamoso, en donde ocurre una intensa actividad de replicación del ADN viral, con síntesis de las proteínas de la cápside y ensamblaje de nuevos viriones; y las de tipo latente que ocurren en las células indiferenciadas del epitelio escamoso en donde el ADN viral permanece dentro de la célula en forma circular libre (episomal) sin replicarse, por lo que no hay cambios morfológicos identificables en una citología (De la Fuente, et al., 2010).

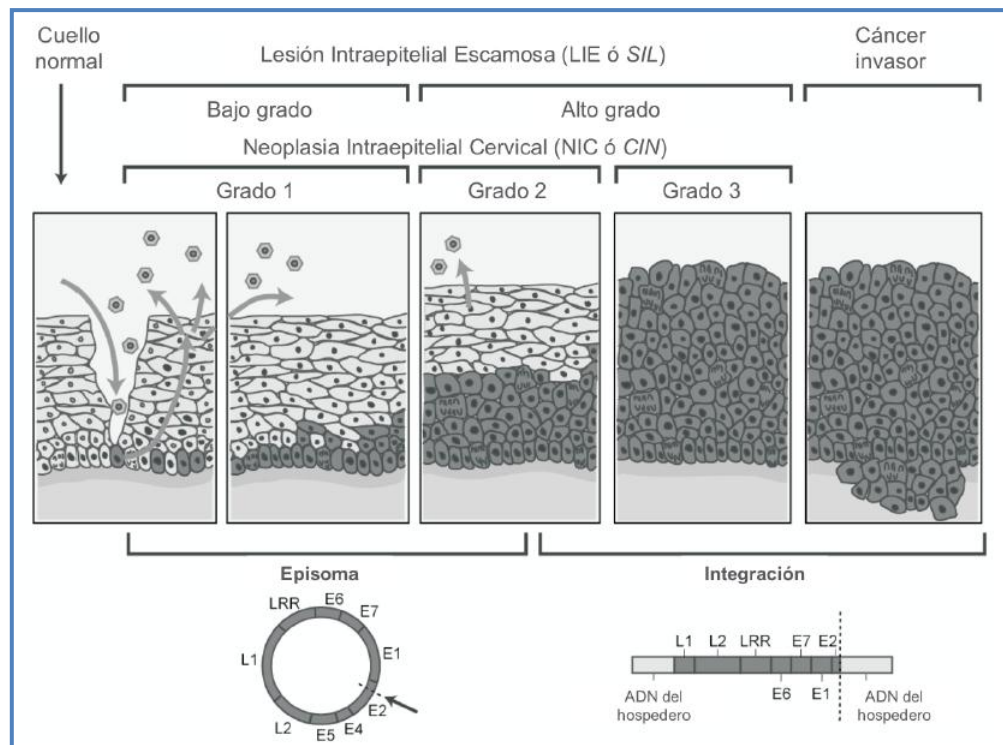


Figura 2. Infección por VPH y desarrollo de cáncer de cuello uterino. En un primer término, el VPH penetra en las células de la capa basal del epitelio a través de una brecha o microtraumatismo. En la mayoría de los casos, la infección es controlada por acción de las respuestas innata y adquirida o adaptativa. En otros casos, puede causar lesiones intraepiteliales de diferente grado con la producción de nuevas partículas virales. Cuando se trata de una infección por VPH de alto riesgo,

puede ocurrir la integración del ADN viral al ADN celular, evento que cursa con la pérdida de la expresión de la proteína viral E2 y un aumento en la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 lo cual impulsa entonces la evolución hacia lesiones de alto grado y el carcinoma invasor (Mendoza, et al., 2007).

Virus del Papiloma Humano (VPH)

Los virus del papiloma pertenecen a la familia Papillomaviridae, infectan diferentes especies animales como los reptiles, aves y marsupiales, así como más de 20 especies de mamíferos (Mendoza, et al., 2007).

Los papilomavirus como también son conocidos han cohabitado con la especie humana a través de miles de años. Actualmente se han identificado y secuenciado alrededor de 200 genotipos de los cuales 40 infectan el epitelio anogenital, éstos últimos causan un diverso espectro de lesiones (Le Roux & Moroianu, 2003) (Mendoza, et al., 2007) (Lizano, et al., 2009), por lo que han sido clasificados según su potencial oncogénico, en dos principales grupos, los VPH de alto riesgo y los de bajo riesgo. Los virus de bajo riesgo o no oncogénicos incluyen los tipos virales 6, 11, 42, 43 y 44 cuyas principales manifestaciones clínicas son los condilomas acuminados o verrugas genitales y neoplasias que rara vez progresan a un tumor (Taja, et al., 1996) (De la Fuente, et al., 2010). Los virus de alto riesgo u oncogénicos incluyen los tipos virales 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 (Taja, et al., 1996) (Lizano, et al., 2009) (De la Fuente, et al., 2010) que se asocian a todo el espectro de lesiones intraepiteliales invasoras, tanto del epitelio escamoso como del glandular (De la Fuente, et al., 2010) (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos virales de bajo y alto riesgo de VPH.

Riesgo	Tipo viral
Bajo	6, 11, 42, 43 y 44
Alto	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67 y 68

Los VPH se caracterizan por ser pequeños virus sin envoltura (Lizano, et al., 2009), que miden entre 45 y 55 nm de diámetro, y poseen una cápside icosaédrica de proteína (De la Fuente, et al., 2010). Los genomas de VPH poseen una estructura básica muy similar entre ellos con identidad de secuencia de hasta 85% (Taja, et al., 1996). Se componen por ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases (pb) de longitud (Figura 3), el cual se divide en tres regiones: una región temprana E (early) que contiene los genes de expresión temprana que codifican para las proteínas no estructurales o proteínas virales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) necesarias para la replicación del ADN viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular; una región tardía L (late) que contiene los genes de expresión tardía y que codifican para las proteínas estructurales (L1 y L2) y una región reguladora conocida como región larga de control LCR (long control region) que contiene la secuencia de ADN que permite el control de la replicación y de la expresión del genoma viral (De la Fuente, et al., 2010) (Lizano, et al., 2009) (Mendoza, et al., 2007) (Taja, et al., 1996) (Tabla 2).

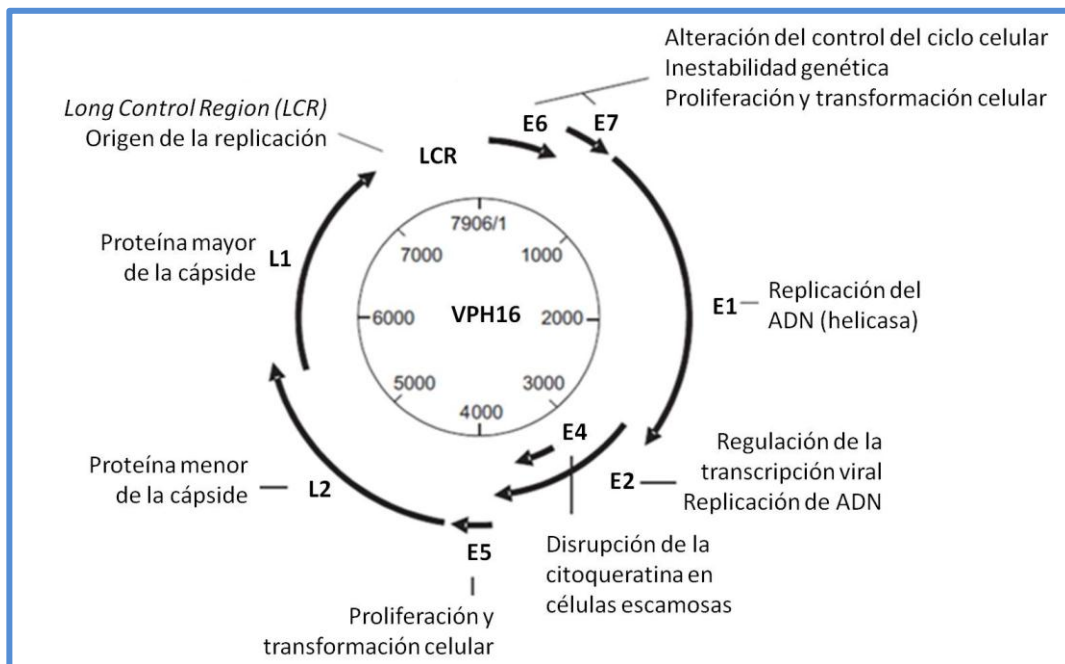


Figura 3. Se muestra la estructura del genoma del VPH16, la región larga de control (LCR), los genes de expresión temprana (E) y los genes de expresión tardía (L) así como la función de las proteínas para las que codifican.

Tabla 2. Genes del VPH y las funciones que desempeñan como parte del genoma.

Gen del VPH	Principal función que desempeña
E1	Modula la replicación del ADN
E2	Regula la transcripción viral
E3	Función desconocida
E4	Disrupción de la citoqueratina en células escamosas
E5	Ligada a transformación celular y receptores de factores de crecimiento
E6	Proliferación y transformación celular, ligada a p53

E7	Proliferación y transformación celular, activación de la transcripción, ligada a gen Rb
L1	Mantenimiento de la proteína mayor de la cápside
L2	Mantenimiento de la proteína menor de la cápside

Oncoproteínas E6 y E7

El mecanismo de acción de los VPH de alto riesgo en el desarrollo de una neoplasia cervical, está relacionado con la acción de las oncoproteínas virales **E6** y **E7**. Éstas poseen la capacidad de immortalizar y transformar queratinocitos, generándoles un alto grado de inestabilidad cromosómica (Lizano, et al., 2009), y la pérdida del control de la proliferación celular. Los genes E6 y E7 son complementarios y cuando se expresa solo uno, su poder transformante es débil. Éstos genes se expresan con mayor frecuencia en los tipos virales de alto riesgo 16 y 18, mientras que su expresión no se observa en los tipos virales de bajo riesgo 6 y 11 (De la Fuente, et al., 2010), debido a ello y de acuerdo con su estructura proteica se propone que las oncoproteínas E6 y E7 poseen un ancestro común (Mendoza, et al., 2007).

La oncoproteína E6 posee aproximadamente 150 aminoácidos y contiene dos dedos de zinc altamente conservados que se caracterizan por la presencia del motivo Cys-X-X-Cys, que son estructuras fundamentales para la interacción de la proteína con un gran número de blancos celulares, además el carboxilo terminal contiene el sitio de unión a proteínas con dominios PDZ, esta estructura le permite mayor unión al ADN (Figura 4).

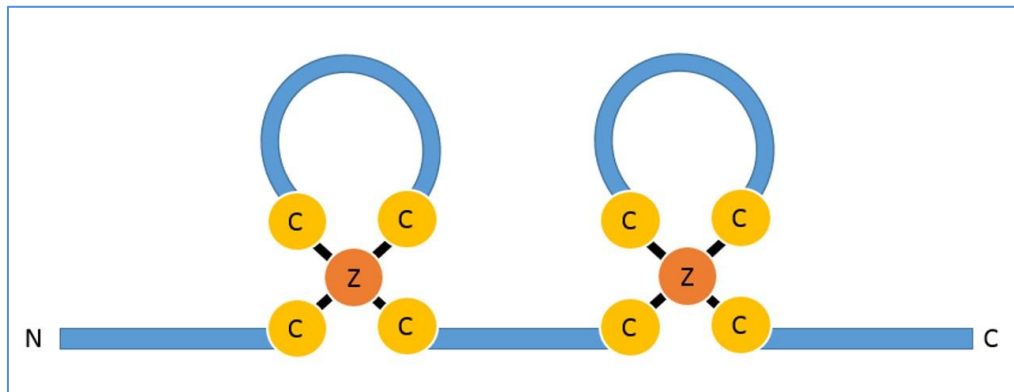


Figura 4. Proteína E6 del VPH, se muestran los dos arreglos esenciales en la actividad de E6, sus dedos de zinc, las cuales son estructuras fundamentales para la interacción de la proteína con un gran número de blancos celulares. Se observa su extremo amino terminal así como el carboxilo terminal el cual contiene un sitio de unión a proteínas con dominios PDZ.

El gen E6 que codifica para esta proteína es uno de los primeros en expresarse durante el ciclo viral, y posee la capacidad de unirse a numerosos blancos celulares para su degradación como por ejemplo a la proteína pro apoptótica c-Myc, esto le permite generar diferentes cambios celulares tales como bloquear la apoptosis, regular la transcripción viral, abatir la diferenciación celular y las interacciones de célula a célula e incrementar la inestabilidad cromosómica. Ahí la importancia de esta proteína que no solo tiene efecto sobre la proliferación celular, sino que regula la transcripción viral y de la célula, contribuye a la pérdida de la organización epitelial y de la diferenciación celular (Lizano, et al., 2009).

La oncoproteína E7 del VPH16 es una proteína nuclear pequeña de 98 aminoácidos que a diferencia de E6 posee un solo sitio con motivos de dedos de zinc en su extremo carboxilo terminal el cual es utilizado para su dimerización. Esta oncoproteína se fosforila en el dominio N-terminal por la caseína II. Su estructura se divide en tres dominios llamados CD1 (el cual se encuentra en el extremo amino terminal), CD2 (el cual contiene un motivo LXCXE donde se une la proteína Rb) y CD3 (por medio del cual forma dímeros

vía a un motivo de dedos de zinc) (Patiño, 2007); estos dominios son esenciales para las actividades transformantes ya que interactúan con gran variedad de proteínas celulares (Figura 5). Los reportes indican que E7 posee la capacidad de inhibir de manera eficaz la apoptosis en queratinocitos a través de varios mecanismos como producir la degradación de las proteínas apoptóticas y encargadas de la adhesión celular lo que provoca que las células tengan un crecimiento independiente de anclaje y una disminución de la apoptosis. Existen factores epigenéticos y genéticos que se reportan como cofactores en la transformación tumorigénica cervical tal es el caso de la proteína pro apoptótica c-Myc aunque su relación con el desarrollo del CaCu no ha sido completamente estudiada (Lizano, et al., 2009).

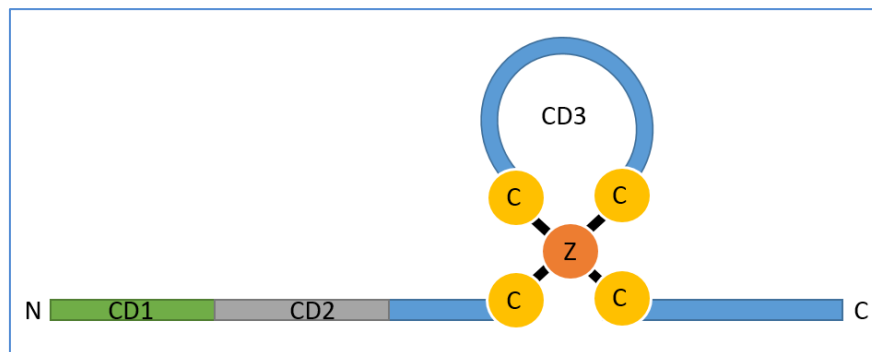


Figura 5. Estructura de la proteína E7 del VPH16. Se muestran los tres dominios altamente conservados (CD1-CD3) y sus sitios de interacción con sus blancos celulares, además de un dedo de zinc, estructura de unión a ADN llamada así porque la estructura primaria une un átomo de zinc con residuos de histidinas distantes con una secuencia intermedia descrita como un asa (loop).

E7 interactúa con proteínas implicadas en el crecimiento celular, especialmente en la transición de la fase G1 a S del ciclo celular, entre ellas las proteínas supresoras de tumor de retinoblastoma (Rb), desacetilasas de histonas, factores de transcripción, proteína de unión a caja TATA, ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas entre otras, de esta manera desregula el ciclo

celular y conduce al incremento de la proliferación celular, inmortalización y finalmente transformación de células normales a células cancerígenas (Patiño, 2007).

Alteraciones en cáncer

Las células cancerosas tienen tres propiedades características, la disminución o ausencia del control del crecimiento, la invasividad hacia los tejidos circundantes y la dispersión o metástasis a otras partes del cuerpo. Esto no implica que la transformación maligna se limite a estas propiedades, ya que también ocurren cambios morfológicos y bioquímicos importantes, que han sido observados en células cultivadas (Murray, et al., 2004), tales como:

- Alteraciones de morfología, las células transformadas tienen una forma más redondeada que las células control.
- Incremento de la densidad celular, las células transformadas por lo general forman multicapas, mientras que las células control forman una monocapa.
- Pérdida de una dependencia al anclaje, las células pueden crecer sin adherirse a la superficie del plato de cultivo.
- Pérdida de la inhibición de contacto del movimiento, las células transformadas crecen una sobre otra mientras que las normales dejan de moverse cuando están en contacto unas con otras.
- Variedad de cambios bioquímicos que incluyen un incremento en la velocidad de glucólisis.
- Alteraciones de la superficie celular tales como cambios en la composición de glicoproteínas o glicoesfingolípidos, y la secreción de ciertas proteasas.

- Alteraciones de la estructura citoesquelética como las fibras de actina.
- Disminución de los requerimientos para los factores de crecimiento, y por lo general, una secreción incrementada de ciertos factores de crecimiento dentro de su medio.

En resumen estos cambios se interpretan como reflejo de los procesos primarios que causa la infección del VPH, y de los cambios secundarios que resultan de la conversión del estado normal al maligno (Murray, et al., 2004).

Alteraciones de la glicosilación en cáncer

Los carbohidratos presentes en la superficie celular realizan funciones importantes como moduladores y mediadores del reconocimiento y comunicación celular. Los cambios en los patrones de expresión de carbohidratos modifican las propiedades adhesivas en las células tumorales (López, 2003).

La glicosilación es un proceso enzimático postraduccional que se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi principalmente, los glicoconjugados resultantes (glicoproteínas y glicolípidos) son muy importantes ya que realizan actividades biológicas esenciales para el desarrollo, crecimiento, funcionalidad y supervivencia de la célula, por lo que cualquier cambio en este proceso puede generar alteraciones en el funcionamiento celular. Las alteraciones de glicosilación se dividen en tres tipos, las alteraciones congénitas, alteraciones adquiridas y alteraciones no enzimáticas de la glicosilación (glicación), estos cambios son un fenómeno muy común en las enfermedades humanas, tal es el caso del cáncer (Jiménez, et al., 2002).

El proceso de glicosilación se lleva a cabo por la acción de enzimas llamadas glicosiltransferasas, que adicionan monosacáridos activados de origen endógeno o exógeno. Los tipos de glicanos (oligosacáridos) más comunes en glicoproteínas de las células eucariontes se definen por la naturaleza de la región a la que se unen con la proteína, siendo más frecuentes los glicanos de tipo N y O cómo podemos observar en la Figura 6 (Jiménez, et al., 2002).

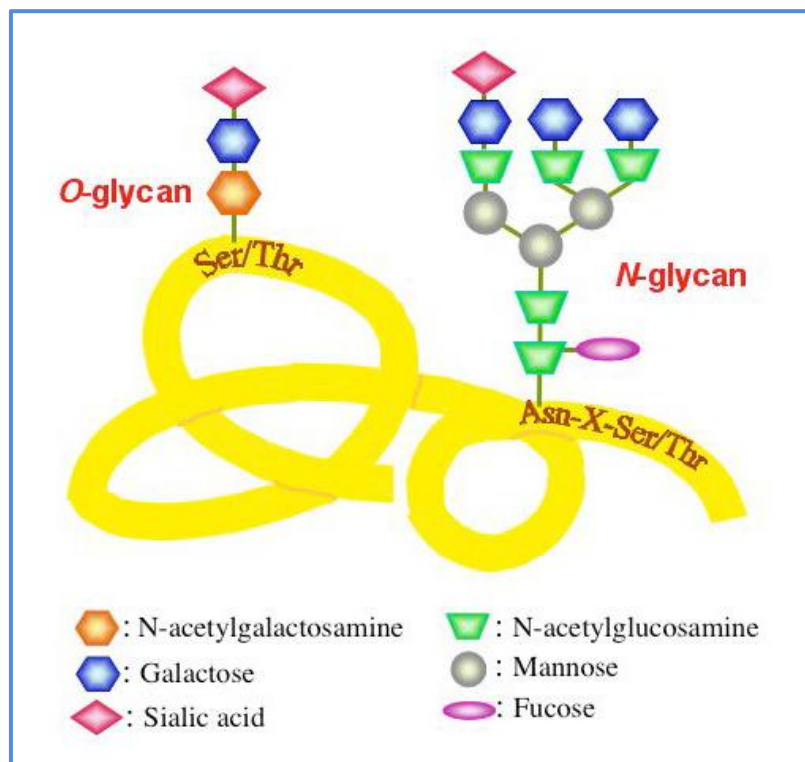


Figura 6. Ejemplos de las formas de unión de glicanos en una proteína. Las más frecuentes son las glicoproteínas de tipo N y O (Wang, 2005).

Los N-glicanos son una cadena de oligosacáridos unidos en forma covalente a un residuo de asparagina de una cadena polipéptidica dentro de una secuencia consenso: Asn-X-Ser/Thr, generalmente vía N-acetilglucosamina. Los O-glicanos son una cadena de oligosacáridos unidos

covalentemente a un residuo de serina o treonina (Ser/Thr-O) generalmente vía una N-acetilgalactosamina (Jiménez, et al., 2002).

Las glicoproteínas, una vez sintetizadas pueden encontrarse en la superficie celular o como moléculas de secreción, esto facilita que modulen gran variedad de procesos durante las interacciones celulares y entre la célula y la matriz extracelular, por lo tanto, cualquier cambio en su estructura molecular provocado por alguna alteración en la glicosilación, se manifiesta con deficiencias funcionales (Jiménez, et al., 2002).

Los cambios en la N-glicosilación son un evento común en las neoplasias, por ejemplo: en el coriocarcinoma se ha reportado el incremento de oligosacáridos unidos en forma covalente a Asn, debido a un aumento en la actividad de la N-acetilglucosaminiltransferasa (Jiménez, et al., 2002).

Una gran variedad de cánceres presentan cambios en la O-glicosilación como una glicosilación incompleta en la que se expresan estructuras que comúnmente se encuentran formando la base del oligosacárido, la característica que comparten estos cánceres son alteraciones en las mucinas, estas glicoproteínas son parte de los componentes estructurales de la superficie celular y del moco protector en los tractos respiratorios, gastrointestinales y reproductivos; en estos carcinomas las mucinas se expresan en las células que las producen y la pérdida de la adhesión en las células cancerosas facilita que las mucinas lleguen a la circulación sanguínea permitiendo la propagación viral (Jiménez, et al., 2002).

Glicosiltransferasas

La apropiada y precisa síntesis y/o modificación de glicanos depende de las glicosiltransferasas y glicosidasas que son enzimas altamente específicas

localizadas en diferentes tejidos y células (Wang, 2005). Estas enzimas utilizan como cofactores cationes divalentes como Mn^{++} o Mg^{++} y actúan a pH entre 5 y 7, su acción es secuencial por lo que el producto de una permite que actúe la siguiente, catalizan solo un tipo de enlace y existen varias enzimas para formar un tipo de unión (López, 2003).

La estructura del glicano se determina no solo por la naturaleza de la proteína a la que se une sino también al tejido o célula de donde proviene. Las cadenas laterales de carbohidratos son las encargadas de modular la interacción de la proteína con su medio, influenciando su solubilidad, actividad y función biológica tales como el crecimiento, desarrollo y supervivencia tanto de células como de organismos (Wang, 2005).

Las glicosiltransferasas actúan secuencialmente en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, catalizando la unión específica de un carbohidrato a un glicano aceptor. Por lo tanto, el repertorio de glicosiltransferasas presentes en un determinado tipo celular determina las características particulares de las estructuras de los oligosacáridos que poseen las glicoproteínas de la membrana plasmática y la matriz extracelular (Varki, et al., 2009). Las glicosiltransferasas reciben el nombre del carbohidrato que transfieren por ejemplo: galactosiltransferasas transfieren galactosa, fucosiltransferasas transfieren fucosa, las sialiltransferasas transfieren ácido sialico, etc (López, 2003).

Sialiltransferasas

En la actualidad se conocen 20 sialiltransferasas (STs) en humano, estas enzimas se encuentran ancladas a la membrana de la red trans del aparato de Golgi (Figura 7), en los vertebrados las STs poseen una estructura similar (López & Vallejo, 2007).

Se sabe que las sialiltransferasas son glicoproteínas transmembranales tipo II, que poseen una cola citoplasmática corta con un extremo N-terminal que no es esencial para la actividad catalítica, además de un dominio de anclaje de unos 20 a 200 aminoácidos (aa) que participan en la unión al aparato de Golgi. La región del tallo de longitud variable (20-200 aa) es seguida por un gran dominio catalítico C-terminal que reside en el lumen (Harduin, et al., 2001).

La regulación de las STs influye en la expresión de compuestos sialilados en la superficie celular y contribuye a definir el patrón de glicosilación en células normales y tumorales. A través de análisis Northern Blot e hibridaciones in situ se han correlacionado positivamente los niveles de expresión del ARNm y los niveles de actividad enzimática por lo que se cree que su expresión se regula a nivel transcripcional (Harduin, et al., 2001).

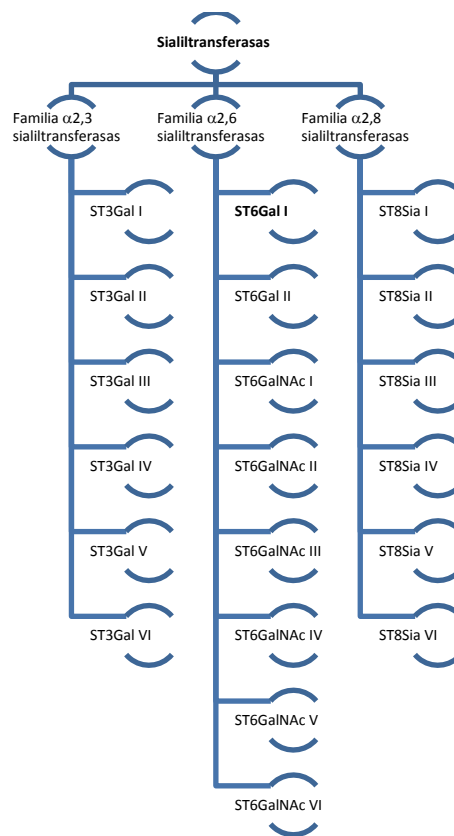


Figura 7. Las sialiltransferasas se dividen en 3 familias según el tipo de enlace que catalizan (Harduin, et al., 2001).

Gen de la β -galactósido- α 2,6 sialiltransferasa

La β -galactósido α 2,6 sialiltransferasa (ST6Gal I) es la enzima que transfiere el ácido siálico en enlace α 2,6 a un residuo de galactosa. Esta enzima es codificada por el gen *siat1* y su regulación se da principalmente a nivel transcripcional (Harduin, et al., 2001; Milflores, et al., 2012).

A partir del gen que codifica la ST6Gal I se generan múltiples isoformas de ARNm. Estas isoformas difieren sólo en su región 5'-no traducible y comparten una región de codificación idéntica, se originan por el uso de diferentes promotores y por empalme alternativo. Las isoformas hasta ahora caracterizadas son tres: una forma corta conocida como forma 1 que también se conoce como forma H debido a que fue aislada de hígado y caracterizada inicialmente a partir de la línea celular HepG2, la forma 2 contiene en su extremo 5' no traducido, un exón denominado X (forma X), esta isoforma fue aislada de células B humanas de la línea celular de linfoblastoma y la forma 3 corresponde a un transcrito más largo que contiene dos exones en el extremo 5' no traducido, llamados Y y Z (forma YZ), esta isoforma fue aislada de diferentes líneas celulares (Figura 8). La transcripción de estas isoformas de ARNm se regula respectivamente por los promotores P1, P2 y P3 (Taniguchi, et al., 2000; Harduin, et al., 2001; Dall'Olio, et al., 2004; Milflores, et al., 2012).

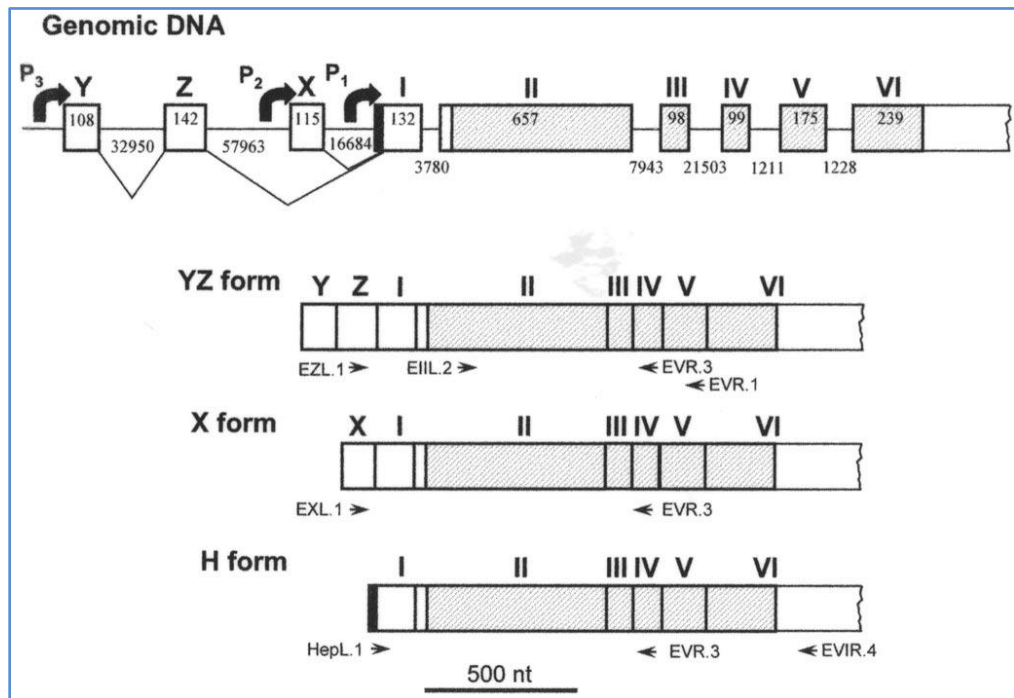


Figura 8. Representación esquemática de la organización del gen de la ST6Gal I. Los números dentro de los exones (cajas) indican la longitud exón; los números entre los exones indican la longitud del intrón. La parte sombreada representa la región codificante de la proteína. La transcripción puede ser iniciada por al menos tres diferentes regiones promotoras (P1 a P3), indicadas por flechas. A través del splicing alternativo se puede usar un promotor alternativo (Dall'Olio, et al., 2004).

El promotor P1 del gen de la ST6Gal I tiene un tamaño aproximado de 1000 pares de bases (Dall'Olio, *et al.*, 2004; Milflores, *et al.*, 2012). Este promotor no contiene cajas TATA ni CCAAT, pero posee varias cajas GC (Figura 9). Esta característica estructural es típica en los genes *housekeeping* o llamados también genes constitutivos debido a que continuamente se expresan y no son reprimidos o apagados después de cierto tiempo además de que se expresan en todos los tejidos (Harduin, et al., 2001). Además posee varios sitios de inicio de la transcripción (Inr) que cumplen la función de las cajas TATA (Milflores, et al., 2012).

con diversas funciones celulares además de promover la transformación celular y la progresión del tumor (Junttila & Westermarck, 2008).

La expresión del gen *siat1* que codifica a la ST6Gal I incrementa sus niveles de transcripción en diversos cánceres como el cáncer de colon, cáncer colorectal, cáncer de mama y el cáncer cervicouterino (Wang, et al., 2003).

Un análisis *in silico* del promotor P1 realizado por Milflores y col. en 2012 identificó sitios de unión a factores de transcripción que pueden ser importantes para la regulación de la expresión génica, se identificaron elementos de respuesta putativos como YY1, GATA, c-Myc, c-Ets-1, Sp1, TFII-I, LBP1, CHOP y un Inr en la posición 5 pb. Se determinó que el sitio de unión a HNF1 es importante para el promotor P1 en la línea celular HepG2 y se identificó la secuencia de un tercer iniciador que participa en la actividad transcripcional de P1. También se comprobó la presencia de tres secuencias Inr que marcan el inicio de la transcripción. Además se identificó el promotor mínimo en un fragmento de 37 pb evaluando su actividad en la línea celular C33A la cual fue similar a la del promotor completo (Milflores, et al., 2012).

El sitio Inr(3) del promotor P1 en la línea celular C33A se superpone con un elemento c-Myc que se propone que participa en la regulación de la transcripción funcionando como un represor al reclutar a la enzima HDAC que evita la interacción con otros factores de transcripción (Milflores, et al., 2012).

El gen *c-MYC*

Los genes *myc* pertenecen a una familia de protooncogenes compuesta por varios miembros (*L-MYC*, *N-MYC* y *c-MYC*). Estos se encuentran en las células normales y codifican proteínas del núcleo de la célula que se unen al ADN y modula su transcripción de diversos genes. Estos protooncogenes pueden ser activados a oncogenes por diversos mecanismos, y así estimular el desarrollo de cáncer, cuando se activan excesivamente provocan pérdida del

control de la división y proliferación acrecentada (Murray, et al., 2004) (Lodish, et al., 2005).

Algunos de los mecanismos que alteran la expresión o la estructura de los protooncogenes *MYC* y participan en su activación a oncogenes (proceso en el que la transcripción se incrementa de cero a un valor relativamente bajo) son los siguientes:

- Inserción del promotor, el genoma viral se integra cerca del gen *MYC* actuando como promotor y activando su transcripción y traducción.
- Inserción de un amplificador, cuando el provirus se inserta corriente abajo del gen *MYC* o arriba de él pero orientado en dirección contraria, el gen *MYC* es activado y actúa como secuencia amplificadora.
- Translocaciones cromosómicas, la base de una translocación es que una fracción de un cromosoma se desprende y a continuación se une a otro cromosoma. Si a su vez el segundo cromosoma cede material al primero se dice que la translocación es recíproca. Se han encontrado translocaciones características de diversas células tumorales. Por ejemplo en el Linfoma de Burkitt el segmento del cromosoma 8 que contiene al gen *MYC* migra hacia el cromosoma 14, lo que propicia su activación.
- Amplificación génica, en algunos tumores se observa un efecto de amplificación de ciertos protooncogenes que produce su activación, estos pueden aumentar hasta 1000 kb de longitud o más.
- Mutación en un punto, la modificación de una sola base puede activar un gen de protooncogen a oncogen, estos fenómenos pueden inclinar el equilibrio del metabolismo celular hacia un

estado que favorezca la transformación o la conserve (Junttila & Westermarck, 2008; Soucek & Evan, 2010).

Los mecanismos descritos implican un aumento en la cantidad del producto de un oncogen por una transcripción mayor, por lo que es posible que una cantidad mayor del producto de un oncogen sea suficiente para inducir a una célula hacia la malignidad. Estos datos sugieren que la presencia de una proteína reguladora es clave, estructuralmente anormal, en una célula puede ser suficiente para inclinar la balanza hacia el cáncer (Murray, et al., 2004) (Lodish, et al., 2005).

También se ha encontrado que los oncogenes pueden estimular la proliferación celular, actuando sobre vías intracelulares clave implicadas en el control de crecimiento, desacoplándolas de la necesidad de un estímulo exógeno. El producto de *MYC* actúa como una proteína fijadora de ADN, afectando el control de la mitosis (Murray, et al., 2004; Lodish, et al., 2005).

El gen *c-MYC* codifica al factor de transcripción c-Myc que regula una gama diversa de funciones celulares tales como el ciclo celular, la proliferación, el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo (Girão & Barem, 2006). Por lo que no es extraño que errores en la señalización conduzcan a la transformación celular y la progresión de tumores. Trabajos recientes relacionan a c-Myc con la vascularización descontrolada, metástasis, inestabilidad genómica y proteólisis. Sin embargo una sobreexpresión de c-Myc promueve la apoptosis celular. Se sabe que además participa modulando la estructura de la cromatina manteniéndola en un estado activo a través de su unión directa y con el reclutamiento de otras proteínas (Junttila & Westermarck, 2008).

La proteína c-Myc es miembro de la familia de factores de transcripción MYC/MAX/MAD, presenta un arreglo en tándem de los dominios hélice-asa-hélice/cierre de leucinas básicos (bHLH-LZ) (Girão & Barem, 2006). La proteína c-Myc funciona como heterodímero con MAX para unirse a la secuencia

consenso 5'-CACGTG denominada caja E, también reconoce las secuencias CACATG, CATGTG y CACGCG. Además se sabe que este heterodímero prefiere sitios que están flanqueados por C y G que por T y A (Fernandez, et al., 2003).

Un mecanismo por el cual c-Myc reprime la transcripción es a través de su unión al factor de transcripción Miz-1, impidiendo que se una a su secuencia consenso para promover la activación de la transcripción (Fernandez, et al., 2003).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La α 2,6 sialiltransferasa (ST6Gal I) codificada por el gen *siat1*, su expresión génica se regula a nivel transcripcional de forma muy compleja ya que diferentes isoformas de ARNm son el resultado del uso de promotores alternativos (P1, P2, y P3).

En diversos tipos de cáncer incluido el CaCu se han detectado incrementos en el nivel de transcripción del gen que codifica para la ST6Gal I, esto se ha asociado con mayor invasión y metástasis en ciertos tipos de cáncer, ya que se modifican las interacciones entre las células. En CaCu el incremento en la transcripción de la ST6Gal I se debe principalmente a un aumento de la isoforma 1 del ARN mensajero, producto del promotor P1.

Sin embargo existen otros tipos de cáncer en los que hay una disminución de la sialilación en α 2,6 y la disminución en la actividad enzimática de la ST6Gal I lo cual se asocia con una diferenciación pobre del tumor y un tiempo de supervivencia del paciente más corto, lo que muestra que la expresión de la ST6Gal I podría presentar diferentes efectos según el tipo de cáncer.

Los mecanismos de regulación transcripcional de este gen son muy poco conocidos, por lo que profundizar en su estudio podría ayudar no solo a conocer qué factores podrían estar regulando su transcripción.

Por lo tanto surgen las siguientes interrogantes:

¿Cuál es el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 sobre la actividad del promotor P1 completo?

¿Cuál es el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 sobre la actividad del fragmento de 123 pb (-99 al +24 pb) del promotor P1?

¿Cuál es el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 sobre el fragmento 123P1 mutado en el sitio de unión al factor transcripcional c-Myc (123P1 (delta) c-Myc)?

HIPÓTESIS

Las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH16 incrementan actividad transcripcional del promotor P1 del gen *siat1*.

La actividad transcripcional del fragmento de 123 pb (-99 al +24 pb) del promotor P1 se incrementa en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16, el efecto se potencializa en presencia de ambas.

La actividad transcripcional del fragmento 123P1 mutado en el sitio de unión al factor transcripcional c-Myc (123P1delta c-Myc) disminuye en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16.

OBJETIVO

Objetivo general

Determinar el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 sobre la actividad del promotor P1 del gen de la ST6Gal I.

Objetivos particulares

Analizar el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 sobre la actividad del promotor P1 completo.

Analizar el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 sobre el fragmento 123P1pb del promotor P1.

Analizar el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 sobre el fragmento 123P1 q c-Myc.

MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción del modelo de estudio

Línea celular C33A (VPH negativo)

Esta línea fue obtenida originalmente por N. Auersperg de una biopsia de cáncer cervical humano. Algunas de las características por las que son preferidas como modelo experimental es que poseen crecimiento indefinido y no poseen inhibición por contacto, lo que facilita su crecimiento y mantenimiento en el laboratorio. Estas células se obtuvieron de una paciente de 46 años.

Esta línea de cáncer cervical fue crecida en monocapa en caja p25 utilizando el medio de cultivo Dulbecco's Modificado Eagle's Medium (DMEM) alto en glucosa 13.4 g/L marca SIGMA, suplementado con 5% de suero bovino fetal (SFB) marca GIBCO y adicionado con antibiótico (10,000 U de penicilina, 10 mg de estreptomina) y 25 µg/ml de Anfotericina B que es un antimicótico. Para su propagación fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂.

El mantenimiento de la línea celular se realizó cada tercer día, usando PBS 1X para retirar los desechos celulares y residuos de suero así como del antibiótico y agregando DMEM nuevo. Para despegar las células se incubó con tripsina (marca SIGMA que contiene 2.6 g de tripsina y 0.2 g de EDTA) por 3 minutos, durante su propagación y conservación en la incubadora se dejó la tapa de la caja p25 ligeramente abierta para permitir el intercambio gaseoso y mantener equilibrado el pH del medio.

Plásmidos

El plásmido que contiene el promotor P1 completo es el pGL4-1137P1 que consta de un tamaño de 5513 pb, el promotor clonado comprende a partir del nucleótido -1113 a +24 (Figura 10) esta construcción la realizaron Milflores y col. en el 2012.

Para replicar el promotor pGL4-1137P1, se realizó un mecanismo de transferencia horizontal de información genética llamado transformación, el cual consistió en captar material genético libre obtenido con anterioridad, en una célula bacteriana que se encuentra en el estado fisiológico de competencia, para multiplicar el plásmido y purificarlo, para ello fueron usadas las bacterias *E. coli* TOP10, que se hicieron químicamente competentes y que presentan alta eficiencia a la transformación además de una replicación estable y permiten replicar un alto número de copias del plásmido.

Para hacer competentes las bacterias *E. coli* TOP10 se preparó un día antes un precultivo para ello en condiciones de esterilidad se tomaron 100 µl de *E. coli* TOP10 y se agregaron a 5 ml de medio LB estéril. Se incubó en la agitadora a 37°C y 250 rpm durante 24 horas.

Posteriormente en 5 ml de LB se agregaron 100 µl de *E. coli* TOP10 precultivo y se dejó incubar por 12 horas en agitación constante de 250 rpm a 37°C. Se colocó un precultivo nuevo con 100 µl de *E. coli* TOP10 y se dejó incubar por 3 ½ horas en agitación constante de 250 rpm a 37°C. Se midió la densidad en el espectrofotómetro, la cual fue óptima de 0.6, una vez revisado esto se colocó en hielo por 15 min. Se empaquetaron las bacterias (los 5 ml) en un tubo de plástico de 15 ml y se centrifugo a 4'000 rpm por 10 min a 4°C. Se tiró el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500µl de CaCl₂ 0.1M para pasarlo a un tubo de 1.5 ml, nuevamente se incubó en hielo por 15 min. Se centrifugó a 4'000 rpm por 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se agregaron otros 100µl de CaCl₂ resuspendiendo con cuidado.

Inmediatamente después de seguir el procedimiento para realizar las células competentes se agregó el plásmido a clonar. Se mezcló e incubó 10 min en hielo, posteriormente se dio un choque térmico a 42°C por 45 segundos en el termoblock y rápidamente se incubo 2 min en hielo. Se Agregó 1 ml de medio LB y se incubó a 37°C a 250 rpm por 1hr. Posteriormente se centrifugó a 4'000

rpm por 10 min a 4°C, se decantó y se agregaron 300µl de LB. Se resuspendió y se plaquearon 200µl en la placa de Petri que contenía entre 12-15 ml de medio LB gelificado con ampicilina.

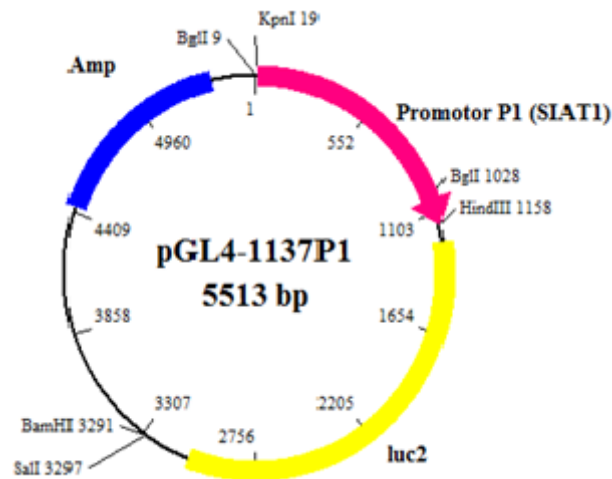


Figura 10. Representación esquemática del plásmido pGL4-1137P1 de 5513 pb. Se muestra la región promotora del gen *siat1* en rosa, el gen reportero luciferasa en amarillo, el gen de resistencia a ampicilina en azul y se indican otros sitios de restricción del plásmido (Milflores, et al., 2012).

Una vez obtenidas las bacterias competentes y transformadas con el promotor pGL4-1137P1 se realizó la extracción del ADN plasmídico con el kit Nucleobond Purification Xtra Maxi Plus.

Para ello se realizó un precultivo de las células agregando una colonia en 3–5 ml de medio LB líquido, se dejó por 8 horas a 250 rpm y 37°C. Se cultivaron 100µl del precultivo en 500 ml con antibiótico, se dejó de 12 -16 horas a 250 rpm a 37°C. Se centrifugó a 4'000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se resuspendió la pastilla en 12 ml de buffer RES agitando en vortex hasta disolver completamente. Se agregaron 12 ml de Buffer LYS a la mezcla, homogenizando por inmersión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Mientras se incubaba la muestra se procedió a equilibrar la columna con 25 ml de buffer EQU. Se agregó el buffer rodeando el filtro. Una vez incubada la muestra se agregaron 12 ml de NEU a la muestra y se mezcló por inversión de 10–15 veces hasta que se homogenizó. El lisado se colocó en la columna (filtro papel) y se descartó el sobrenadante. Se lavó el filtro con 15 ml de EQU rodeando el filtro y se desechó el filtro. La columna se lavó con 25 ml de buffer WASH procurando cubrir toda la superficie de la columna. La columna se transfirió a un tubo estéril de 50 ml. Se agregaron 15 ml de ELU a la columna, se tomó el sobrenadante y se desechó la columna. Se agregaron 10.5 ml de isopropanol al tubo mezclando con el vortex, e incubando 2 minutos a temperatura ambiente. Por otra parte, se quitó el émbolo a la jeringa y se puso el filtro. Se agregó la mezcla a la jeringa bajando el émbolo lentamente, desechando el sobrenadante. El filtro se retiró y luego el émbolo, colocando nuevamente el filtro y agregando 5 ml de etanol al 70%, y se desechó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento 16 veces o hasta que no saliera nada de líquido. Se retiró el filtro y se pasó a la jeringa pequeña. Se agregaron 500 µl de Tris (Tris/HCl, 5mM, pH 8.5 ó H₂O estéril) y se pasaron por la jeringa, recolectándolo en un tubo de 1.5 ml, se volvió a quitar el filtro, el émbolo, poniendo nuevamente el filtro y pasando los 500 µl recolectados en el tubo. Se repitió el último paso pero con Tris ó H₂O nuevo (500 µl).

El procedimiento se repitió para los plásmidos pcADN neg y pcADN E6

A su vez se trabajó con los plásmidos, pcADN E7, pGL4-123P1 (Figura 11 y 12) fragmento que corresponde a las posiciones -99 al +24 bp del promotor completo y pGL4-123P1 Δ (delta) c-Myc, que ya habían sido obtenidos con anterioridad en el laboratorio.

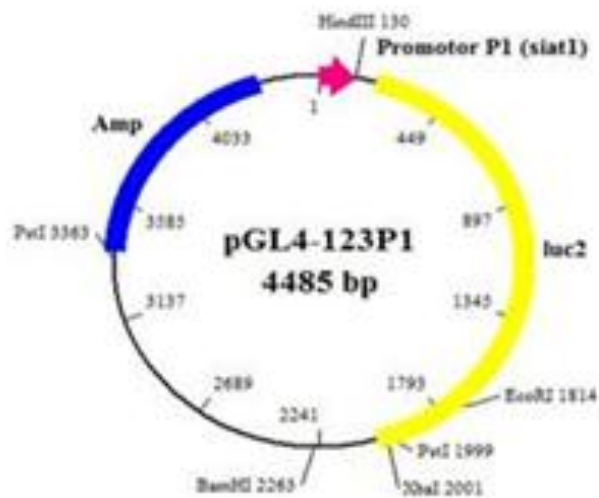


Figura 11. Representación esquemática del plásmido pGL4-123P1 de 4485 pb. Se muestra la región promotora del gen *siat1* en rosa y el gen reportero luciferasa en amarillo. También se indican los sitios de restricción para la enzima BglI, fragmento que se eliminó quedando una región de 123 pb del promotor P1 (Milflores, et al., 2012).

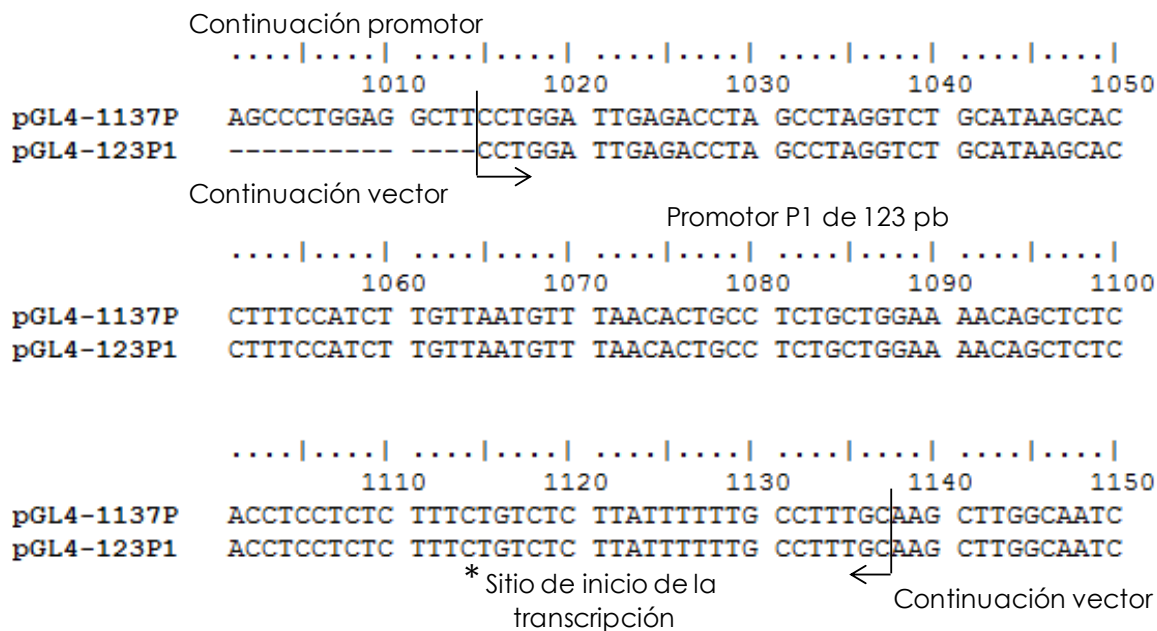


Figura 12. Secuencia del fragmento de 123 pb comparado con el promotor P1 del gen *siat1* completo correspondiendo al 100% de identidad (Milflores, et al., 2012).

Para marcar nuestro sitio de interés usamos el plásmido pGL4-72 el cual es un vector reportero el cual está destinado para usarse como control interno

al cotransfectar células de mamíferos, contiene ADNc que codifica para la luciferasa de Renilla (Rluc) que originalmente fue clonado de *Renilla reniformis* comúnmente conocido como pensamiento del mar, un pólipo con propiedades bioluminiscentes (Figura 13). La luciferasa es una proteína monomérica de 36 kDa, la cual no requiere de modificaciones post-traduccionales para su actividad. El ADNc de la luciferasa de Renilla se encuentra ligeramente modificado para proporcionar una mayor utilidad. El vector PRL-SV40 contiene promotores y/o potenciadores para expresar la luciferasa de Renilla en células de mamíferos.

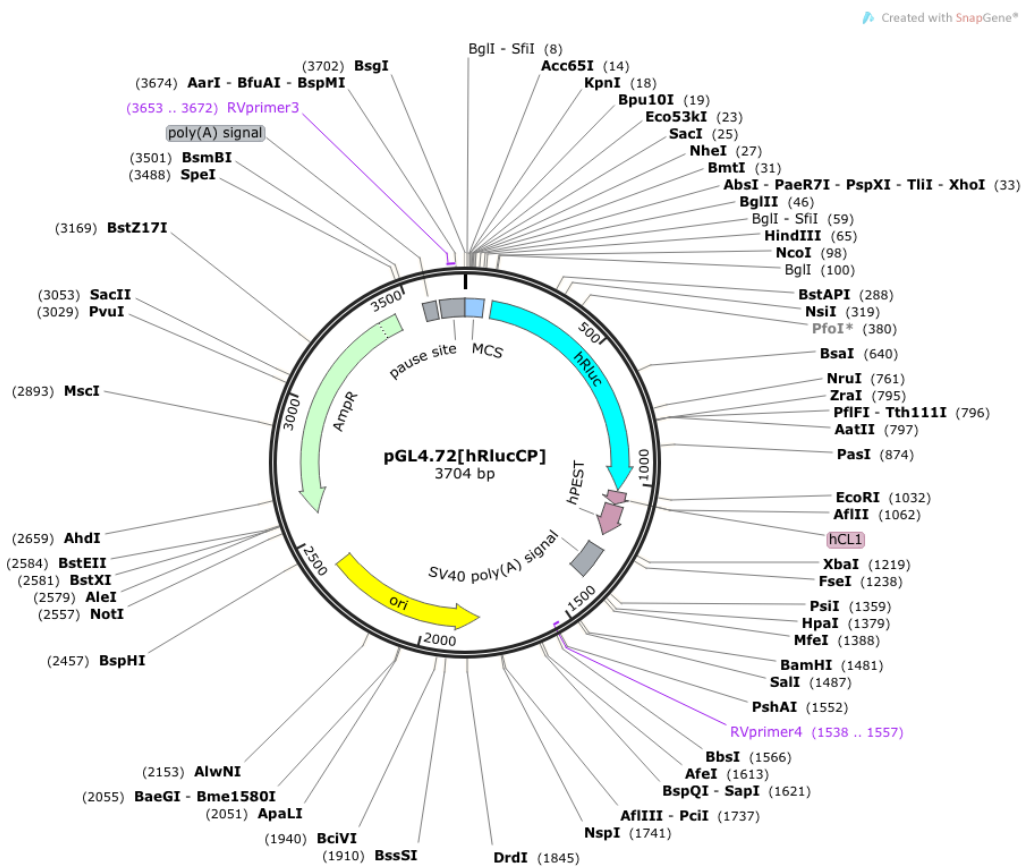


Figura 13. Representación esquemática del plásmido pGL4-72 de 3704 pb. Se muestra el gen reportero luciferasa en azul, el gen de resistencia a ampicilina en verde y se indican otros sitios de restricción del plásmido.

Diseño de muestreo

Transfección de las líneas celulares

La línea celular fue crecida a una confluencia del 90% al 100%. Para ello se sembraron a una densidad de 60,000 células por pozo en placas de 24 pozos, al día siguiente se transfectaron a una confluencia del 80%. Se lavaron las células con PBS 1X para remover los restos de medio con suero, y posteriormente se agregó medio nuevo sin suero y sin antibiótico. La transfección en estas células se realizó con 3 μ L de lipofectamina 2000 (Invitrogen). El complejo (ADN-lipofectamina) se agregó a las células y se incubó por 6 horas, las concentraciones se mencionan en la Tabla 3. Posteriormente las células se lavaron con PBS y se agregó medio nuevo con suero y antibiótico. Las células se incubaron por 24 horas para realizar los ensayos de luminiscencia.

Tabla 3. Se muestra la nomenclatura usada para los ensayos realizados, además de las concentraciones usadas de los respectivos plásmidos.

Nomenclatura	Ensayo	Plásmidos
PDc	Control 1	pGL4-1137P1 600 ng
		pcADNneg 600 ng
		pGL4-72 Renila 20ng
PD	Promotor P1 con E6 y E7 del VPH16	pGL4-1137P1 600 ng
		pcADNE6 300 ng
		pcADNE7 300 ng
		pGL4-72 Renila 20ng
PUc	Control 2	pGL4-1137P1 600 ng
		pcADNneg 300 ng
		pGL4-72 Renila 20ng
PU6	Promotor P1 con E6 del VPH16	pGL4-1137P1 600 ng
		pcADNE6 300 ng

		pGL4-72 Renila 20ng
PU7	Promotor P1 con E7 del VPH16	pGL4-1137P1 600 ng
		pcADNE7 300 ng
		pGL4-72 Renila 20ng
FUc	Control 3	pGL4-123P1 600 ng
		pcADNneg 300 ng
		pGL4-72 Renila 20ng
FU6	Fragmento 105-123 con E6 del VPH16	pGL4-123P1 600 ng
		pcADNE6 300 ng
		pGL4-72 Renila 20ng
FU7	Fragmento 105-123 con E7 del VPH16	pGL4-123P1 600 ng
		pcADNE7 300 ng
		pGL4-72 Renila 20ng
FMc	Control 4	pGL4-123P1 Δ c-Myc 600 ng
		pcADNneg 300 ng
		pGL4-72 Renila 20ng
FM6	Fragmento mutado 105-123 con E6 del VPH16	pGL4-123P1 Δ c-Myc 600 ng
		pcADNE6 300 ng
		pGL4-72 Renila 20ng
FM7	Fragmento mutado 105-123 con E7 del VPH16	pGL4-123P1 Δ c-Myc 600 ng
		pcADNE7 300 ng
		pGL4-72 Renila 20ng

Análisis experimental

Ensayos de luminiscencia

Para determinar la actividad del promotor se evaluó la actividad de la enzima luciferasa de luciérnaga así como de la luciferasa control de Renilla, se realizaron ensayos de luminiscencia utilizando el producto Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, USA). Las células se lavaron con PBS y se lisaron con 100 μ L de Passive Lysis Buffer (PLB) por pozo durante 15 minutos a temperatura ambiente. De este lisado se tomaron 20 μ L, a los cuales se les agregaron 20 μ L de Luciferase Assay Reagent II. La primera lectura corresponde a la actividad de la luciferasa de *Photinus pyralis*, y una vez tomada se agregaron 20 μ l de Stop & Glo que apaga la primera reacción y contiene el sustrato para la luciferasa de *Renilla reniformis*.

Las lecturas de ambas luciferasas se determinaron en el mismo lisado celular en un luminómetro Glomax 20/20.

Análisis estadístico

El valor de luminiscencia obtenido de los diferentes ensayos se normalizó dividiéndolo entre el valor que se obtiene del plásmido control, pGL4.72 (*hRlucCP*), este valor se consideró como 1.

Para determinar diferencias estadísticas de la actividad del promotor en los diferentes ensayos se normalizaron los datos y se realizó una prueba estadística t de student; los valores de $P < 0.05$ se consideraron como significativos.

RESULTADOS

Los plásmidos pGL4-1137P1, pcADNE6, pcADNneg purificados fueron sometidos a electroforesis y posteriormente se cuantificó su concentración por espectrofotometría (Figura 14 y Tabla 4), los demás plásmidos ya habían sido purificados con anterioridad por personal del laboratorio.

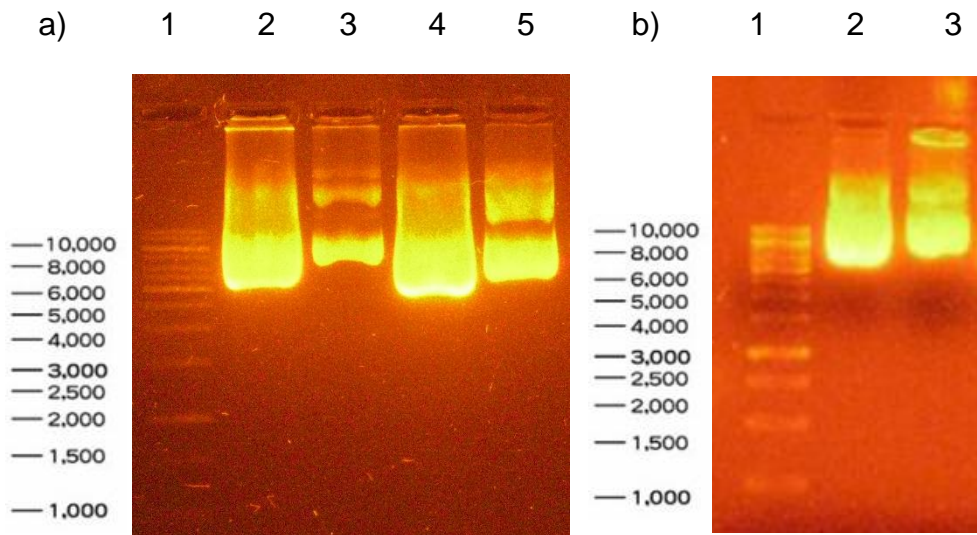


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pcADNE6, pcADNneg y pGL4-1137P1. a) Carril 1 marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2 y 3 pcADNE6, 4 y 5 pcADNneg. b) Carril 1 marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2 y 3 pGL4-1137P1.

Tabla 4. Concentración obtenida de los plásmidos pcADNE6, pcADNneg y pGL4-1137P1 tras la purificación de ADN plásmidico.

Plásmido	Concentración (ng/μl)
pcADNE6	3190
pcADNneg	3010
pGL4-1137P1	1170

Para evaluar el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 en la actividad transcripcional del promotor P1 completo del gen *siat1* se realizaron 18 ensayos de transfección con los plásmidos pGL4-1137P1, pcADNE6, pcADNE7 y pcADNneg en la línea celular C33A, como control para evaluar la eficiencia de la transfección se usó el plásmido pGL4-72 que codifica para la luciferasa de *R. reniformis*, el método se describe paso a paso en anexos. La actividad registrada fue medida mediante ensayos de luminiscencia 24 horas posteriores a la transfección.

Los resultados muestran que la actividad del promotor P1 disminuye en presencia de las oncoproteínas E6 y E7. Los valores que se muestran en la gráfica corresponden al porcentaje de disminución de la actividad del promotor P1 del gen *siat1* en presencia de las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH16 en conjunto y por separado (Figura 15).

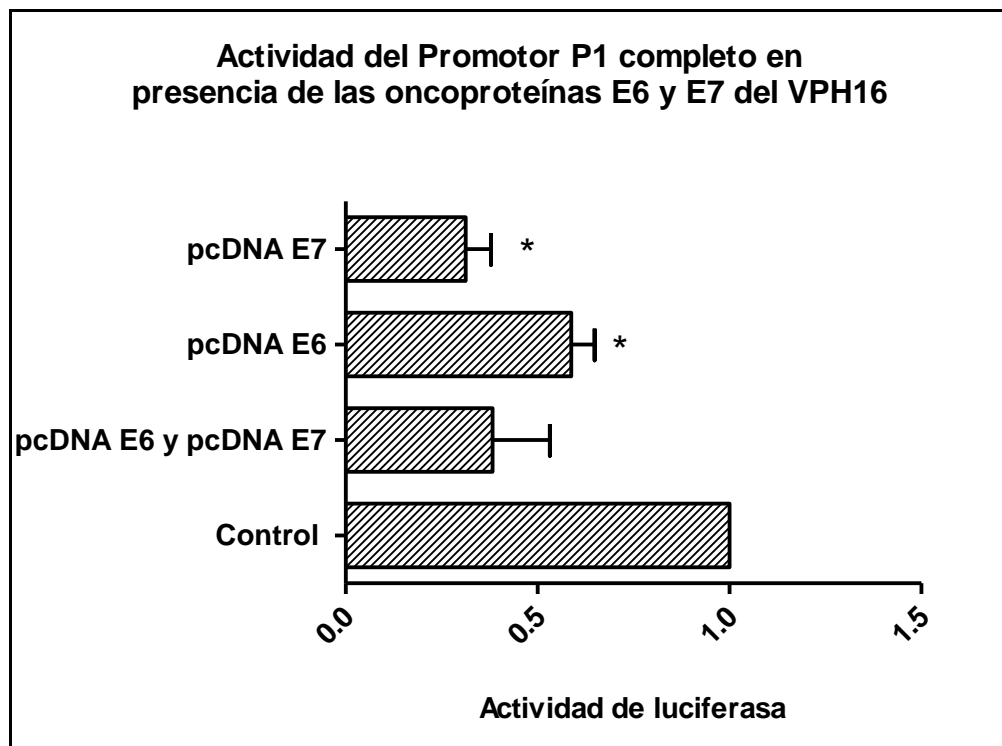


Figura 15. Actividad del promotor completo P1 completo en presencia de las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH16 en células C33A, los ensayos se realizaron tres veces por triplicado. El * indica que el valor de $P < 0.05$

(prueba t student). La actividad del promotor P1 completo se comparó en presencia o ausencia de las oncoproteínas E6 y E7 en conjunto y por separado.

Para determinar diferencias entre la actividad transcripcional del promotor en ausencia o presencia de las oncoproteínas virales se realizó un análisis estadístico con la prueba t de student utilizando el software GraphPad Inc., versión 5.00.288, usando una $P < 0.05$.

El análisis de los resultados muestra que la actividad del promotor disminuye un 60% cuando el promotor se transfecta en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 sin embargo las diferencias no son significativas ya que la desviación estándar fue elevada. Cuando transfectamos al promotor con las oncoproteínas E6 y E7 por separado el efecto es una disminución de 40% y 70% respectivamente, comparando la actividad del promotor completo en ausencia de las oncoproteínas, se obtuvieron diferencias significativas en ambos casos.

Con base en los objetivos planteados se evaluó el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 en la actividad transcripcional del fragmento 123P1 del promotor P1 del gen de la ST6Gal I para lo cual se realizaron ensayos de transfección de los plásmidos pGL4-123P1, pcADNE6, pcADNE7 y pcADNneg, además del plásmido pGL4-72 que codifica para la luciferasa de *R. reniformis* como control interno en la línea celular C33A. La actividad registrada se midió con ensayos de luminiscencia tras 24 horas de la transfección.

El valor de luminiscencia obtenido de los diferentes ensayos se normalizó dividiéndolo entre el valor que se obtiene del plásmido control, pGL4.72 (*hRlucCP*), este valor se consideró como 1. Los valores que se muestran en la gráfica corresponden al porcentaje de disminución de la actividad del fragmento 123P1 del gen de la ST6Gal I en presencia de la oncoproteína E6 y E7 del VPH16 (Figura 16).

Para determinar si existían diferencias significativas entre la actividad transcripcional del fragmento 123P1 en presencia y ausencia de las oncoproteínas virales se realizó la prueba estadística t de student, el valor de $P < 0.05$ como significativo.

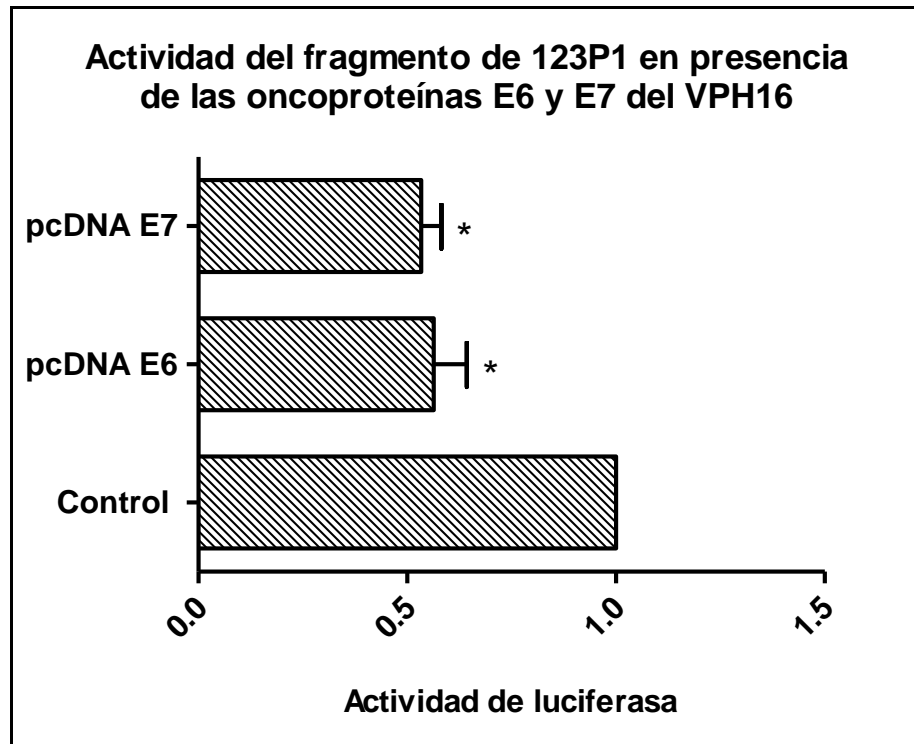


Figura 16. Actividad del fragmento 123P1 en presencia de las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH16 en células C33A, los ensayos fueron realizados tres veces por triplicado. El * indica que el valor de $P < 0.05$ (prueba t student). La actividad del fragmento 123P1 completo se comparó con la actividad del fragmento 123P1 en presencia de las oncoproteínas E6 y E7.

Los resultados nos indican que la actividad del fragmento 123P1 disminuye alrededor del 40% en presencia de las oncoproteínas E6 y E7, el análisis estadístico mostró diferencia significativa en la actividad del promotor en presencia de las oncoproteínas con respecto del control.

Por último se buscó evaluar el efecto de la mutación del sitio de unión a c-Myc sobre la actividad del promotor en el fragmento de 123 pb, y el efecto de las oncoproteínas virales, por lo que se realizaron otros 18 ensayos de transfección en la línea celular C33A usando los plásmidos 123P1 q (delta) c-

Myc, pcADNE6, pcADNE7 y pcADNneg, además del plásmido pGL4-72 que codifica para la luciferasa de *R. reniformis* como control interno de la transfección. La actividad se evaluó a través de ensayos de luminiscencia 24 horas postransfección. El valor de luminiscencia obtenido de los diferentes ensayos se normalizó dividiéndolo entre el valor que se obtiene del plásmido control, pGL4.72 (*hRlucCP*), este valor se consideró como 1. Los valores que se muestran en la gráfica corresponden al porcentaje de disminución de la actividad del fragmento 123P1 Δ c-Myc del gen de la ST6Gal I en presencia de la oncoproteína E6 y E7 del VPH16 (Figura 17).

Para determinar diferencias significativas entre la actividad transcripcional del fragmento 123P1 Δ (delta) c-Myc en presencia y ausencia de las oncoproteínas virales se realizó la prueba estadística t de student, identificando como significativos valores de $P < 0.05$.

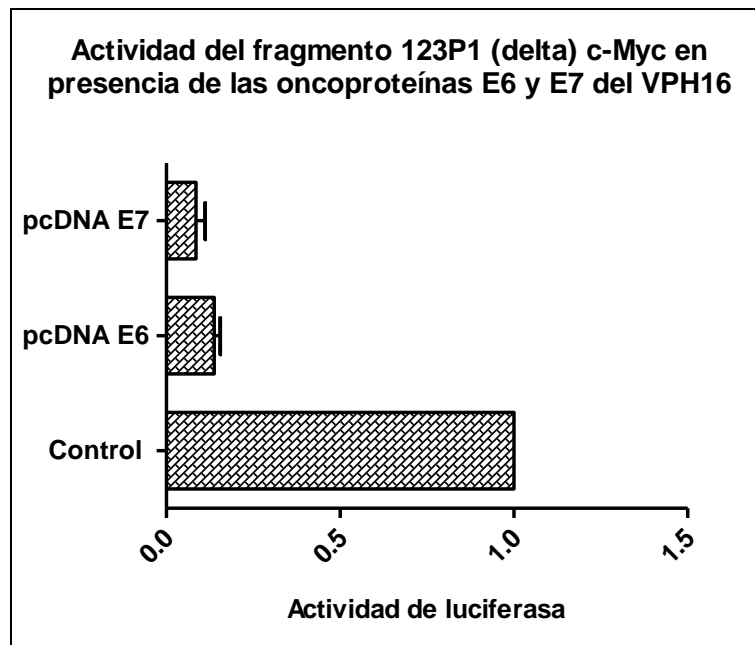


Figura 17. Actividad del fragmento 123P1 Δ (delta) c-Myc en presencia y ausencia de las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH16 en células C33A, los ensayos fueron realizados tres veces por triplicado. El * indica que el valor de $P < 0.05$ (prueba t student). La actividad del fragmento 123P1 completo se comparó con la actividad del fragmento 123P1 Δ c-Myc en presencia de las oncoproteínas E6 y E7.

*

*

Los resultados indican que la actividad del fragmento 123P1 α c-Myc disminuye drásticamente en ambos casos en presencia de las oncoproteínas E6 y E7, aproximadamente el 90%, la prueba t indica que las diferencias son significativas con respecto del control.

Los ensayos realizados tanto en el fragmento 123P1 como en el 123P1 α (delta) c-Myc muestran una disminución significativa de la actividad transcripcional en presencia de las oncoproteínas E6 y E7, esta disminución es mayor en presencia de la oncoproteína E7.

DISCUSIÓN

La sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 es un factor necesario para la progresión del cáncer cervical después de una infección por VPH. El mecanismo de acción de los VPH de alto riesgo (16 y 18) en el desarrollo de una neoplasia cervical, se da principalmente por la acción de estas oncoproteínas virales que participan en diversas funciones celulares (Lizano, et al., 2009).

Durante la transformación maligna del cérvix se han identificado cambios a nivel de la expresión de carbohidratos de membrana y en la expresión de genes involucrados en la glicosilación. Uno de los genes de glicosilación que modifican su expresión es el gen *siat1*, este gen codifica para la sialiltransferasa ST6Gal. La expresión de este gen es regulada por tres promotores, el promotor P1 es el que regula la expresión de la isoforma del ARNm que se incrementa en CaCu. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos de regulación y si las oncoproteínas virales E6 y E7 modifican de alguna manera la actividad del mismo (Wang, et al., 2002), (Wang, et al., 2003), (Roy & Chakraborty, 2005), (López, et al., 2009), (López, et al., 2010).

El objetivo de este proyecto de investigación fue determinar el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 sobre la actividad del promotor P1 del gen de la ST6Gal I en la línea celular de cérvix C33A, para ello se realizaron varios ensayos de transfección, en los que se evaluó la actividad transcripcional del promotor P1 del gen *siat1* así como de un fragmento de 123 pb y el fragmento 123P1 Δ c-Myc en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16.

Los resultados mostraron que la actividad del promotor P1 completo disminuyó en presencia de las oncoproteínas E6 y/o E7 del VPH16,

observándose un mayor efecto con la proteína E7. Dado que la isoforma del ARNm que se incrementa en CaCu es resultado de la actividad de este promotor, y aunado al hecho de que prácticamente todos los tumores malignos de cérvix presentan genomas del VPH y expresan las oncoproteínas virales E6 y E7, esperábamos que la actividad del promotor se incrementara en presencia de las oncoproteínas virales. Estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual se incrementa la expresión de la isoforma Y en CaCu no es resultado de la actividad de las proteínas virales si no a través de otra vía.

Para comenzar a identificar qué región del promotor jugaba un papel importante en el efecto de regulación negativa observado en presencia de las proteínas virales decidimos evaluar un fragmento de 123 pb del promotor P1, del cual se eliminó el extremo 5', este extremo presenta diferentes sitios de unión a factores de transcripción como: c-Myc, GATA1, GATA2, Ets-1, AP1, YY1, Sp1, entre otros.

Los resultados mostraron una disminución en la actividad del fragmento del promotor de 123 pb, lo que sugería que el efecto ejercido por las oncoproteínas tenía lugar a través de esta pequeña región del promotor, dentro de la cual se identificaron sitios de unión a Ets-1, HNF1, Sp1, c-Myc, así como 3 secuencias de iniciación, una de las cuales (la Inr3) sobrelapa con el sitio de unión a c-Myc (Milflores, et al., 2012).

La oncoproteína E6 es capaz de abatir la apoptosis a través de su unión con la proteína pro-apoptótica c-Myc la cual es marcada para su degradación induciendo así un aumento en la proliferación de las células infectadas (Lizano, et al., 2009). Por otro lado se ha visto que E6 es capaz de transactivar el promotor de la telomerasa requiriendo tanto de los sitios de unión a c-Myc como del propio factor de transcripción, identificándose ambas proteínas en el promotor (Gewin & Galloway, 2001). Estudios genéticos demostraron que las secuencias de VPH se integran cerca de sitios donde se localizan secuencias

de proto-oncogenes, como es el caso de c-Myc (Taja, et al., 1996). Reportes previos indican que la oncoproteína E7 interacciona con c-Myc para activar la transcripción. Se ha demostrado que c-Myc puede activar la transcripción por la interacción directa con la ARN polimerasa I en ausencia de la ARN polimerasa II (Grandori, et al., 2005), por lo que podría estar modulando la actividad transcripcional junto con E6 y E7. La interacción de c-Myc con las proteínas E6 y E7 pudiera ser determinante en la actividad del promotor P1. Por tal motivo nos interesó determinar si el sitio de unión a c-Myc presente en este fragmento del promotor jugaba un papel en el efecto observado.

Los resultados obtenidos mostraron que la actividad del fragmento del promotor 123P1 Δ c-Myc disminuye en presencia tanto de la oncoproteína E6 como de la oncoproteína E7, siendo un efecto aun mayor que en el fragmento sin mutar, disminuyendo su actividad alrededor del 90%. Resultados ya reportados por nuestro grupo, en los que se evaluó la actividad del promotor completo, el fragmento de 123 pb y el fragmento mutado, mostraron que la delección del extremo 5' incrementaba alrededor de 5 veces la actividad del fragmento de 123 pb con respecto al promotor completo, sin embargo, en presencia de la mutación la actividad del promotor descendía a una actividad semejante a la del promotor completo, lo que sugería que este sitio jugaba un papel importante en la actividad del promotor. De tal manera que el efecto que estamos observando en presencia de las oncoproteínas virales en el fragmento mutado sugiere que su efecto no es a través de este sitio de unión, por lo que es importante continuar evaluando, a través de que sitios podrían estar ejerciendo su efecto.

Sin embargo como se mencionó previamente el sitio putativo de unión a c-Myc- sobrelapa con un sitio de iniciación de la transcripción, el cual podría ser clave para la actividad de este promotor lo que explica en parte el descenso en la actividad del mismo cuando es mutado.

La perspectiva de este trabajo es continuar con el estudio de los mecanismos de regulación aún poco esclarecidos para este promotor, con la finalidad de identificar qué factores están incrementando la actividad del mismo en cáncer CaCu para generar estrategias que permitan disminuir su actividad y en consecuencia, la α 2,6 sialilación asociada con una mayor capacidad de invasión del tumor. Esto proporcionaría un nuevo enfoque terapéutico en el tratamiento de CaCu a través de la regulación de la expresión de genes asociados con un fenotipo maligno.

CONCLUSIONES

Las oncoproteínas virales E6 y E7 disminuyen la actividad del promotor P1 del gen *siat1*, en células C33, este efecto parece ser ejercido en la región de 123 pb (-99 a +24 pb) siendo aparentemente independiente del sitio de unión a c-Myc.

BIBLIOGRAFÍA

Alonso, P., Lazcano, E. & Hernández, M., 2001. *Cáncer cervicouterino, diagnóstico, prevención y control.* 1ra Edición ed. Estado de México: Editorial Medica Panamericana.

Dall'Olio, F; Chiricolo, M; D'Errico, A; Gruppioni, E; Altimari, A; Fiorentino, M; Grigione, W. F. 2004. *Expression of β -galactoside α 2,6 sialyltransferase and of α 2,6-sialylated glycoconjugates in normal human liver, hepatocarcinoma, and cirrhosis.* Glycobiology, Vol. 14, pp. 34-49.

De la Fuente, D., Guzmán, S., Barboza, O. & González, R. A., 2010. *Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico.* Medicina Universitaria. Vol. 12(49), pp. 231-238.

Fernandez, P. C; Frank, S. R; Wang, L; Schoroeder, M; Liu, S; Greene, J; Cocito, A; Amati, B. 2003. *Genomic targets of the human c-Myc protein.* Genes Dev., Vol. 17, pp. 1115-1129.

Gewin, L. & Galloway, D., 2001. *E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc.* J Virol., Vol. 75(15), pp. 7198-7201.

Girão, M. H. & Barem, S. H., 2006. *Impacto do oncogene C-MYC no câncer.* Revista Brasileira de Cancerologia, Vol. 52(2), pp. 165-171.

Grandori, C; Gomez, Roman N; Felton, Edkins Z. A; Ngouenet, C; Galloway, D. A; Eisenman, R. N; White, R. J. 2005. *c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I.* Nature Cell Biol., Vol. 7, pp. 311-318.

Harduin, Lepers A; Recchi, M. A; Hebar, M; Samyin, Petit B; Vallejo, Ruiz V; Julien, S; Peyrat, J. P; Delannoy, P, 2001. *The human sialyltransferase family.. Biochimie.* , Vol. 83, pp. 727-737.

INEGI, 2014.: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo125&s=est&c=23589> [Último acceso: 07 mayo 2014].

Jiménez, M. C.; Trejo, H.; Herrera, A.; Romero, J. L.; Chávez, R; Lascurain, R; Zenteno, E. 2002. *Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas.* Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex., Vol. 15(1), pp. 39-47.

Junttila, M. R. & Westermarck, J., 2008. *Mechanisms of MYC stabilization in human malignancies.* Cell Cycle., Vol. 7, pp. 592-596..

Le Roux, L. G. & Moroianu, J., 2003. *Nuclear Entry of High-Risk Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein Occurs via Several Pathways.* Journal of Virology, Vol. 77(4), pp. 2330-2337.

Lizano, M., Carrillo, A. & Contreras, A., 2009. *Infeción por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis.* Cancerología, Vol. 4, pp. 205-216.

Lodish, H; Berk, A; Matsudaira, P; Kaiser, C; Krieger, M; Scott, M; Zipursk, L; Darnell, J, 2005. *Biología Celular y Molecular.* 5ta edición ed. Bogotá, Colombia: Editorial Medica Panamericana.

López, D., 2003. *Análisis de la Expresión de carbohidratos y sialiltransferasas en tejido cervicouterino con diferente grado de neoplasia* Tesis para obtene el título de Maestra en Ciencias Químicas, Área de Bioquímica y Biología Molecular. Directora de Tesis, Dra. Verónica Vallejo Ruíz ed. Puebla, Puebla, México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

López, D; Reyes, J; Santos, G; Zenteno, E; Vallejo, V, 2010. *Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions*. Diagnostic Pathology, Vol. 5(74).

López, D. & Vallejo, V., 2007. *Expresión de ácido sialico y de la beta-galactosido-alfa-2,6 sialiltransferasa en cáncer*. Revista de Educación Bioquímica, Vol. 26(3), pp. 93-98.

López, D; Velázquez, N; Valenzuela, O; Santos, G; Reyes, J; Vallejo, V, 2009. *Enhanced sialyltransferases transcription in cervical intraepithelial neoplasia*. Invest Clin, Vol. 50(1), pp. 45-53.

Mendoza, J A; Muñoz, M; Tellez, L E; Vielma, S; Mosqueda, N; Pérez, S; Quintero, B, 2007. *Virus y cáncer: el ejemplo de los papilomavirus humanos*. Revista Médica de la Extensión Portuguesa, Vol. 1(3), pp. 133-144.

Milflores, L; Millan, L; Santos, G; Reyes, J; Vallejo, V, 2012. *Characterization of P1 promoter activity of the β -galactoside α 2,6sialyltransferase I gene (siat 1) in cervical and hepatic cancer cell lines*. J. Biosci. , Vol. 37(2), pp. 1-8.

Murray, R., Granner, D., Mayes, P. & Rodwell, V., 2004. *Bioquímica de Harper*. Edición 16 ed. México: Manual Moderno.

Patiño, L. N., 2007. *Influencia de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH en la expresión del receptor ErbB2*, Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biomedicina Molecular. Dr. Fernando Enriquez Rincón ed. Cd. de México: Instituto Politecnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía.

Regueiro, J. R., López, C., González, S. & Martínez, E., 2010. *Inmunología, Biología y patología del sistema inmune*. 4ta edición ed. Madrid, España: Editorial Medica Panamericana.

Roy, S. & Chakraborty, S. K., 2005. *Damage Detection of Bridge Girder Pier System From Modal Data*. Int. J. Appl. Mech.& Engng, Vol. 10(4).

Soucek, L. & Evan, G. I., 2010. *The ups and downs of MYC biology*. Curr. Opin. Genet. Dev., Vol. 20, pp. 1-8.

Taja, L., Salas, M. & Salcedo, M., 1996. *Bases moleculares de la carcinogénesis viral de papiloma y polioma*. Salud Publica Mex, Vol. 38(1), pp. 47-57.

Taniguchi, A., Hasegawa, Y., Higai, K. & Matsumoto, K., 2000. *Transcriptional regulation of human β -galactoside α 2,6-sialyltransferase (*hST6Gal I*) gene during differentiation of the HL-60 cell line*. Glycobiology, Vol. 10(6), pp. 623-628.

Varki, A; Cummings, R. D; Esko, J. D; Freeze, H. H; Stanley, P; Bertozzi, C. R; Hart, G. W; Etzler, M. E, 2009. *Essentials of Glycobiology*. NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Velazquez, N; Paredes, M. A; Pérez, H; Santos, G; Reyes, J; Vallejo, V, 2008. *Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from a rural region of Puebla, Mexico*. ELSEVIER International Society for Infectious Diseases, pp. 690-695.

Wang, P.-H., 2005. *Altered Glycosylation in Cancer: Sialic Acids and Sialyltransferases*. Journal of Cancer Molecules, Vol. 1(2), pp. 73-81.

Wang, P.H; Lee, W.L.; Lee, Y.R.; Juang, C.M; Chen, Y.J; Chao, H.T.; Tsai, Y.H.; Yuan, C.C, 2002. *Expression of Sialyltransferase Family Members in Cervix Squamous Cell Carcinoma Correlates with Lymph Node Metastasis*. Gynecologic Oncology, Vol. 86, pp. 45-52.

Wang, P.H; Lee, W.L.; Lee, Y.R.; Juang, C.M; Chen, Y.J; Chao, H.T.; Tsai, Y.H.; Yuan, C.C, 2003. *Enhanced expression of 2,6-sialyltransferase ST6Gal I in cervical squamous cell carcinoma*. *Gynecologic Oncology*, Vol. 89, pp. 395-401.

ANEXOS

Descripción de técnicas

Células competentes

1. Un día antes se prepara un precultivo en 5 ml de LB con 100 µl de *E. coli* TOP10 y se deja incubar por 12 horas en agitación constante de 250 rpm a 37°C.
2. Se coloca un precultivo nuevo con 100 µl de *E. coli* TOP10 y se deja incubar por 3 ½ horas en agitación constante de 250 rpm a 37°C.
3. Se mide la densidad en el espectrofotómetro, la cual es óptima 0.6, una vez revisado esto se coloca en hielo por 15 min.
4. Se empaquetan las bacterias (los 5ml) en un tubo de plástico de 15 ml y se centrifuga a 4'000 rpm por 10 min a 4°C.
5. Se tira el sobrenadante y se lava la pastilla con 500µl de CaCl₂ 0.1M y se pasa a un tubo de 1.5 ml, nuevamente se incuba en hielo por 15 min.
6. Se centrifuga a 4'000 rpm por 10 min a 4°C, se decanta el sobrenadante y se agregan otros 100µl de CaCl₂ y se re suspende con cuidado.

Cultivo celular

Para mantener la línea celular C33A se realiza el siguiente procedimiento:

1. Se revisa que las células no posean ninguna anomalía o contaminación en el microscopio invertido, cuando se encuentren a una confluencia de entre 80 – 100% se dividen y se lavan, de lo contrario solo se lavan.
2. Se retira el medio DMEM y se resuspenden las células.
3. Se lava 3 veces con 2.5 ml de PBS.

4. Se tripsiniza con 0.5 ml, se homogeniza y retira la tripsina, las células se revisan en el microscopio.
5. Se incuba en la estufa por 3 minutos y se lleva a revisar al microscopio, una vez que se hayan despegado del fondo de la caja p25, se deben ver brillantes y redondas.
6. Se agrega medio DMEM y se resuspende hasta homogenizar con 2 ml y se retira el exceso, dejando solo 3 gotas.
7. Se agregan 5 ml de medio DMEM.

Ensayo de luciferasa con el Kit Dual Luciferasa Promega

1. Pasadas las 24 horas se saca la placa de la incubadora.
2. Se retira el medio DMEM y se lavan una vez con PBS 1x.
3. Se agregan 100 μ l de buffer de Lisis al 1x por pozo.
4. Se agita a 1000 rpm por 15 minutos.
5. Se toman 20 μ l del pozo y se pone en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
6. Se llevan las muestras al Luminometro Glomax 20/20.
7. En condiciones de oscuridad se agregan 20 μ l de LAR1 y se mezcla vigorosamente con la micropipeta, se inserta el tubo en el Glomax y se toma la medida.
8. Se agrega LAR2 (20 μ l) y se mezcla vigorosamente.
9. Se toman las medidas y se desechan las muestras.

Ensayos de transfección con lipofectamina

1. Se ponen 150 μ l de DMEM sin suero y sin antibiótico en los tubos eppendorf de 1.5 ml
2. Se agregan 3 μ l de lipofectamina y se mezcla suavemente con la micropipeta.
3. Se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos.

4. Una vez descongelados los plásmidos se agregan con las concentraciones indicadas en cada respectivo ensayo.
5. Se mezclan con cuidado utilizando la micropipeta, una vez mezclados se pasan los tubos con medio y lipofectamina, se mezclan nuevamente con cuidado resuspendiendo con la micropipeta.
6. Se incuba a temperatura ambiente por 20 minutos.
7. La placa en donde fueron sembradas las células C33A se lava, retirando el medio y agregando PBS 1x estéril con cuidado una sola vez, se retira inmediatamente el PBS.
8. Se agregan 400 µl de medio sin suero por pozo.
9. Ya pasados los 20 minutos se agregan 100 µl \pm 5 de cada uno de los complejos por pozo, esto se realiza moviendo suavemente la placa mientras se agrega por goteo con mucho cuidado.
10. A las 6 horas se les retira el medio sin suero, se lavan una vez con PBS 1x estéril y se les pone medio con suero.
11. Se esperan 24 horas para hacer el ensayo de luminiscencia.

Purificación de ADN plasmídico con el kit Nucleobond Purification Xtra Maxi Plus

1. Hacer un precultivo de las células agregando una colonia en 3 – 5 ml de medio LB líquido, dejar por 8 horas a 250 rpm y 37°C.
2. Cultivar una asada del precultivo (100µl) en 500 ml con antibiótico, dejar 12 -16 horas a 250 rpm a 37°C.
3. Centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C.
4. Resuspender la pastilla en 12 ml de Buffer RES y vortexear hasta disolver completamente. Se debe revisar que el LYS este suspendido.
5. Agregar 12 ml de Buffer LYS a la mezcla, homogenizar por inmersión e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

6. Mientras se incubaba la muestra se procede a equilibrar la columna con 25 ml de Buffer EQU. Agregar el Buffer rodeando el filtro.
7. Una vez incubada la muestra agregar 12 ml de NEU a la muestra y mezclar por inversión de 10 – 15 veces hasta que se homogenice (no usar vortex).
8. Verter el lisado en la columna (filtro papel) y descartar el sobrenadante.
9. Lavar el filtro con 15 ml de EQU rodeando el filtro y desechar el filtro.
10. Lavar la columna con 25 ml de buffer WASH procurando cubrir toda la superficie de la columna.
11. Trasferir la columna a un tubo estéril falcon de 50 ml.
12. Agregar 15 ml de ELU a la columna, tomar el sobrenadante y desechar la columna.
13. Agregar 10.5 ml de isopropanol al tubo y mezclar en el vortex, incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
14. Por otra parte, quitar el embolo a la jeringa y poner el filtro.
15. Agregar la mezcla a la jeringa e ir bajando el embolo lentamente, se desecha el sobrenadante.
16. Quitar el filtro, quitar el embolo, poner el filtro y agregar 5 ml de etanol al 70%, desechar el sobrenadante.
17. Retirar el filtro, retirar el embolo poner el filtro y pasar aire para secar el filtro, repetir por 16 veces o hasta que no salga nada de líquido.
18. Retirar el filtro y pasarlo a la jeringa pequeña recordando quitar el embolo antes.
19. Colocar 500 µl de Tris (Tris/HCl, 5mM, pH 8.5 ó H₂O estéril) y pasar por la jeringa, recolectar en un tubo de 1.5 ml, volver a quitar el filtro, el embolo, poner el filtro y volver a pasar 500 µl recolectados en el tubo.

20. Repetir el paso 19 pero con Tris ó H₂O nuevo (500 µl).

Siembra de E. coli TOP 10

1. En condiciones de esterilidad se toman 100 µl de *E. coli* TOP10 y se agregan a 5 ml de medio LB estéril.
2. Se incuban en al agitadora a 37°C y 250 rpm durante 24 horas.
3. Están listas cuando el medio LB ya no se observa transparente sino lechoso.

Transformación de células competentes

1. Inmediatamente después de seguir el procedimiento para realizar las células competentes se agrega el plásmido que se desea clonar, 2µl (depende de la concentración a la que se encuentre).
2. Se mezcla e incuba 10 min en hielo, posteriormente se da un choque térmico a 42°C por 45 segundos en el termoblock y rápidamente se incuba 2 min en hielo.
3. Agregar 1 ml de medio LB e incubar.
4. Incubar a 37°C a 250 rpm por 1hr.
5. Centrifugar a 4'000 rpm por 10min a 4°C.
6. Decantar y agregar 300µl de LB.
7. Resuspender y plaquear (100-300µl, depende de la concentración de bacterias).

Soluciones

Antibiótico para DMEM

Marca Sigma, contiene 10'000 U/Penicilina, 10 mg de estreptomina y 25 µg de anfotericina B/ml

Cloruro de Calcio (ClCa₂) 0.1 M para células competentes

Para preparar 25 ml se usan 0.277 g de ClCa₂, peso molecular de 110.994 mol, se afora con agua di destilada, se esteriliza a 120°C y 15 Lb de presión durante 15 min.

Gel de Agarosa

Se agregan 0.35 g de agarosa en 35 ml de TBE 1x, se disuelve en el magnético y se eleva ligeramente la temperatura, una vez disuelto el gel se espera a que se enfríe y sin que gelifique se agregan 3 µl de Bromuro de Etilo.

Lipofectamina 2000

Es un reactivo patentado por invitrogen para transfectar ácidos nucleicos en una amplia gama de líneas celulares eucariotas con un alto nivel de eficiencia.

Medio de cultivo Dulbecco´s Modificado Eagle´s Medium (DMEM)

Marca Sigma, alto en glucosa 13.4 g/L es una modificación del Basal Medium Eagle (BME), y que contiene una concentración cuatro veces mayor de aminoácidos y vitaminas entre otros componentes, contiene 4'500 mg/L de glucosa, 110 mg/L de piruvato de sodio y 4 mM de L-glutamina.

Medio de cultivo Luria Bertani (LB)

Para preparar 1 L. Se usan 10 g de bacto triptona (se puede usar peptona de caseína), 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio (NaCl) y en dado caso de que sea gelificado se agregan 15 g de bacto agar. Se afora con agua didestilada a 1 L. Se esteriliza a 120°C y 15 Lb de presión durante 15 min.

PBS 1x

Es usado para retirar los residuos de medio, desechos celulares, suero y antibiótico de los cultivos celulares, y así aumentar la eficiencia de la Tripsina. Para preparar 1 L. Se usan 1.44 g de fosfato de sodio (Na_2HPO_4), 0.24 g de fosfato de potasio (KH_2PO_4), 8 g de cloruro de sodio (NaCl) y 0.2 g de cloruro de potasio (KCl), se afora con agua di destilada a 1 L y se disuelve en el agitador magnético. El pH se ajusta a 7.2 – 7.4.

Stock de Ampicilina

Se prepara a una concentración de 100 mg/ml, se diluye con solución inyectable, se mantiene en hielo durante su uso, si se guarda a 4°C se mantiene hasta por 4 meses, si se conserva en el congelador a -20°C, perdura hasta 12 meses.

Suero Bovino Fetal (SFB)

Se adiciona al 5% en el DMEM, de marca Gibco de Invitrogen.

Tripsina EDTA

Marca Sigma, contiene 2.6 g de tripsina y 0.2 g de EDTA

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
aa	Aminoácidos
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Asn	Asparagina
bHLH-LZ	Proteína con estructura hélice-asa-hélice/cierre leucina básica
CaCu	Cáncer cervicouterino
Cys	Cisteína
DMEM	Dulbecco's Modificado Eagle's Medium
HCl	Ácido clorhídrico
Inr	Sitio de inicio de la transcripción
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilo Dalton
LB	Medio Luria Bertani
mM	Mili molar
NaCl	Cloruro de sodio
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
nm	Nanómetro
P1	Promotor 1
pb	Pares de bases
PDZ	Proteína con estructura de dedos de zinc
Rb	Retinoblastoma
Rluc	Renilla luciferasa
rpm	Revoluciones por minuto
Ser	Serina
SFB	Suero bovino fetal
<i>siat1</i>	Gen de la ST6Gal I
STs	Sialiltransferasas
ST6Gal I	β -galactósido- α 2,6 sialiltransferasa
Thr	Treonina
VPH	Virus del papiloma humano

