

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA TEÓRICA

**Análisis teórico de los fragmentos E2 de VPH 6, 11, 16, 18 y 31 que
interactúa con el segmento CAACCGAATTCGGTTG del ADN**

Tesis para obtener el título de:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

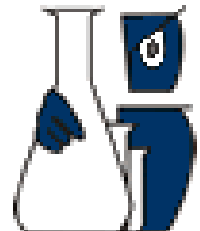
Presenta:

p. QFB. ANA LAURA RONQUILLO TÉLLEZ

DR. JUAN CARLOS RAMÍREZ GARCÍA. Director

DRA. BLANCA MARTHA CABRERA VIVAS. Asesora

Puebla, Puebla. Marzo 2015





BUAP

M.C. JOSE DE GPE. QUIROZ OROPEZA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
P R E S E N T E

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de la Tesis del alumno
de la carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO
RONQUILLO TELLEZ ANA LAURA

realizada en el area de Fisico-Química, comunican a Ud. la aprobación
de la misma con la siguiente redacción:

**Análisis teórico de los fragmentos E₂ de VPH 6,11,15,18 y 31 que interactúa con
el segmento CAACCGAATTGGTTG del DNA**

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, a los
17 días del mes de Marzo de 2015

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DRA. FLOR PILAR PINEDA GARCIA

MC. VIRGINIA ROSAS ZAYAS

MC. EDUARDO VELASCO SANCHEZ

C.c.p. Archivo

Facultad
de Ciencias
Químicas

Av. San Claudio y 18 Sur,
Límite 105 - I, Col. San Marcos,
Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue., C.P. 72540
Tel. (0221) 229 55 00 Ext. 2285 y 01 (222) 241 01 05

DEDICATORIAS

A mis papás,

Mamá, gracias por el tiempo que me dedicaste y enseñarme que siempre debo luchar por lo que quiero y donde quiera que estés sabes que te admiro y gracias a ti soy la mujer que soy ahora. Papá sabes que te quiero mucho y te agradezco de corazón por todo tu apoyo y estar conmigo en las buenas y en las malas.

A Natalia,

Aunque ahorita estás muy chiquita, sabes que eres lo más importante de mi vida, y soy feliz de tenerte conmigo.

A Elisa,

Gracias por ser siempre mi apoyo, mi confidente y la mejor hermana.

Al Dr. Juan Carlos Ramírez García,

Por aceptarme a trabajar con usted, sus enseñanzas, su paciencia, sin usted no sería posible la realización de éste trabajo.

A Viry y Lucy,

Por demostrarme que la verdadera amistad existe.

Al Mtro. Óscar Pérez Toriz,

Por su apoyo incondicional desde que entre a la carrera.

Al Departamento de Fisicoquímica,

En particular a la Dra. Flor y el Dr. Julio gracias por su consejos.

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía atómica: la voluntad.”

Albert Einstein

INDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. MARCO TEÓRICO	8
a. Clasificación Taxonómica del Virus del Papiloma Humano	8
b. Clasificación Epidemiológica del Virus del Papiloma Humano	9
c. Estructura del Virus del Papiloma Humano	10
d. Organización Genómica del Virus del Papiloma Humano	11
e. Proteína E1	14
f. Proteína E2	15
g. Proteína E3	16
h. Proteína E4	16
i. Proteína E5	16
j. Proteína E6 y E7	17
k. Proteína L1	19
l. Proteína L2	21
m. Ciclo Viral del Virus del Papiloma Humano	21
III. ANTECEDENTES	25
a. Proteína E2 – ADN	25
IV. METODOLOGÍA	31
a. Métodos de Cálculo de estructura electrónica	31
b. Métodos Semiempíricos	31
c. Potencial Electrostático Molecular	32
d. Paquete Computacional Visualization Molecular Dynamics (VMD)	33
e. Paquete Computacional Gaussian09	33
f. Paquete Computacional Spartan08	33
V. JUSTIFICACIÓN	34
VI. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	36
VII. HIPOTESIS	36

VIII.	OBJETIVOS	36
	a. Objetivos específicos	36
IX.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	37
X.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
	a. Secuenciación	39
	b. VPH-6a E2 unido a 16 pares de bases ADN (2AYB)	41
	c. VPH-11 E2 TAD estructura cristalina (1R6K)	45
	d. VPH-16 E2 estructura cristalina (1ZZF)	48
	e. VPH-18 E2 unido a 16 pares de bases ADN (1JJ4).	51
	f. VPH-31 E2 estructura cristalina (1DHM)	55
	g. Propiedades Electrónicas	58
	h. Orbital Moleculares	61
	i. Distancias entre los aminoácidos	65
	j. Distancias entre los E2 de 2AYB y 1JJ4 con el ADN	70
XI.	CONCLUSIONES	73
XII.	BIBLIOGRAFÍA	74
XIII.	ABREVIATURAS	86

RESUMEN

La proteína E2 del Virus del Papiloma Humano facilita la replicación del virus y activa los genes que son capaces de ocasionar cáncer en la persona infectada.

Es considerado el regulador maestro de replicación extracromosómico, ya que en primer lugar, es esencial para la iniciación de la replicación del ADN del virus del papiloma; en segundo lugar, está implicado en el mantenimiento y la segregación del genoma viral; y en tercer lugar, la formación de homo y heterodímeros así como la expresión viral de E1 helicasa se encuentran reguladas por E2.

Además de la participación directa en la replicación, la proteína E2 regula indirectamente la actividad viral de los oncogenes E6 y E7, y el entorno celular.

Con el fin de tratar de entender la interacción entre la proteína E2 y el ADN, se descargaron las proteínas de la página Protein Data Bank en formato .pdb de las moléculas 2AYB (VPH-6a), 1R6K (VPH-11), 1ZZF (VPH-16), 1JJ4 (VPH-18) y 1DHM (VPH-31) para analizar su estructura y realizar los cálculos de potenciales electrostáticos utilizando el programa computacional de modelamiento molecular Spartan08 V1.2.0 y con el programa Gaussian09 se calcularon las densidades electrónicas y los potenciales de uno de las 2 de polímeros que conforman el virus.

Se determinó que las diferencias de afinidad se correlacionan con la distribución de cargas positiva (+) en sus superficies de interacción de ADN, lo que sugiere un papel para las fuerzas electrostáticas en reconocimiento de la deformidad del ADN.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos que contribuyó al entendimiento de los procesos que están en el origen del cáncer, lo constituye la idea de que la tumorigenicidad podía ser susceptible de explicaciones simples, basadas en un número reducido de genes. Esta idea se originó, en estudios con pequeños agentes virales, como los poliomavirus, el virus del Simio 40 (SV40) y algunos retrovirus como el virus del sarcoma de Rous (RSV), los cuales podían inducir la transformación de células in vitro y llevarlas al camino de la malignidad. Esto mostró no sólo que algunos aspectos del cáncer podían ser reproducidos en células en cultivo, sino además que existen virus, con elementos genéticos extraordinariamente simples que pueden evocar muchos de los cambios asociados con la transformación maligna observada en los tumores humanos (1).

Una característica común de todos los virus oncogénicos es que el ácido nucleico vírico se inserta en el ADN de la célula hospedadora (por ello los virus oncogénicos con RNA disponen de la enzima transcriptasa inversa). El ADN vírico provoca transformaciones en las células hospedadoras, convirtiéndolas en células cancerosas.

Los primeros reportes de la existencia de agentes capaces de inducir la formación de tumores en animales se remontan a principios del siglo pasado, cuando Ellerman y Bang en 1908 y Peyton Rous en 1911, mostraron que existía un agente ultrafiltrable en la leucosis aviar y que se podían inducir sarcomas en pollos sanos, luego de la inoculación de filtrados libres de células provenientes de sarcomas de animales enfermos. El agente causal de los sarcomas de pollos mostró ser un retrovirus oncogénico, que se denominó virus de sarcoma de Rous (RSV) y se convirtió en el prototipo de los virus tumorales de RNA (2).

Las verrugas y su carácter infeccioso se conocen desde la antigua Grecia, si bien hasta el siglo XIX las verrugas genitales se consideraban como una forma de sífilis o gonorrea. La naturaleza viral de las verrugas humanas se concretó a principios del siglo XX, donde Ciuffo en 1907 determinó la etiología viral de las verrugas y desde entonces se identificó el Virus del Papiloma en múltiples especies de vertebrados además de en los humanos (3).

El género *Papillomavirus* fue descrito por primera vez en el año 1930 por Richard Shope, quien caracterizó la naturaleza transmisible de los papilomas cutáneos que afectaban a los conejos silvestres. Este Virus del Papiloma, actualmente denominado CRPV (CottonTail Rabbit

Papillomavirus), fue el primer virus oncogénico identificado. En las décadas de los 50 y 60 se avanzó en el conocimiento sobre la diferenciación celular y la replicación viral.

El desarrollo de la microscopía de inmunofluorescencia, y la mejora de la microscopía electrónica, permitió examinar la estructura de las partículas virales. El análisis de los papilomas producidos por el CRPV mostró que las partículas aparecían exclusivamente en el núcleo de los queratinocitos diferenciados, es decir, en las capas superiores de las lesiones. La naturaleza crónica de los papilomas indicaba que el virus debía estar presente también en las capas basales, por lo que la ausencia de partículas virales en éstas llevó a inferir que el virus podía estar en una forma inmadura. Además se dedujo que la replicación de los Virus del Papiloma se encontraba estrechamente ligada al proceso de diferenciación de las células epiteliales escamosas (4).

Desde los años 70 hasta el inicio de los años 90 se produjo el desarrollo de la genética viral y con ella la idea de que los Virus del Papiloma Humano (VPH) son virus de importancia médica. El desarrollo de las técnicas de clonaje molecular permitió superar parte de las limitaciones experimentales que presentaba el estudio de los Virus del Papiloma, lo que condujo a la renovación en el interés por estos virus. En esta época se clonó el genoma completo del virus del papiloma bovino tipo 1 (VPB1) (5), y a continuación se clonaron los genomas del VPH tipo 1 (6) y del VPH tipo 6, identificándose las regiones reguladoras y las funciones de los diversos genes virales.

Un avance digno de destacar, fue el reconocimiento de la existencia de diversos genotipos del Virus del Papiloma Humano: unos que inducían verrugas cutáneas, otros que se asociaban con la epidermodisplasia verruciforme (EV) y otros responsables de verrugas genitales (7).

Los estudios realizados por Orth y colaboradores fueron los que mostraron que algunas lesiones progresaban hacia carcinomas de células escamosas (8). El análisis de estos tumores reveló que la gran mayoría contenía dos genotipos de VPH (VPH-5 y VPH-8). Estos descubrimientos fueron los primeros que pusieron claramente de manifiesto que el Virus del Papiloma estaba implicado en tumores humanos. Las primeras evidencias de la relación entre los Virus del Papiloma Humano en genitales y el cáncer cervical fueron descritas por Zur Hausen en el año 1981 (9). Los primeros tipos genitales aislados fueron los tipos 6 y 11, presentes en verrugas genitales (10). A continuación se aislaron los tipos 16 y 18 los cuales se detectaban en la mayor parte de los cánceres de cuello uterino, determinando que los Virus del Papiloma Humano tienen estrecha relación con el cáncer en los humanos (11).

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un virus ADN tumoral icosaédrico (12) que constituye una de las infecciones de Transmisión Sexual más frecuentes y es considerado el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cervicouterino. El virus del Papiloma Humano infecta el epitelio escamoso que realiza un ciclo de vida estrechamente relacionado con la diferenciación de las células diana. Cuando el virus infecta las células basales se mantienen como elementos autorreplicativos con bajos niveles de expresión génica, a medida que los estratos celulares se van diferenciando, los niveles de replicación del genoma vírico aumentan y se sintetizan las proteínas víricas tardías, con lo que se inicia la formación de partículas infecciosas.

Hoy en día resulta complicado establecer la cantidad de mujeres portadoras de infecciones ocultas por el Virus del Papiloma Humano, se estima que la incidencia de ADN del virus en la población femenina es de alrededor de 300 millones y que más de 490.000 desarrollarán cáncer cervicouterino, además es el segundo tipo más común de cáncer en mujeres de entre 15 y 44 años de edad, después del cáncer de mama.

A nivel mundial (Figura 1), cada año mueren 270.000 mujeres a causa de esta enfermedad (13). El 83% de los casos de cáncer de cuello uterino tiene lugar en países en desarrollo, donde representa el 15% de los cánceres femeninos. En los países desarrollados sólo representa el 3.6% de los nuevos casos de cáncer. Las tasas de incidencia más altas se observan en África, América Latina, el Caribe y algunos países de Asia (14). Por otra parte, hasta un 80% de las mujeres habrán padecido en algún momento la infección activa por el Virus del Papiloma Humano a lo largo de su vida.

El ADN del Virus del Papiloma Humano se ha identificado en más de un 95% de todos los tumores del cuello uterino (15) los subtipos 16, 18, 31, 33, 45 y 51 se asocian más frecuentemente con neoplasias genitales (16).

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), es considerado la segunda causa de muerte y se estima que cada año se detectan 139 mil casos nuevos (Figura 2) donde un 70% es a consecuencia del Virus del Papiloma Humano (VPH) (17).

El Sistema Nacional de Salud Mexicano brinda atención médica aproximadamente a 9,000 casos de Cáncer Cervicouterino invasor y se registran 4,000 muertes anualmente (18). En el año 2001, se reportaron 4,051 muertes en mujeres, con una tasa de mortalidad de 8.8 por cada 100,000 mujeres.

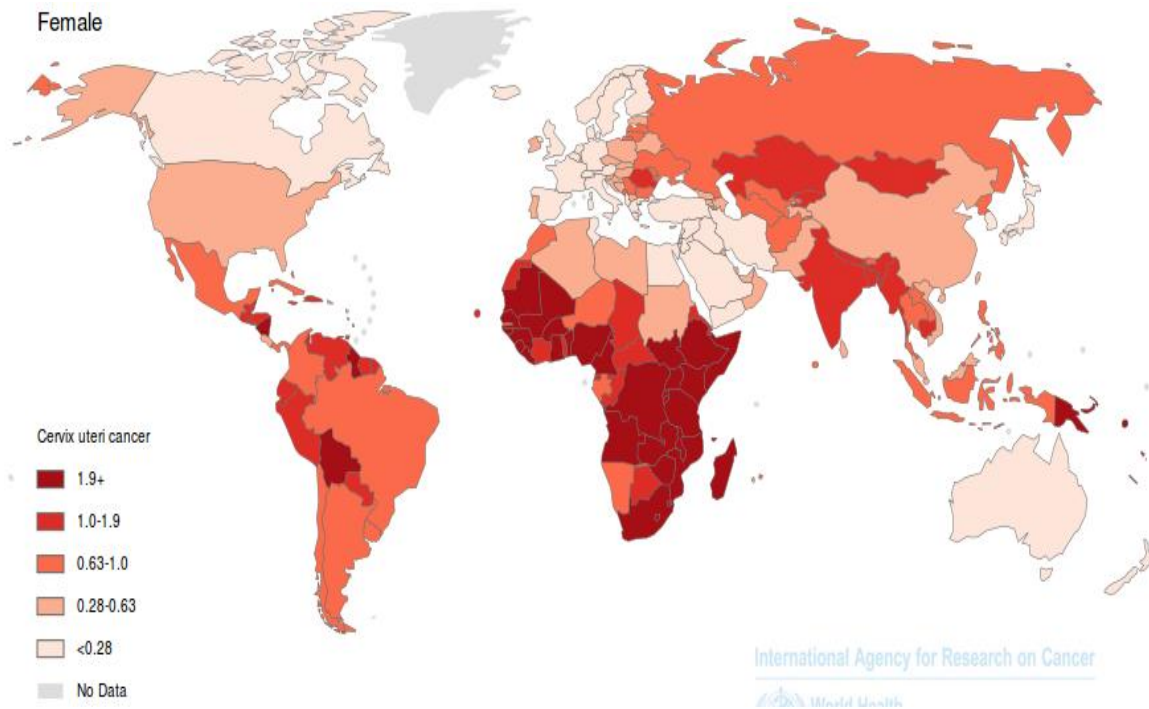


Figura 1. Riesgo Acumulativo de Cáncer Cérvicouterino a nivel mundial. México presenta un riesgo de 0.63 – 1.0, de acuerdo GLOBOCAN 2012, International Agency for Research on Cancer.



Figura 2. La Tasa Estandarizada es la Tasa por 100 mil mujeres de 25 años o más, estandarizada por el método directo con base en el promedio de población por grupo de edad de la población mundial estándar 2000 – 2025. La media nacional es de 9.1 y Puebla presenta una media de 9.4. Fuente: SS. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud (SPPS, 2013)

El cáncer cervical se desarrolla a partir de lesiones precursoras de las neoplasias intraepiteliales cervicales denominadas CIN. Las lesiones se clasifican patológicamente en una escala de I a III dependiendo de la magnitud de perturbación de la diferenciación epitelial. La media de edad para el desarrollo del cáncer es de 52 años, con una distribución bifásica de casos con picos a 35-39 y 60-64 años (19). Las lesiones CIN de bajo grado se ven típicamente en las mujeres jóvenes (20), lo que demuestra que la progresión a la malignidad puede tardar años o décadas después de la infección inicial (Figura 3). La realización de la prueba de Papanicolaou como una herramienta de diagnóstico precoz ha llevado a una disminución dramática en el número de casos de cáncer cervical en los países desarrollados (21).

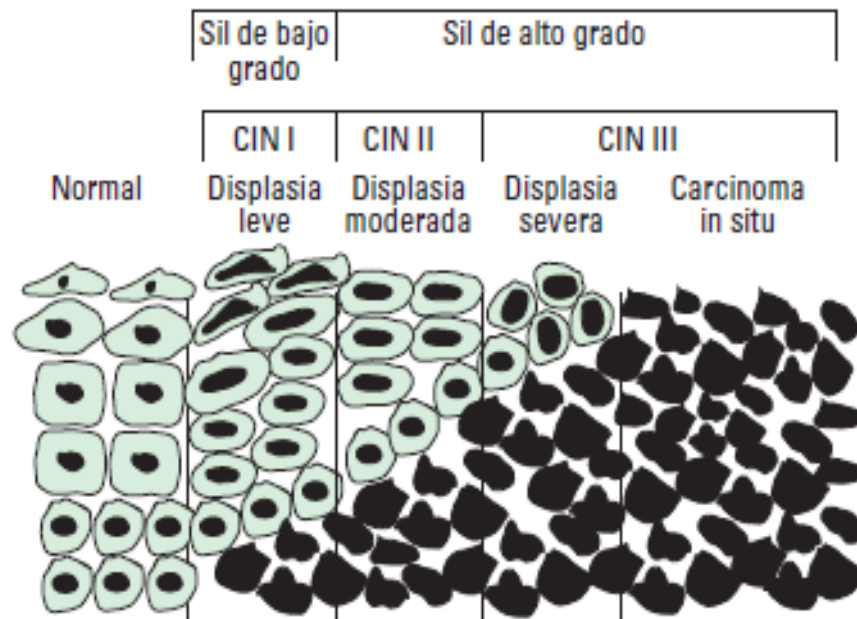


Figura 3. Representación esquemática de la carcinogénesis cervical con referencia a la nomenclatura de las lesiones cervicales.

Dado que la transmisión de la infección por VPH tiene lugar fundamentalmente mediante contacto sexual, la conducta sexual es un factor determinante en el riesgo de contraerla. El número de parejas sexuales así como la edad temprana de inicio de la actividad sexual aumentan dicho riesgo (22).

Las investigaciones longitudinales realizadas hasta hoy, muestran que la mayoría de las infecciones por el VPH son transitorias, pasando a no ser detectables en 1 o 2 años. Como ya se ha indicado, las infecciones por tipos de alto riesgo parecen persistir durante más tiempo que las

producidas por tipos de bajo riesgo, siendo la infección con el tipo 16 la más persistente (Figura 4) (23).

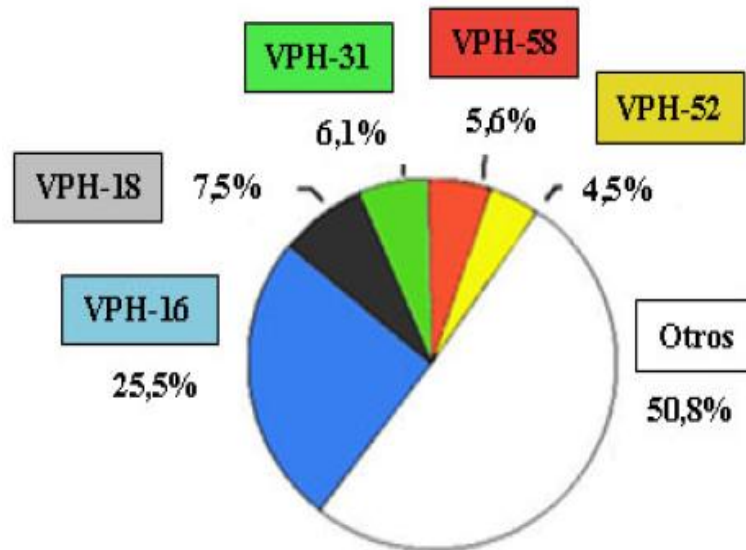


Figura 4. La Proporción relativa de los 5 tipos más frecuentes en la población infectada con VPH con citología normal. El tipo 16 se identifica en el 25,5% de las mujeres diagnosticadas, seguido del tipo 18 (7,5%) y el 31 (6,1%).

II. MARCO TEÓRICO

a. Clasificación Taxonómica del Virus del Papiloma Humano

Los Virus de Papiloma Humano son virus pequeños de ácido desoxirribonucleico (ADN), de aproximadamente 55 nm de diámetro, que infectan los epitelios de piel y mucosas. De acuerdo al Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) el estatus taxonómico de los tipos, subtipos y variantes de papilomavirus se determina por el porcentaje de variación en el gen L1 de un 10%, 2-10% y un máximo de un 2% respectivamente (24, 25).

Hasta la fecha, se han identificado más de 100 serotipos que se agrupan en varias especies, géneros y una familia. Estos virus pertenecen a la Familia *Papillomaviridae* y los principales géneros que agrupan a estos virus son: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapapillomavirus* y *Nupapillomavirus* (26).

Los Virus de Papiloma Humano con tropismo cutáneo se encuentran en los géneros β -*papillomavirus* que contiene cinco especies distintas (β 1: VPH 5, 8, 12, 14, 19, 20, 21, 24, 25, 36, 47 y 93; β 2: VPH 9, 15, 17, 22, 23, 37, 38 y 80; β 3: VPH 49,75 y 76; β 4: VPH 92; β 5: VPH 96); γ -*papillomavirus* (VPH 4, 48, 50, 60, 65, 88 y 95); μ -*papillomavirus* (VPH 1 y 63); ν -*papillomavirus* (VPH 41). La mayoría de los miembros del género α -*papillomavirus* son VPH de mucosas; sin embargo, este género también contiene VPH cutáneos en las especies α 2 (VPH 3, 10, 28, 29, 77, 78 y 94), α 4 (VPH 2, 27 y 57) y α 8 (VPH 7, 40, 43 y c91) (Figura 5).

Inicialmente los virus del papiloma se incluyeron, junto con los *Poliomavirus*, dentro de una misma familia, la familia *Papovaviridae*, debido a que ambos son virus con genomas de ADN circular de doble cadena, y con cápsidas icosaédricas sin envoltura (27). Dado que posteriormente se ha visto que los dos grupos de virus tienen genomas de distinto tamaño, organizaciones genómicas completamente diferentes y poca similitud de secuencia, han sido recientemente reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus como familias separadas, *Papillomaviridae* y *Polyomaviridae* (28).

lesiones benignas tales como cervicitis no específica, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado o verrugas genitales (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación epidemiológica de los Virus del Papiloma Humano.

Clasificación de los Virus del Papiloma Humano	
Alto Riesgo	Bajo Riesgo
16,18,26,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66,68,73,82	6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81

c. Estructura del Virus del Papiloma Humano

Los VPH son virus pequeños y desnudos con una estructura icosaédrica compuesta por 72 capsómeros pentaméricos agrupados en una organización triangular T=7. Las partículas virales presentan un diámetro de 52-55 nm. El análisis estructural mediante crio-microscopía electrónica empleando reconstrucciones tridimensionales, revela que los *Papillomavirus*, como en el caso de los *Polyomavirus*, están formados por dos tipos de capsómeros: 60 hexavalentes, que contactan con 6 capsómeros vecinos y 12 pentavalentes que contactan con 5 capsómeros vecinos (Figura 6) (33).

La cápside viral está constituida por dos proteínas estructurales. La proteína mayoritaria de la cápside (L1) tiene un peso molecular de aproximadamente 55KDa, y representa el 80% del total de la proteína viral. La proteína minoritaria de la cápside (L2) tiene un peso molecular de aproximadamente 70 KDa, y juegan un papel de soporte entre los 72 pentámeros de la proteína L1 (34).

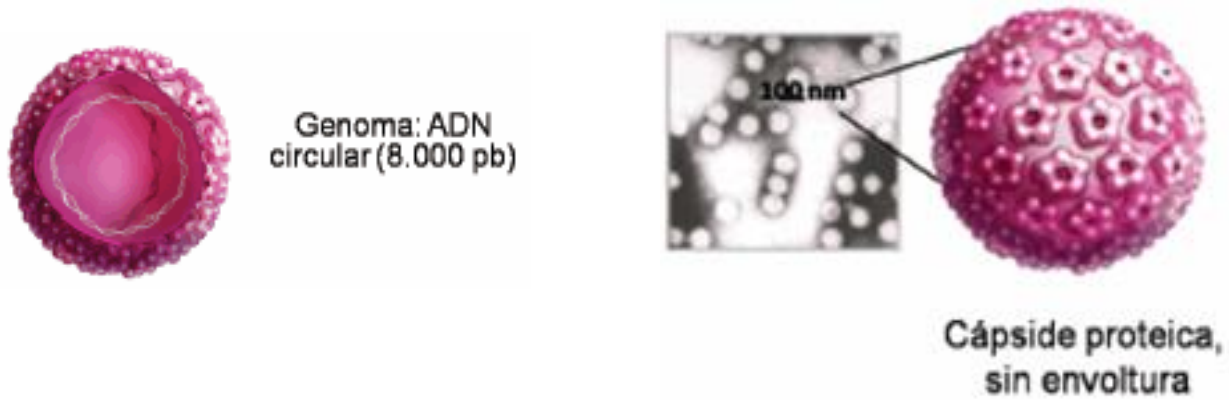


Figura 6. Microscopía electrónica de partículas similares al virus (VLPs) de VPH16 (50-55 nm).

d. Organización Genómica del Virus del Papiloma Humano

Los Virus del Papiloma Humano contienen un genoma de ADN circular de doble cadena, de aproximadamente 8000 pb de longitud (6), que está asociado con histonas celulares para formar una sustancia parecida a la cromatina (35). Una característica común a la organización genómica de todos los Virus del Papiloma Humano es que la totalidad de los marcos abiertos de lectura se localizan en una de las hebras del ADN viral, que es la que servirá como molde para la transcripción (Figura 7).

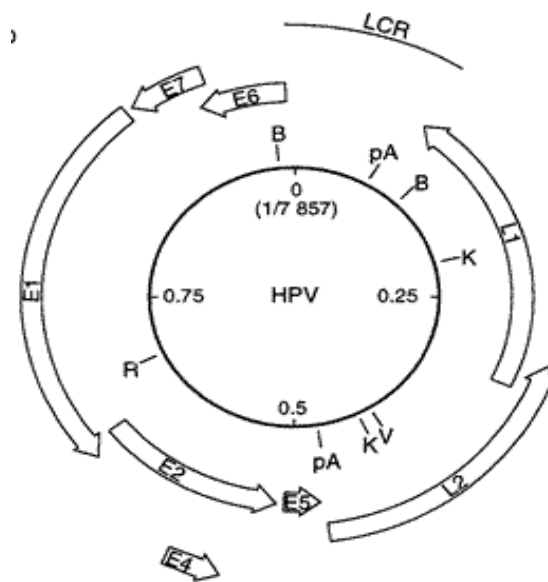


Figura 7. Mapa genómico de papilomavirus humano. Los genomas de VPH contienen 8000 pb. Las flechas gruesas muestran los marcos de lectura abierta de los genes tempranos (E 1, 2, 4, 5, 6 y 7) y los genes tardíos (L1 y L2). LCR, región larga de control; pA, sitios de poliadenilación. Se muestran también algunos sitios de restricción: B, BamHI; R, EcoRI, K, KpnI; V, EcoRV.

El genoma está organizado en tres regiones:

- 1) Región temprana: Contiene los marcos de lectura abiertos para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (Conocidas como E porque provienen del inglés Early = Temprano). Estos genes son los primeros en expresarse durante el ciclo viral, y sólo se desarrollan en el epitelio basal, parabasal e intermedio, además están relacionados con la replicación viral (E1, E2, E4 y E5) y con la estimulación de la división celular (E6 y E7), que puede conducir a la oncogénesis.
- 2) Región tardía: Codifica las proteínas estructurales L1 y L2, (Conocidos como L porque provienen del inglés Late = Tarde) que se expresan al final del ciclo viral, y sólo se desarrollan en células superficiales.
- 3) Región no codificante: También conocida como LCR (Long Control Region) o URR (Upstream Regulatory Region). Presenta de 400 a 1000 pb de longitud en función al tipo de VPH, y se encuentra implicada en la regulación de la replicación del ADN viral. Posee tres divisiones:
 - a) El segmento 5' que contiene señales de terminación de la transcripción.
 - b) La región central, flanqueada por regiones de unión para E2 que contienen potenciadores específicos del epitelio.
 - c) El extremo 3' que contiene también una región de unión a E2 y el promotor de los genes E6/E7.

Ésta región corresponde al 15% del genoma viral y contiene los promotores que inician la replicación y controlan la transcripción. Se encuentra dividida en dos dominios principales: el RE2, regulado por la presencia de la proteína viral E2 y donde se localiza el origen de replicación del ADN viral, el promotor temprano; y el dominio CE, un fuerte potenciador de la transcripción que depende exclusivamente de factores transcripcionales celulares (Figura 8) (36).

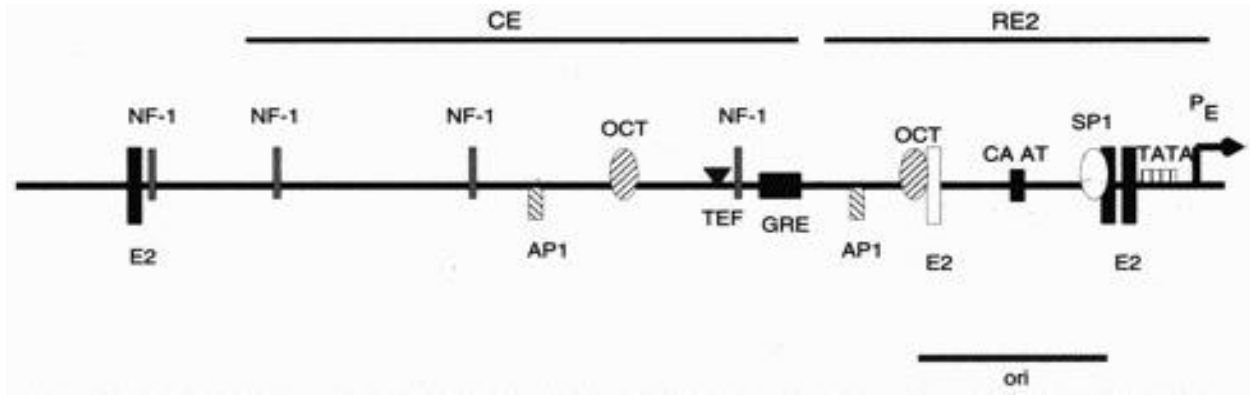


Figura 8. Mapa Genético de la Región Larga de Control (LCR) de los VPH.

En el dominio RE2 se encuentra el promotor temprano a partir del cual se transcriben los oncogenes E6 y E7.

Posee una caja TATA funcional (a la cual se unen los factores necesarios e indispensables para iniciar la transcripción mediada por la RNA polimerasa II) y lugares de interacción de la proteína viral E2, además de sitios de unión para el factor celular Sp1 (proteína estimulante de la transcripción). En este dominio se ha descrito el origen de replicación del ADN viral, dependiente de la presencia de las proteínas virales E1 y E2.

La especificidad tisular de los *Papilomavirus* reside en el CE, donde la participación conjunta de factores celulares promueve la actividad del promotor temprano exclusivamente en células de origen epitelial.

La región CE se compone de numerosos sitios de asociación específica de diversos factores de transcripción de origen celular, tales como AP-1, NF-1/CTF, Octa-1, TEF o F, etc. Además, se ha descrito la presencia de un elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG), el cual promueve la transcripción por un estímulo hormona.

e. Proteína E1

La proteína E1 es una fosfoproteína que se une de forma específica al origen de replicación, y es estabilizada a través de la interacción con E2. Presenta actividad adenosíntrifosfatasa y helicasa, y se precisa para la iniciación y la elongación de la síntesis del ADN viral (37). Se ha mostrado que interacciona con proteínas celulares, entre las que se encuentra la subunidad p180 de la ADN polimerasa, y probablemente de ese modo reclute la maquinaria de iniciación de la replicación celular en el origen de la replicación viral. Se han descrito muchos otros factores celulares capaces de interactuar con E1, sin embargo el significado fisiológico de estas interacciones no está totalmente claro (38).

La proteína E1 es codificada por el ORF más grande del Virus del Papiloma Humano y tiene una constitución de aproximadamente 70 000 pb (6). E1 se expresa en todo el ciclo de vida del VPH; sin embargo, se ha demostrado que los niveles más altos de expresión de E1 que se producen durante la fase vegetativa del ciclo de vida viral es cuando el promotor tardío se encuentra activo (39, 40), además la proteína E1 es una proteína de unión a ADN específica de sitio que posee actividad ATPasa (41, 42).

La proteína E1 funciona como una helicasa de ATP dependiente para catalizar la anulación de ADN y se ha demostrado que se unen al ADN polimerasa primasa de las subunidades alfa para reclutar la maquinaria de replicación a los orígenes virales (43, 44). E1 inicia la replicación del ADN viral mediante la unión de secuencias ricas en Adenina y Timina en el origen viral cerca del sitio de inicio de transcripción temprana; sin embargo, la unión de E1 al ADN es muy débil. La proteína E1 forma complejos con E2 en los sitios que se encuentran junto a Adenina y Timina de unión (45), este acto vinculante para cargar de manera eficiente E1 al origen viral.

Una vez unido al genoma viral, E1 forma un anillo alrededor de la hexamero de ADN e inicia su actividad helicasa (46). E1 puede reclutar la proteína de replicación de ADN vinculante de la proteína A-monocatenario (RPA), así como la proteína chaperona Hsp40 para ayudar en el procesamiento de replicación (47). Además, E1 se une a In1 / hSNF5, un componente del complejo de la cromatina reordenación de SWI / SNF, y esta interacción es necesaria para la replicación del Virus del Papiloma Humano (48). Más recientemente, se ha demostrado que E1 se asocia con los complejos ciclina / CDK, lo que resulta en la fosforilación de E1.

Esta fosforilación es necesaria para mantener a E1 (49) y por lo tanto actúa para regular la actividad de E1, las funciones de la proteína E2 tanto en la replicación, así como en la regulación de la transcripción del VPH.

f. Proteína E2

La proteína E2 presenta una función reguladora bien caracterizada, que afecta a la transcripción, la replicación y el mantenimiento de los episomas. El mecanismo de la activación es el resultado de la interacción de E2 con algunos componentes de la maquinaria de transcripción.

En esta proteína se pueden distinguir dos dominios altamente conservados entre todos los Virus del Papiloma:

(a) Un dominio de unión específico al ADN y de dimerización localizado en la región carboxi terminal y;

(b) Un dominio de transactivación localizado en la mitad amino-terminal de la proteína.

Ambos están separados por una región en bisagra, que es variable entre los diferentes VPs (50).

La proteína E2 se une a secuencias consenso (ACCN6GGT) denominadas E2BS (E2 binding sequence), en forma de dímero. En el caso de los Virus del Papiloma Humano, la unión de la proteína E2 a los E2BS actúa como moduladora de la transcripción viral. Se han descrito 4 E2BS (P97 o P105), cuya actividad basal es reprimida por la proteína E2 (51). Además presenta un papel crítico en la replicación del ADN viral, dirigiendo a la proteína E1 hacia el origen de replicación.

En presencia de esta proteína, los plásmidos virales que contienen sitios de unión para la proteína E2, se asocian con los cromosomas mitóticos, lo que ocasiona una interacción simultáneamente con la cromatina mitótica y con los genomas virales, asegurando que los episomas sean empaquetados en la envoltura nuclear cuando se reconstruye en la telofase, de ésta manera facilita la segregación del genoma viral en las células hijas (36).

Sin embargo, esta función represora se pierde cuando el ADN viral se integra al genoma celular porque ocurre una alteración estructural del marco abierto de lectura de E2. De esta manera, puede ocurrir libremente la transactivación del promotor de E6 y E7 por los factores de transcripción celulares.

g. Proteína E3

El marco abierto de lectura de E3 no codifica proteínas.

h. Proteína E4

Se trata de una proteína que, aunque se expresa a niveles basales en la fase temprana, los mayores niveles se detectan en las células diferenciadas y en los estados tardíos de la infección.

Esta proteína mediante la asociación con ciclinas dependientes de kinasas y con E2, puede modular la actividad del promotor temprano, regulando así la expresión de E7 y por tanto la entrada en fase S (52).

Por otro lado, el 30% del contenido proteico de la célula infectada parece estar constituido por un híbrido E1^{E4} (primeros 4 aminoácidos de E1 y E4) (53), que forma complejos hexaméricos que se unen a la red de citoqueratina de la célula, provocando su desestabilización, situación que ayuda a la salida de los viriones de la célula infectada (54). Además también altera el potencial de la membrana mitocondrial, y la estabilidad de los ribosomas. Por todos estos mecanismos, la célula pierde su soporte estructural, sufriendo daño mitocondrial y apoptosis, que permitirán una mayor diseminación de la progenie viral, siempre y cuando las proteínas de la cápside hayan sido sintetizadas (53).

i. Proteína E5

Es una pequeña proteína de naturaleza hidrofóbica. Presenta un efecto estimulador del crecimiento, mediante mecanismos bioquímicos no muy bien conocidos, pero que implican interacciones con el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) o con la subunidad de 16 KDa de la ATPasa vacuolar (55).

La proteína E5 de VPH de alto riesgo se le considera carcinogénica porque transforma fibroblastos murinos y queratinocitos en cultivos de tejidos, aumenta el potencial de inmortalización de E6 y E7, lo que estimula la proliferación de células primarias humanas. Se ha sugerido que EGFR, un receptor de tirosin-kinasa, controla la actividad biológica de la proteína E5

de VPH 16, y plantean que la E5 activa EGFR e induce señales mitogénicas y transformación celular a través de este receptor (56).

La proteína E5 participa en la amplificación del ADN del VPH, aumenta la expresión de las moléculas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y activa receptores de factores de crecimiento. Por estas propiedades, se considera que E5 puede favorecer la evasión inmune (57).

j. Proteínas E6 y E7

En los tipos de VPH de alto riesgo, las oncoproteínas virales E6 y E7 se expresan a partir de RNAs mensajeros policistrónicos. Se han descrito una serie de interacciones entre la proteína E6 de alto riesgo y de las proteínas de la célula hospedadora, que proporcionan algunas claves para la comprensión de las funciones como oncoproteínas virales (58).

La proteína E6 ejerce su papel transformante principalmente mediante la unión a la proteína celular p53 a través de la proteína ligasa E6-AP (E6-Associated Protein) (59). Esta interacción da lugar a la unión de moléculas de ubiquitina a p53, que entonces será reconocida y degradada por el proteosoma 26S.

La proteína p53 se activa cuando el ADN celular sufre algún daño, uniéndose a él e induciendo así la expresión del gen que codifica la proteína p21. Dicha proteína es un inhibidor de ciclinas dependientes de kinasas (CDK), que se une a los complejos de ciclina G1 con la proteína CDK2, la cual conduce a la célula más allá del punto de control G1 del ciclo celular. La proteína p21 bloquea la actividad kinasa de estos complejos, evitando así la progresión de la célula en fase S y la replicación de su ADN. Las células no podrán progresar en la fase S del ciclo celular y se retrasarán en la fase G1 o morirán por apoptosis. Por tanto, la degradación de p53 tiene como consecuencia la evasión del punto de control del ciclo celular G1/S, dando lugar a la fragmentación y reunión de los cromosomas, generando un cariotipo altamente inestable. Esto puede conducir a duplicaciones génicas y, en los siguientes ciclos de división, a amplificaciones génicas. Pero las funciones de la proteína E6 son mucho más amplias ya que puede provocar la estabilización de la tirosín-kinasa Blk (de la familia src) estimulando la actividad mitótica o bien estimular la telomerasa de la célula

hospedadora (60), cuya activación puede observarse en muchos cánceres, incluyendo los debidos a la infección con VPH.

En los VPH de bajo riesgo, la proteína E6 es capaz de unirse a p53 pero con baja afinidad. La proteína E7 presenta capacidad de unirse a la proteína pRb perteneciente a la familia de las proteínas supresoras de tumores del retinoblastoma y a otras proteínas relacionadas, provocando su fosforilación e incrementando por tanto su degradación por adición de moléculas de ubiquitina (61).

Por otra parte, la proteína codificada por el gen E7 se une específicamente al producto del gen represor de tumores Rb, otro factor regulador del ciclo celular, que se une directamente al factor transcripcional E2F, que a su vez induce la transcripción de elementos involucrados con la replicación celular. La proteína E7 de los VPH de alto riesgo tiene una alta afinidad por el sitio de unión de Rb a E2F, cuando la célula ha sido infectada por el virus, la proteína E7 se une a este sitio en vez de Rb impidiendo que éste mantenga controlado a E2F, el cual queda libre e induce la replicación celular continua. De esta manera E6 y E7 cooperan eficientemente en la transformación de las células, produciendo tumores cervicales a largo plazo (62).

La proteína pRb permanece hipofosforilada (activa) en G₀ y G₁ y se hiperfosforila durante las fases S, G₂ y M. La forma hipofosforilada se une a un conjunto de proteínas reguladoras que favorecen la proliferación celular, manteniéndolas secuestradas y fuera de acción. La fosforilación de pRb mediada por E7, da lugar a la liberación de factores de transcripción de la familia E2F (Factor de Elongación 2), activándose la transcripción de genes que regulan la proliferación celular. Todo esto se traduce en la entrada en fase S del ciclo celular, inducida por E7.

Otra función importante de la proteína E7 es la inactivación de los inhibidores de las ciclinas dependientes de kinasas p21 y p27. Esta interacción desacopla la actividad CDK de sus inhibidores y es una de las principales causas de la estimulación del crecimiento de las células infectadas con VPH.

Finalmente, la proteína E7 en los Virus del Papiloma Humano de alto riesgo, genera inestabilidad cromosómica en células humanas normales. Induce defectos en los puntos de control G₁/S, así como el desacoplamiento de la síntesis de centrosomas durante el ciclo de división celular (63). Esto lleva a la formación de mitosis multipolares anormales y segregación incorrecta de los cromosomas así como aneuploidias. Además, parece que esta proteína también es capaz de

generar aberraciones cromosómicas estructurales. De forma semejante a E6, en los VPH de bajo riesgo la proteína E7 se une a pRb pero con una afinidad 10 veces menor.

La expresión de los oncogenes virales E6 y E7 del VPH-16 da como resultado aneuploidía cromosómica, lo que favorece la integración del genoma del VPH en cromosomas celulares. La integración no siempre puede requerirse para la progresión a un fenotipo invasor distinto del ADN del VPH-18 (Figura 9) (64).

Por otra parte el proceso neoplásico asociado al VPH no se limita solamente al epitelio escamoso, sino que está involucrado también en el desarrollo de lesiones en células cilíndricas. El VPH-18 se asocia fuertemente con el adenocarcinoma del cuello uterino (65).

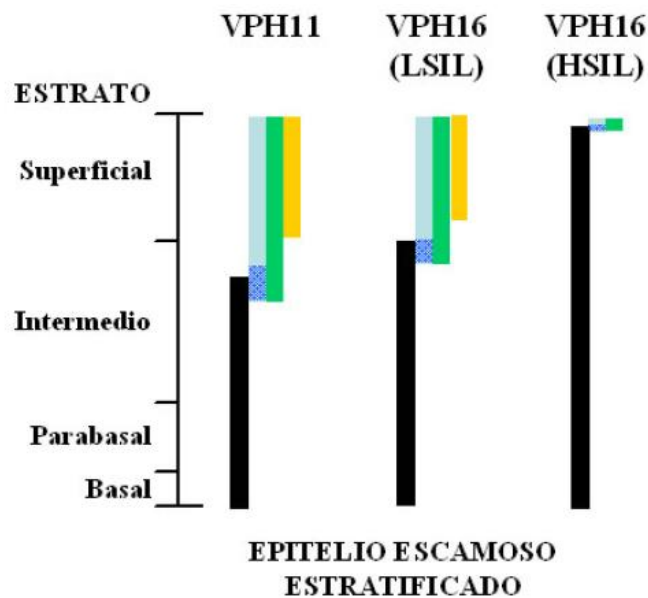


Figura 9. Esquema de la expresión diferencial de proteínas del VPH en el epitelio escamoso estratificado en función del tipo de VPH y la progresión de la infección. Las barras negras representan la expresión de E7, las barras azules la presencia de ADN viral amplificado, la parte sombreada de éstas representa dónde tiene lugar la amplificación vegetativa del genoma viral, las barras verdes representan la expresión de E4 y las naranjas la expresión de L1.

k. Proteína L1

La proteína L1 es la mayoritaria de la cápside, presenta aproximadamente 530 aminoácidos. Está altamente conservada entre las diferentes especies del Virus del Papiloma Humano, por lo que ha

sido utilizada para detectar la presencia de proteínas de la cápside en tejidos humanos. La cápside viral está constituida por 360 copias de la proteína L1 que se agrupan en 72 capsómeros pentaméricos, y contiene además 12 copias de la proteína minoritaria (L2), que se localizan en el centro de los 12 capsómeros pentavalentes (66). Además, cumple un papel esencial en la unión al ADN viral y su empaquetamiento (67, 51), especialmente los 9 aminoácidos del extremo C-terminal (53).

La proteína L1, cuando es expresada en sistemas heterólogos, presenta la capacidad de autoensamblarse en forma de partículas similares al virus (VLPs) en ausencia de la proteína L2, si bien ésta puede integrarse en las VLPs cuando se coexpresa con L1. Estas partículas son morfológica e inmunológicamente muy semejantes a los viriones nativos aunque se trata de partículas no infecciosas por carecer de ADN, por lo que han constituido la base para el desarrollo de vacunas profilácticas frente a la infección con VPH. Además, la proteína L1 también se puede ensamblar en estructuras constituidas por 12 pentámeros y que son denominadas VLPs pequeñas, que presentan una triangulación $T=1$ (68).

Durante el ensamblaje del virión, las proteínas de la cápside se sintetizan primero en el citoplasma y luego deben ser llevados en el núcleo con el fin de empaquetar la cromatina viral. Los capsómeros L1 se forman en el citoplasma (69) y luego son trasladadas a través del complejo de poro nuclear en el núcleo por el Kap de importación nuclear adaptador / receptor (70).

La proteína L1 se expresa posterior a la proteína L2 en el ciclo de replicación viral y el ensamblaje del virión. La proteína L2 interacciona con la proteína E2 para facilitar el transporte de la proteína L1 al núcleo y juega un papel importante en la encapsulación del ADN viral. La infección por VPH se asocia al desarrollo de múltiples tipos de lesiones cutáneas y mucosas. En la cavidad oral se puede asociar al desarrollo de lesiones benignas, pre-malignas y malignas. Entre las lesiones orales benignas se encuentran el papiloma oral de células escamosas (VPH-6 y VPH-11), la verruga vulgar (VPH 1, 2, 4, 7, 57), el condiloma acuminado (VPH 2, 6, 11 y menos frecuentemente VPH 16, 18, 31, 33 y 35) y la hiperplasia epitelial focal (VPH 13 y 32) (Figura 9).

I. Proteína L2

La proteína minoritaria de la cápside (L2) tiene un tamaño de aproximadamente 473 aminoácidos (69).

Es necesaria para que se produzca la infección, interaccionando con receptores en la membrana de la célula hospedadora, y también participa en la liberación y conducción del ADN viral hacia el núcleo (71).

Se cree que dentro del virión del Virus del Papiloma Humano aproximadamente se encuentran 12 copias de L2 asociados con los capsómeros través de un dominio cerca de la C-terminal de L2 (72). Al igual que otros virus, las cápsides del virus del papiloma humano pueden someterse a un proceso de maduración antes de ser liberado de la célula (73).

La proteína L2 se transloca por separado en el núcleo a través de la acción de dos señales de localización nuclear (NLS) (74). Además la proteína forma un complejo con las proteínas chaperonas Hsp40 y Hsc70, que son necesarias para la translocación nuclear. L2 también puede jugar un papel importante en el reclutamiento de los genomas virales para la encapsidación. L2 puede unirse al ADN (75) y localizar a los dominios ND10 en el núcleo. Los dominios ND10 son cuerpos nucleares que representan los principales sitios de la replicación del ADN (76).

Se ha demostrado que la presencia de L2 en las células conduce a una reorganización de dominios ND10 (77). L2 por lo tanto puede unirse al ADN viral recién replicado en estos dominios y posteriormente unirse con la proteína L1 para crear nuevos viriones.

m. Ciclo Viral del Virus del Papiloma Humano

Los Virus del Papiloma Humano son altamente específicos a la especie que infectan y presentan un tropismo muy definido por las células epiteliales escamosas infectando las células basales probablemente a través de heridas o abrasiones de la piel o las mucosas, aunque también se cree que algunos Virus del Papiloma infectan lugares donde el acceso a capas basales se facilita de forma natural, como por ejemplo en la base del folículo piloso o la zona de transformación.

La integrina α -6 fue la primera proteína candidata como receptora para los VPH (50). Esta integrina se expresa fundamentalmente durante la curación de heridas, lo cual la convierte en una

candidata lógica (75). Los VPs también se pueden unir a heparán sulfato, y glucosaminoglucanos de la superficie celular. La unión estaría mediada por los 15 últimos aminoácidos del extremo carboxi-terminal de la proteína L1. Los viriones entran en la célula por endocitosis mediante una vía dependiente de clatrina. La descapsidación de la partícula tiene lugar en el endosoma, liberándose el genoma y las proteínas de la cápside en las vesículas endocíticas (76).

El ciclo de vida del Virus del Papiloma Humano está estrechamente ligado a la diferenciación del epitelio. Después de la división de las células basales, una de las células hijas migra hacia arriba y comienza a experimentar diferenciación, mientras que el otro permanece en la capa basal. Al salir de la capa basal, las células normales se retiran del ciclo celular, inician la diferenciación, y comienzan a sintetizar queratinas de alto peso molecular (77). Como la diferenciación progresa, las queratinas se acumulan dentro de la célula y la envoltura nuclear se rompe de manera que en los estratos más altos del epitelio diferenciado, las células dejan de funcionar y sólo existen como sacos llenos de queratina.

Tras la infección y la entrada del ADN viral al núcleo de la célula, el genoma del virus se establece como elemento extracromosómico (episoma) y el número de copias se incrementa de 50 a 100 por célula.

El ADN viral se distribuirá entre las células hijas, y se postula que al mantenerse en bajo número de copias, impedirá la activación de la respuesta inmune. Durante la infección productiva, apenas existe detección de proteínas virales en las capas basales, aunque la proteína E7 puede ser detectada en la neoplasia cervical, donde los niveles de expresión no son controlados adecuadamente. Las células basales proliferativas migrarán a los estratos parabasal e intermedio, iniciando el programa de diferenciación y con él la transcripción de los distintos genes virales tempranos, regulada a través de la región LCR.

Durante este periodo el ADN replicará hasta cientos de copias por célula, gracias a las proteínas E6 y E7 que bloquearán la salida de las células del ciclo celular (proceso normal que ocurre durante la diferenciación). El mecanismo por el que el proceso de diferenciación activa el ciclo viral productivo es un área de alto interés. El modelo más aceptado considera que tiene lugar por la activación del promotor tardío, mediada por factores de transcripción dependientes de la diferenciación, que tiene como consecuencia la amplificación del ADN viral, así como la expresión

de altos niveles de proteínas necesarias para la replicación, que incluyen E1, E4 y E5, siendo E4 la más abundante (79).

Como las células del Virus del Papiloma Humano positivas se diferencian, el promotor tardío se activa conduciendo a los productos de los genes. Esto inicia la fase vegetativa del ciclo de vida del VPH que conduce a la amplificación de alto nivel del genoma viral.

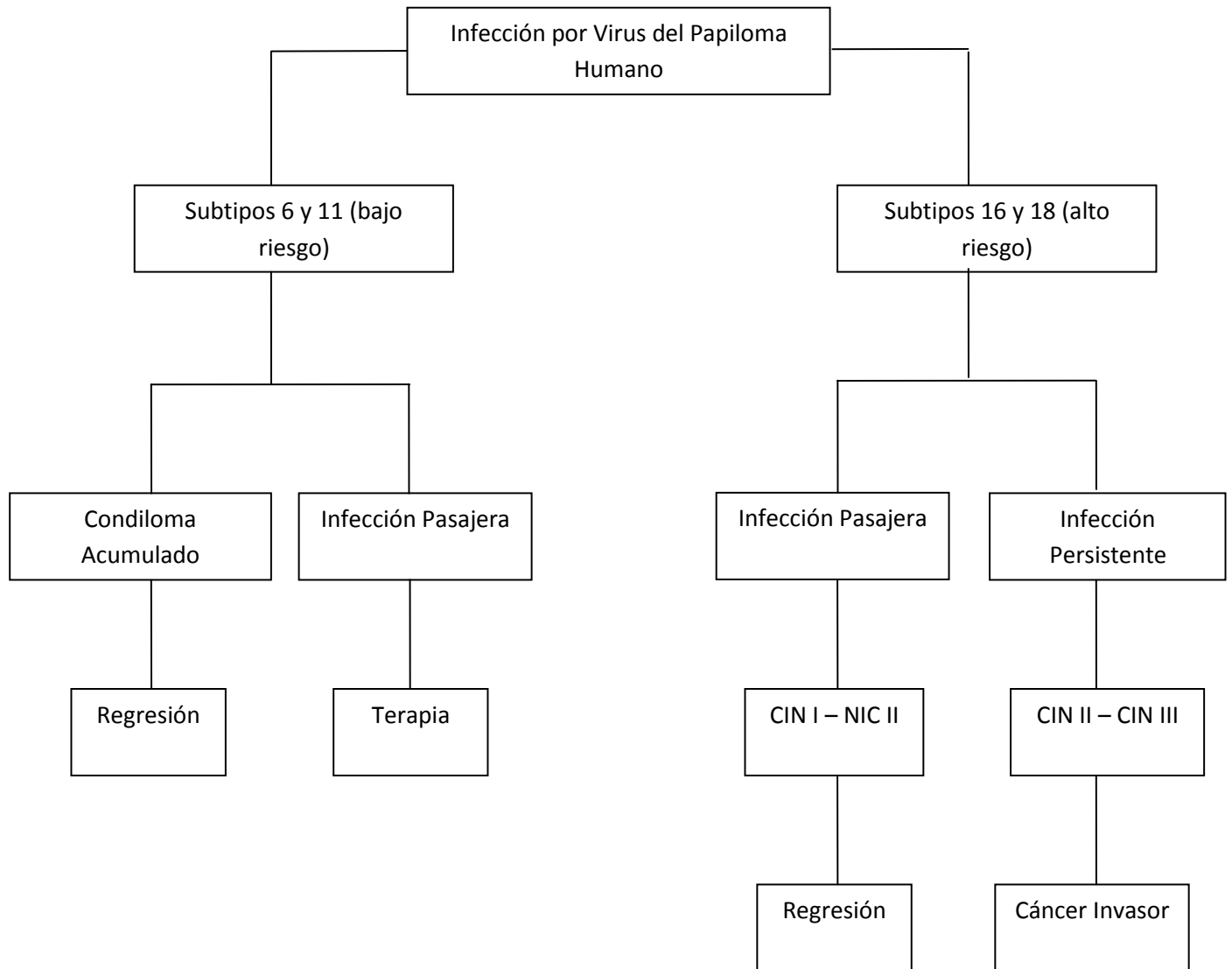
En las capas superiores del epitelio, el ADN viral se empaqueta en cápsides recién formadas y progenie de viriones son liberados de la célula. Como la replicación del VPH depende en gran medida de la maquinaria de la célula huésped, la capacidad de síntesis de ADN debe permanecer intacta a lo largo de las capas superiores de los estratos epiteliales. Por esta razón, el uso de un proceso mediado principalmente por las proteínas E6 y E7, las células infectadas por el VPH no sale del ciclo celular (80).

Las proteínas E6 y E7 han demostrado ser los principales árbitros en el desarrollo del carcinoma cervical inducido por el Virus del Papiloma Humano. Durante el ciclo de vida viral normal, E6 y E7 se encuentra regulado transcripcionalmente por la proteína E2 (81).

La infección del cérvix por VPH, puede tener distintas consecuencias. En la mayoría de los casos, tras la infección productiva tiene lugar la regresión y clarificación de la misma, o bien el mantenimiento de los genomas virales como episomas en las capas basales. Sin embargo, en los casos de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado el ciclo productivo tiene lugar sólo en cierta medida, de forma que las células replicativas aparecen en todo el tercio inferior del epitelio.

En las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado precursoras del cáncer, estas células se encuentran hasta en las capas superiores, siendo detectables incluso en la superficie del epitelio. Se trata de lesiones que presentan infecciones abortivas, en las que la expresión de los genes virales no está adecuadamente regulada, de forma que no tienen lugar los eventos tardíos del ciclo celular. Los fenómenos moleculares que hacen que una lesión productiva progrese a neoplasia y finalmente a cáncer se encuentran relacionados con cambios en la expresión de los genes virales, en particular, con un aumento de la expresión de E6 y E7. El desarrollo de cáncer cervical, requiere además una desregulación continua de estos oncogenes virales, que se verá facilitada por la integración del ADN del VPH en el cromosoma de la célula hospedadora (Diagrama 1) (82).

Diagrama 1. Progresión de la Infección del Virus del Papiloma Humano. El cáncer cervical se desarrolla a partir de lesiones precursoras de las neoplasias intraepiteliales cervicales denominadas CIN.



III. ANTECEDENTES

a. Proteína E2 -ADN

La proteína E2 es homodimérica, cada monómero comprende 360 aminoácidos con una masa de 42 kDa. Ésta se une al ADN a través de múltiples vías que incluyen un equilibrio monómero-dímero, con la forma final que es un dímero unido al ADN (83).

Hay dos histidinas conservadas (H290 y H320) en las secuencias de la proteína E2 de papilomavirus humano de alto riesgo (84). Entre los otros tres histidinas no conservadas, H308 reside en la cara exterior de la hélice de reconocimiento (R1) y H324 y H328 son en un bucle flexible que contacta con el esqueleto fosfodiéster del ADN (85). En la interfaz de dímero de proteína, los dos residuos H290 residen en el núcleo hidrofóbico de la proteína en la cadena A1, mientras que los dos residuos H320 se encuentran en la base del barril con sus cadenas laterales. Aunque por lo general la interfaz de una proteína incluye residuos que están neutralizados por las cargas opuestas de la misma u opuesta monómero (86) cargada, esta regla no parece aplicarse a virus del papiloma humano de alto riesgo (Figura 10).

Los residuos H290 presentan una orientación única que sugiere una importancia estructural y funcional. La disminución del pH de 8 a 5 provoca una disminución en la estabilidad por 3 kcal mol⁻¹, y la constante de asociación (K_a) para la formación de dímeros disminuye en 2 órdenes de magnitud (87). Esta desestabilización dependiente del pH podría ser debido a la protonación de los residuos de histidina en o cerca de la interfaz de dímero.

La proteína E2 del VPH-16 tiene excelentes propiedades para estudios biofísicos. Hay dos residuos de triptófano (W319 y W321) en la interfaz de dímero en una disposición de espiga con respecto a la otra (88) que proporcionan una excelente herramienta para estudiar los cambios en el medio ambiente espectroscópicamente por fluorescencia.

La proteína E2, es la única proteína del virus del papiloma que se une de forma independiente al ADN viral con alta afinidad y especificidad de sitio. (89).

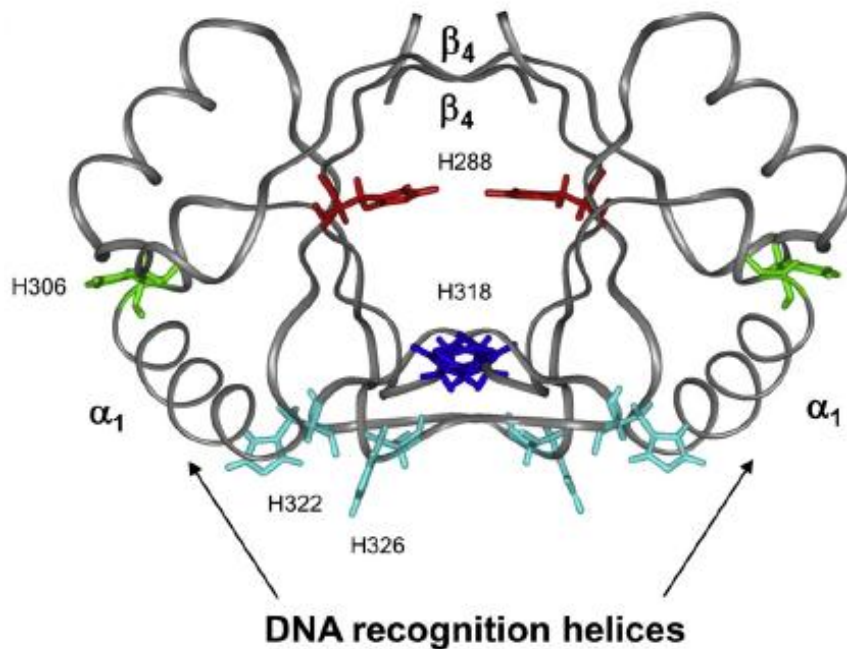


Figura 10. Lectura indirecta del ADN en la Proteína lateral: Acoplamiento entre la Protonación de la histidina, estructuralmente el enlace de ADN del dominio virus del papiloma humano tipo 16 E2C.

Hay cuatro sitios de unión a E2-en la región de control larga (LCR) del genoma del VPH. La secuencia de consenso es 5'-ACCGN4cGGT-3' (donde las letras mayúsculas representan las bases que son absolutamente necesarios, las letras minúsculas representan bases que son preferidos pero no esenciales y N4 es la región espaciadora central de variable). Las estructuras cristalinas de los complejos ADN-E2 (90) confirman que, mientras que los contactos directos se hacen entre E2 y las bases necesarias específicos de secuencia, no hay contactos directos con el separador central.

El E2 DBD del HPV-6 de bajo riesgo se une preferentemente a una secuencia de consenso que contiene un Adenina – Timina (por ejemplo AATT).

El VPH-6 E2 DBD se une a secuencias que contienen Adenina (4-6 A consecutivos o residuos T) que son intrínsecamente doblados (91). Esta flexión intrínseca se hace más pronunciada en asociación con E2, que conduce a un surco menor aún más estrecho. Por lo tanto, parece que la unión de ADN DBD-E2 es dependiente no sólo de las regiones conservadas del sitio de unión formando contactos con las hélices de unión al ADN, sino también en la conformación del espaciador central y el grado inherente de flexibilidad de la secuencia del ADN.

Un estudio reciente ha demostrado que la unión de E2 de VPH-16 y de BPV1 E2 a sitios con diferentes regiones espaciadoras es sensible a los cationes que se utilizan para estabilizar

conformaciones de ADN doblados mediante la localización dentro del surco menor estrechada (92).

Estas observaciones están respaldadas por los estudios de RMN en la que se tomó nota de la hélice de reconocimiento que está bien definido, pero propenso a un rápido intercambio de amida, y la b2-b3 desordenadas consistente en la ausencia de ligando de ADN (93). Por consiguiente, la presente consenso es que la asociación de E2 con su secuencia de ADN diana se logra a través de la deformación de la proteína y estructuras de ADN.

La proteína E2 forma complejos diméricos que se unen al ADN a través de estructuras beta barril (94). Esta proteína contiene dos dominios funcionales relativamente conservados entre los diferentes tipos de VPH: el dominio N-terminal que consiste en aproximadamente 200 aminoácidos (aa), y su función es importante en la activación de la transcripción, y el dominio C-terminal de aproximadamente 100 a.a. que interviene en la unión al ADN y su dimerización. Ambos dominios están unidos por una región denominada región de bisagra, cuya secuencia es muy variable entre los VPH. La replicación transitoria del genoma del VPH requiere solamente de E1 y E2, pero el mantenimiento estable en queratinocitos normales requiere la expresión de E6 y E7.

Esto sugiere que las proteínas E6 y E7 modifican el ambiente celular, lo que le permite al genoma vírico mantenerse como elemento extracromosomal.

La N-terminal es un dominio muy importante en la proteína E2 VPH-18, que es fundamental para inducir la oligomerización caspasa y la muerte celular (95). En el VPH-16, la proteína E2 induce apoptosis principalmente a través de la vía dependiente de p53 en el VPH o células no transformadas por VPH. Recientemente, se informó de que el VPH-16 E2 puede inducir la apoptosis mediante la unión de E2 al promotor viral de VPH en las células transformadas (96). La proteína E2 VPH-16 puede también inducir apoptosis a través de la caspasa 8 de activación, así como el VPH-18 (97). El VPH-16 y VPH-18 son comunes en la característica de la activación de la caspasa 8, lo que sugiere que el mecanismo de la muerte celular apoptótica fue probablemente conservadas entre las proteínas E2 de estos dos virus (98).

El genoma de VPH tiene un dominio denominado la región reguladora (URR) que contiene el origen de replicación, promotores, potenciadores y otras regiones que pueden afectar a la replicación viral o la transcripción (99). Una secuencia reguladora de VPH, presente en múltiples copias en el URR y en todo el genoma, es el sitio de unión a E2 (E2-BS). La proteína E2, mediante la

unión a la E2-BS, dirige la replicación viral y regula la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 (Figura 11) (100).

Los URRS de VPH de alto riesgo contienen cuatro sitios de unión a E2-(E2BSs) de diferentes afinidades que consisten en la secuencia de consenso palindrómica ACCN6GGT (101). Tres de estas secuencias E2 flanquean la secuencias de reconocimiento de E1 en el origen viral, mientras que el cuarto sitio se encuentra proximal a la L1 ORF. La proteína E2 se une a las E2BSs de una manera cooperativa resultante en cualquiera de activación o represión de la transcripción del promotor temprano. A niveles bajos E2 activa la transcripción viral, mientras que a altas concentraciones se reprime la transcripción (102).

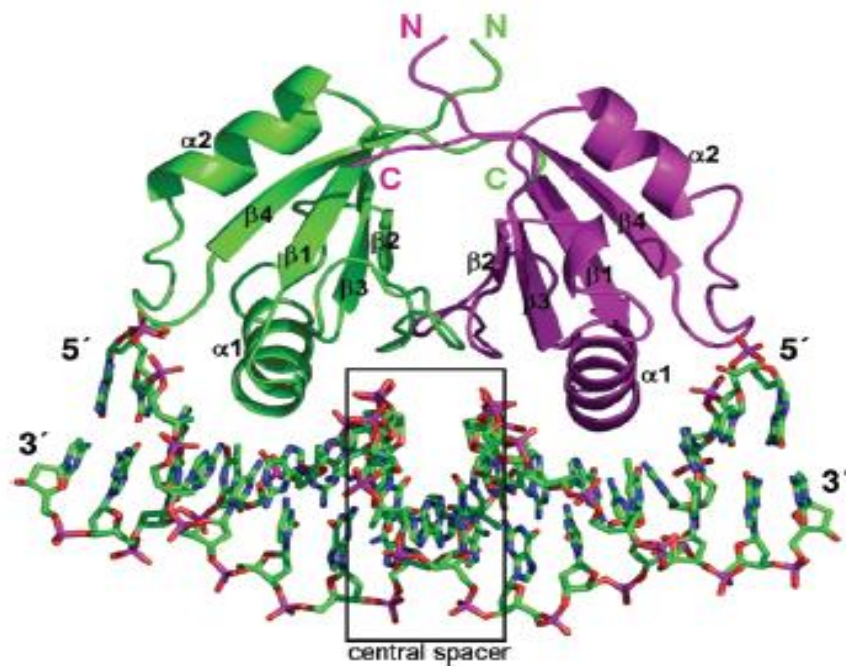


Figura 11. El E2 DBD del VPH6a unido a su objetivo de ADN (18 pb de longitud). Los elementos de estructura secundaria se etiquetan y la secuencia central de espaciador AATT se encasaja. La N - y C - terminales de las cadenas de proteínas se etiquetan N y C, respectivamente, y 3' y 5' terminales del ADN marcado en consecuencia.

La secuencia de E2-BS ADN es ACCN6GGT. La proteína E2 forma un homodímero relacionados y cada monómero reconoce específicamente el d (ACC) o secuencia de d (GGT) y puede inducir ADN de flexión (103). El d específico (ACC), así como la secuencia del espaciador 6 es importante para el reconocimiento de proteínas de este sitio (104). El E2-BS básica de las cepas del VPH se puede generalizar aún más a ACCgN4cGGT.

Cuando ACC es la secuencia de reconocimiento específica conservada, se prefieren la minúscula g y c secuencias y N4 tienden a incluir tres y cincuenta y siete d (A) (residuos 19-21).

Esto sugiere que la proteína E2 sirve como un importante regulador de S6 y presenta actividades del ciclo celular mediada por E7, así como contribuir a copiar el número de control (105).

Como tal, la pérdida de expresión de E2 se correlaciona con el aumento de la proliferación celular inducida por E6 y E7, lo que conlleva a carcinoma cervical (106). La proteína E2 también puede alterar la remodelación de la cromatina a través de la contratación de las histonas (HAT acetiltransferasas) (107) para afectar la expresión del promotor temprano. Algunos factores de transcripción, incluyendo Sp1, así como proteínas de unión a TATA solapan los sitios de unión a E2 resultando en la regulación negativa de la transcripción a través de la competencia vinculante (108). Tras la diferenciación, la transcripción de genes virales cambia del promotor temprano regulado E2 por el promotor tardío de E2 independiente que resulta en altos niveles de E1 y E2 de transcripción que conducen a la amplificación viral (109). E2 también puede afectar a la transcripción celular durante el proceso de diferenciación por la interacción con los factores de transcripción C / EBP, un grupo de activadores transcripcionales implicados en la regulación de genes celulares implicados en la diferenciación (110). Además, E2 puede atar genomas virales a los cromosomas mitóticos durante la división celular a través de la interacción con la proteína celular cromosómica Brd4 (111).

La proteína E2 también ha sido relacionada con procesos de muerte celular por apoptosis en ausencia de factores de crecimiento (112). Es interesante saber que las proteínas E2 de tipos virales de alto riesgo localizadas en núcleo y citoplasma pueden inducir apoptosis, mientras que las derivadas de genotipos de bajo riesgo ubicadas exclusivamente en el núcleo no causan muerte celular. Recientemente se demostró que la acumulación de E2 VPH-16 y VPH-18 en el citoplasma induce apoptosis por activación de la ruta caspasa 8 (113).

El rompimiento del gen viral E2 ha sido asociada con la progresión de lesiones de cuello uterino, particularmente de LIEBG a LIEAG (114), con bajas tasas y con pronósticos desfavorables en pacientes con Cáncer Cervicouterino asociado a VPH (115); no obstante la presencia de regiones E2 inalteradas junto con la expresión concomitante de oncoproteínas virales en algunos casos de lesiones avanzadas plantea que la ruptura de la secuencia viral en E2 no es siempre un paso

indispensable en el desarrollo de CCU, ya que la alteración de la función biológica de E2 puede darse por otros mecanismos alternos tales como cambios en la secuencia nucleotídica (116).

La región de largo control VPH-11 (LCR) del genoma contiene el ori y sitios de unión para factores de transcripción, replicación viral y del huésped. Al final de la región LCR, hay dos sitios de unión a E2 separadas por tres bases proximales al promotor P93 (117). P93 es especialmente importante ya que controla la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 (118).

Además de la transcripción, P93 también puede regular la replicación del VPH (119). La proximidad del sitio de unión de E1 (120) para el promotor P93 sugiere fuertemente que E1 podría afectar directamente a la transcripción P93.

Los genomas virales presentes en las células líticamente infectadas de forma latente proporcionan secuencias de ADN únicas que están ausentes de las células no infectadas (121). Las proteínas que se unen directamente al ADN viral o proviral podrían actuar selectivamente en las células infectadas para modular procesos víricos específicos, tales como la expresión de genes o la replicación. Los dominios de unión de ADN artificial que contienen Cys2-His2 han sido diseñados para dirigir los dominios de proteínas funcionales a las secuencias de ADN de interés (122). Estas proteínas con dedos de zinc (ZFPs) se han utilizado para construir factores de transcripción diseñador para activar o reprimir genes o para crear endonucleasas específicas de sitio (123). ZFPs vinculado para reprimir a los promotores de virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y el virus herpes simple tipo 1 (124), que ilustra que las proteínas se unen a sitios específicos en genomas virales. Además, ZFPs son capaces de inhibir la replicación del VPH tipo 18 (HPV18) en ensayos de replicación transitoria (125).

Debido a que la constitución del sitio de interacción de ADN y la región de dimerización no podía suponerse, un método imparcial era preferible para la identificación de los aminoácidos responsables de estas funciones.

IV.METODOLOGIA

a. Métodos de cálculo de estructura electrónica

Están basados principalmente en las leyes de la mecánica cuántica, más que en mecánica clásica. Los estados cuánticos, de energía y de otras propiedades relacionadas, se obtienen resolviendo la ecuación de Schrodinger:

$$\frac{p^2}{2m}\Psi(p) + V\left(i\hbar\frac{\partial}{\partial p}\right)\Psi(p) = E\Psi(p) \quad [1]$$

Pero sólo para muy pocos sistemas esta ecuación puede ser resuelta exactamente. Los métodos de cálculo de estructura electrónica se caracterizan por las aproximaciones matemáticas para resolver esta ecuación, éstos pueden ser métodos semiempíricos y métodos ab – initio.

b. Métodos semiempíricos

Estos métodos utilizan parámetros experimentales para simplificar el cálculo computacional. Resuelven en forma aproximada la ecuación de Schrodinger que depende de parámetros apropiados al tipo de sistema químico bajo estudio.

Los métodos semiempíricos tienen un bajo costo computacional, y proveen una descripción cualitativa razonable, pero la exactitud en la predicción cuantitativa de la energía y las estructuras moleculares depende de que tan buenos sean los conjuntos de parámetros, el tamaño del sistema y el tipo de átomos que lo conformen.

Estos métodos son los más apropiados en el estudio de grandes sistemas, a veces, para sistemas de muchos átomos llegan a ser los únicos métodos mecánicos cuánticos computacionalmente prácticos, su utilidad más óptima es para sistemas moleculares en estado base para los cuales el método semiempírico particular está muy bien parametrizado y calibrado con gran precisión, esto refiere principalmente a moléculas orgánicas.

Una gran limitación de los métodos semiempíricos es que sólo pueden ser utilizados por sistemas cuyos parámetros han sido desarrollados para todos los átomos que lo componen. Tampoco incluyen en buena forma las interacciones asociadas con los hidrógenos, por lo que son muy pobres para describir estructuras de transición.

Los métodos semiempíricos disponibles son: AM1, CNDO, INDO, MNDO, MINDO/3, PM3, y PM3MM. Estos métodos deben su nombre a los acrónimos de sus nombres, por ejemplo el método PM3 se debe a su nombre *Parametric Model 3*.

En éstos métodos se utilizan diferentes aproximaciones para acelerar los cálculos, así como un número determinado de correcciones referentes a la parametrización para aproximarse al modelo cuántico. Por ejemplo para los métodos MNDO, AM1 y PM3 la parametrización se efectúa de tal forma que las energías calculadas están expresadas como calores de formación.

La primera estrategia utilizada para reducir el esfuerzo computacional es considerar solamente electrones de valencia. También se modifica la forma de cálculo de la interacción núcleo – núcleo, debido a que los electrones internos se consideran parte del corte.

c. Potencial electrostático molecular

Como algunas de las cantidades utilizadas como índices de reactividad, el potencial electrostático es una propiedad física real, la cual puede ser determinada por métodos de difracción o por métodos computacionales. Y es a través de su potencial que una molécula es “vista” o “sentida” por otra especie química.

El potencial se obtiene a través de la ecuación (Ecuación 2) que relaciona la interacción entre las cargas positivas y la densidad electrónica de una molécula en el espacio. Lo cual refleja la distribución electrónica en la molécula.

$$V(r) = \sum_A \frac{Z_A}{R} - \int \frac{\rho(r)\delta r}{r} \quad [2]$$

d. Paquete Computacional Visualization Molecular Dynamics (VMD)

Es un paquete computacional diseñado para el modelamiento, visualización y análisis de sistemas biológicos tales como proteínas, ácidos nucleicos, ensamblajes de lípidos de doble capa, etc. (126) Puede usarse para ver moléculas de manera general, ya que puede leer archivos de la base de datos de Proteín Data Bank.

VMD provee una amplia variedad de métodos para expresar y colorear una molécula, puntos simples y líneas, esferas CPK (Corey, Pauling Koulton) y cilindros, enlaces licorice, tubos de esqueleto, listones, dibujos de cartón y otras representaciones más, se puede utilizar para animar y analizar la trayectoria de una simulación de una dinámica molecular. En lo particular, VMD puede actuar como un emulador gráfico para mostrar moléculas en computadoras.

e. Paquete Computacional Gaussian09

El paquete computacional Gaussian está diseñado para estudiar sistemas en fase gaseosa y en solución, en el estado fundamental y estados excitados; lo que permite explorar áreas de interés químico como efectos del sustituyente, mecanismos de reacción, superficies de energía potencial, energías de excitación, etc.

f. Paquete Computacional Spartan

El paquete computacional Spartan es un prestigioso entorno de modelado molecular que nos permite realizar métodos de química cuántica, incluyendo los cálculos de orbitales moleculares de Hartree-Fock y, especialmente, los cálculos de correlaciones electrónicas.

V. JUSTIFICACIÓN

El entendimiento de los procesos bioquímicos, tales como la catálisis realizada por enzimas, la expresión de los genes, las interacciones entre fármacos y sus blancos farmacológicos entre otros, se ha convertido en un intenso campo de estudio gracias al análisis de la estructura de las proteínas.

El análisis molecular requiere de programas de cómputo que nos permita la visualización a nivel atómico de las proteínas y por consiguiente, identificar las interacciones a nivel molecular entre dos o más proteínas o entre las proteínas con sus ligandos.

Como se sabe cada proteína presenta una secuencia específica de aminoácidos, esta secuencia también llamada estructura primaria contiene la información necesaria para que estas biomoléculas se plieguen o adquieran una estructura tridimensional específica para desarrollar una función. De ahí que un objetivo fundamental de la investigación de las proteínas, es entender las relaciones entre la estructura y la función, lo que a su vez permitirá predecir estructuras y funciones a partir de la secuencia de aminoácidos. A partir de:

- a) El desarrollo de las técnicas de la biología molecular que permiten obtener la secuencia de los genes.
- b) La posibilidad de obtener la secuencia primaria de proteínas de manera automatizada y;
- c) El desarrollo de las técnicas biofísicas para obtener la estructura tridimensional de proteínas.

El avance de la correlación entre la estructura y la función de las proteínas permitirá diseñar proteínas con nuevas actividades catalíticas o estructurales o diseñar nuevos fármacos más efectivos para curar o prevenir enfermedades.

México se encuentra en una situación alarmante ya que se ha registrado un incremento en la incidencia de casos de cáncer cérvico uterino en América Latina, éstos datos fueron dados a conocer en el XII Congreso Mundial de Patología Cervical y Colposcopia realizado en 2005 en Cancún, México, donde expertos en esta materia analizaron datos de Latinoamérica con respecto a estas patologías. Se estima que este mal causa 270 mil muertes por año en nuestro continente.

La prevención es la clave para disminuir la probabilidad de desarrollar un carcinoma de cuello de útero o cáncer de pene por VPH, por lo que es recomendable la asistencia periódica al Ginecólogo, al Urólogo en casos de varones, la realización periódica del examen del Papanicolau y de haber infección por VPH, se debe confirmar la presencia del mismo por técnicas diagnósticas más sensibles como la tipificación del VPH por ADN, la que dirá si en realidad hay una infección por VPH y el tipo al que pertenece el virus (alto o bajo riesgo de producir carcinoma).

Se reportó un estudio de la incidencia de VPH en las regiones rurales de Puebla, en una población de 326 mujeres en el Hospital General de Metepec. La infección se detectó en 25.4% de la población estudiada con incidencia en las edades de 18 a 24 años y de 55 a 64 años. Los genotipos presentes fueron: VPH-6 (9.6%), VPH-11 (4.8%), VPH-16 (54.2), VPH-18 (37.3%) y 9.6% VPH-31 (37.3%) (126).

Debido a que el cáncer de cérvix por infección de VPH y con el afán de contribuir a conocer la etiología de la infección, se decidió estudiar los 5 subtipos más frecuentes: el VPH-6 y el VPH-11, que son responsables de las verrugas genitales, considerados de bajo riesgo y los VPH-16, VPH-18 y VPH-31, considerados de alto riesgo y el principal factor para desarrollar Cáncer Cervicouterino.

VI. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Qué diferencias estructurales, electrónicas y energéticas existen en los 5 diferentes tipos de VPH, que ocasionan diferente grado de lesión?

¿Qué interacciones existen entre los 5 diferentes tipos de VPH con los 16 pares de bases del ADN, que ocasionan diferente grado de lesión?

VII. HIPÓTESIS

Las diferencias en las estructuras primaria y secundaria de la secuencia de los aminoácidos de los tipos de VPH que interactúa con el segmento CAACCGAATTCGGTTG del ADN, condicionan los diferentes grados de lesión.

VIII. OBJETIVOS

- 1) Comprobar las diferentes características electrónicas, estructurales y energéticas de los fragmentos de la proteína E2 del Virus del Papiloma Humano 6, 11, 16, 18 y 31 que interactúa con algunos pares de bases del ADN.

a. Objetivos Específicos

- 1) Descargar las estructuras de los 5 subtipos del Virus del Papiloma Humano en el portal WEB de Protein Data Bank.
- 2) Recortar de toda la molécula, aquella secuencia de aminoácidos que interacciona con el ADN. De la secuencia de aminoácidos recortar aquellos que interaccionan con el ADN.
- 3) Determinar a qué pares de bases se vincula el ADN con la proteína E2.
- 4) Utilizar algunos paquetes computacionales de modelamiento molecular para calcular parámetros energéticos y electrónicos de las estructuras estudiadas.
- 5) Analizar las características estructurales, electrónicas y energéticas para conocer su interacción.

IX.PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Se descargaron los archivos en formato *.pdb de las moléculas 2AYB (VPH-6), 1R6K (VPH-11), 1ZZF (VPH-16), 1JJ4 (VPH-18) y 1DHM (VPH31) de la página Protein Data Bank.
2. Se extrajeron del archivo PDB las secuencias de aminoácidos de cada proteína.
3. Se localiza la secuencia de aminoácidos que interaccionan con el ADN.
4. Con los paquetes computacionales de modelamiento molecular VMD; GaussView5.0 y el de modelamiento molecular y cálculos teóricos Spartan08 se modelan las moléculas agregando hidrógenos faltantes.
5. Se midieron las distancias de los aminoácidos del virus con respecto al ADN.
6. Se separaron los 2 polímeros de cada virus y solo se estudió uno de ellos con el ADN.
7. Se calculó la energía de uno de los 2 polímeros que conforma el virus.
8. Utilizando el programa Gaussian9, se calcularon las densidades electrónicas y potenciales electrostáticas de una de las 2 de polímeros que conforman el virus.
9. Con el programa Spartan08 se midieron las distancias, tanto de aminoácidos como con el ADN.
10. Se visualizaron las densidades electrónicas y potenciales electrostáticas en el paquete computacional VMD.

X.- RESULTADOS Y DISCUSION

Las estructuras reportadas por diversos autores, provienen de la difracción de rayos-X (2AYB, 1R6K, 1JJ4) o de estructuras de RMN (1ZZF, 1DHM). La proteína E2 de las estructuras se vincula a 16 pares de bases del ADN, con la secuencia CAACCGAATTCGGTTG.

Los datos de las proteínas E2 vinculados con el ADN de los 5 diferentes VPH descargados de la página de Protein Data Bank se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Descripción molecular de los 5 tipos de virus del papiloma humano.

	E2 – 6 (2AYB)	E2 – 11 (1R6K)	E2 – 16 (1ZZF)	E2 – 18 (1JJ4)	E2 – 31 (1DHM)
Átomos	2106	1515	2664	2035	2698
Enlaces	2218	1517	2700	1949	2726
Residuos	218	223	162	372	166
Polímeros	2	1	1	2	1
Longitud	87	207	81	83	83
Cadenas	2	1	2	2	2
Moléculas de Agua	12	36	0	190	0
Segmentos	1	1	1	1	1
Fragmentos	16 (Dominio C termina)	38 (Dominio de trasactivación) residuos 2 – 201	2 (Dominio de unión al ADN)	196 (Dominio de unión al ADN)	2 (Dominio de unión al ADN)
Proteínas	2	2	2	4	2
Ácidos Nucleicos	2	0	0	2	0

a. Secuenciación

Con el programa computacional VMD se realizó una secuenciación primaria y secundaria de las 5 estructuras, obteniendo secuencias muy similares las estructuras 2AYB, 1JJ4, 1ZZF, 1DHM, excepto 1R6K, es la menos parecida a las demás.

Se obtuvo el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las moléculas 2AYB (VPH-6a), 1R6K (VPH-11), 1ZZF (VPH-16), 1JJ4 (VPH-18) y 1DHM (VPH31) (Diagrama 2b). Los elementos de la estructura secundaria identificados en el VPH se representan en forma de flechas (β -láminas) y barras rectangulares (α -hélice). En flechas se representa las β -láminas, y la hélice 1, que es una hélice corta que forma parte del lazo, la línea más delgada representan los lazos conectores, las líneas más gruesas se representan las hélices que forman parte del dominio C – terminal que se proyecta lateralmente (Diagrama 2a).

Diagrama 2a. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las moléculas 2AYB (VPH-6a), 1R6K (VPH-11), 1ZZF (VPH-16), 1JJ4 (VPH-18) y 1DHM (VPH31).





Representación	Explicación
	Representa la estructura (β -láminas)
	Representa la estructura (α -hélice)
	Representa el dominio C - terminal
	Conectores

Diagrama 3. Secuencia de aminoácidos que interaccionan con el ADN.

Sequence Name		1							
VMD Protein Structures									
<input type="checkbox"/> 1DHMSeg	vri	16	L	K	C	L	R	Y	R
<input type="checkbox"/> 1JJ4Seg	vri	299	L	K	C	L	R	Y	R
<input type="checkbox"/> 1R6KSeg	vri	8	L	D	A	C	Q	D	Q
<input type="checkbox"/> 1ZZFSeg	vri	14	L	K	C	L	R	Y	R
<input type="checkbox"/> 2AYBSeg	vri	296	L	K	C	F	R	Y	R

De lo anterior se observa que los aminoácidos coinciden más tanto es su estructura primaria como en la secundaria, lo que al modelarlas podemos observar que son las más cercanas al ADN, y como ya se había mencionado la que presenta menos similitud es 1R6K (Diagrama 3).

b. VPH - 6a E2 Unido a 16 pares de bases del ADN (2AYB)

La molécula completa se encuentra formada por 2106 átomos, fue obtenida a partir de la difracción de rayos X de la página Protein Data Bank, estudios cinéticos de flujo confirman que tanto las proteínas de alto como de bajo riesgo adaptan sus estructuras de unión al ADN, aunque esto se consigue más fácilmente para el VPH-6a E2. Por tanto, parece que la mayor selectividad de la proteína el VPH-6a E2 puede surgir de su capacidad de adaptación molecular limitado, una propiedad que podría distinguir el comportamiento de las proteínas E2 de subtipos de VPH de alto y bajo riesgo, sus características se encuentran en la tabla 3.

Tabla 3. Datos energéticos y espaciales de la proteína E2 – 6 del Virus 2AYB.

Proteína E2 – 6a (2AYB)	
Energía del segmento	-3485.27527 Hartrees (-2185474.97 kcal/mol)
Momento Dipolar	17.81 debye
Peso	969.227 uma
Área	1008.69 Å ²
PSA (polar surface area)	229.204 Å ²
Volumen	970.55 Å ³

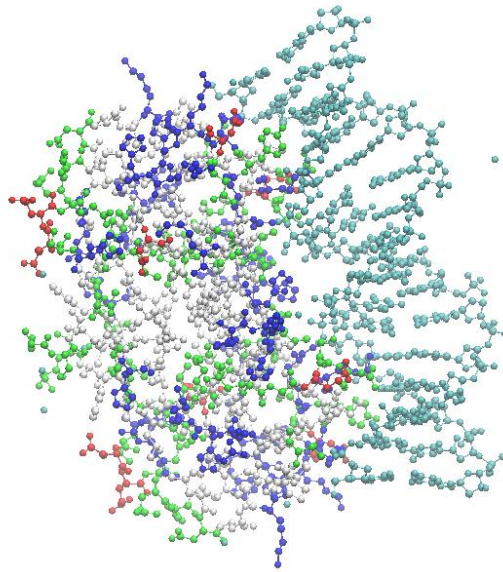


Figura 12. Proteína E2–subtipo 6a del VPH (2AYB). E2 regula la transcripción viral y la replicación del ADN. Se une al elemento de respuesta E2RE (5'-ACCNNNNNNGGT-3 ') presente en múltiples copias en la región reguladora.

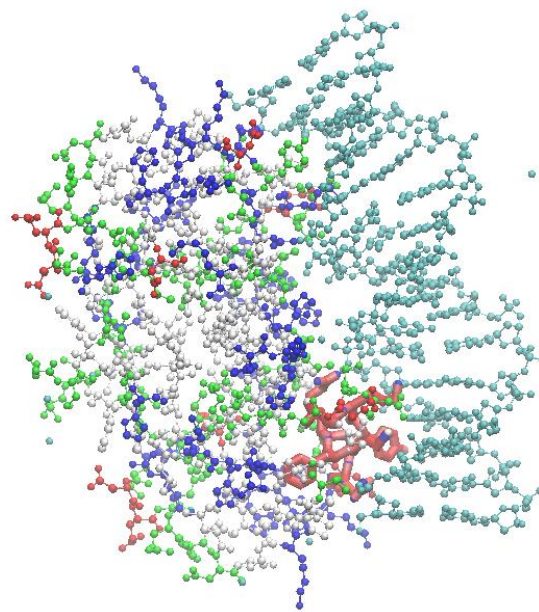


Figura 13. Proteína E2–subtipo 6a del VPH (2AYB). Aminoácidos que interaccionan con el ADN. Aminoácidos: 16 – 22, además se encuentra representado en la siguiente secuencia FASTA:

```
>2AYB:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
```

```
SSATPIVQFQGESNCLKCFRYRLNDKHRHFLDISSTWHWASPKAPHKHAIVTVTYHSEEQRQQFLNVVKIPPTIRHKLGFMSMHLL
```

```
>2AYB:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
```

```
SSATPIVQFQGESNLKCFRYRLNDKHRHFLDISSTWHWASPKAPHKHAIVTVTYHSEEQRQQFLNVVKIPPTIRHKLGFMSMHLL
```

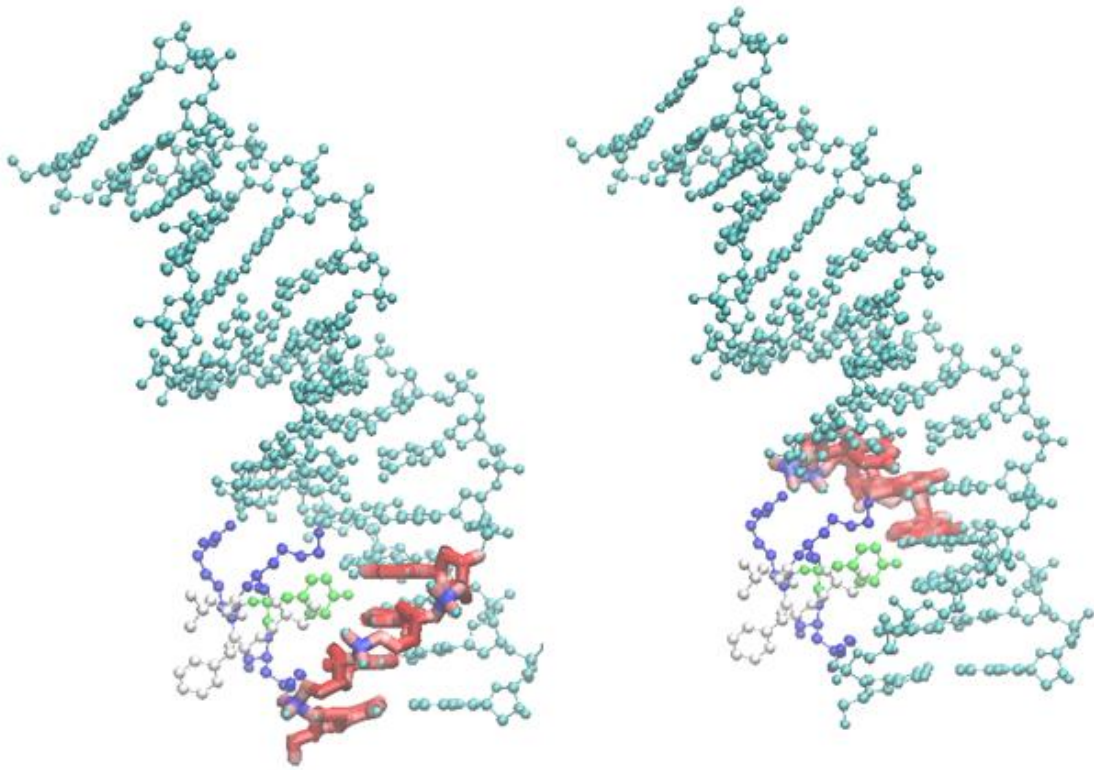


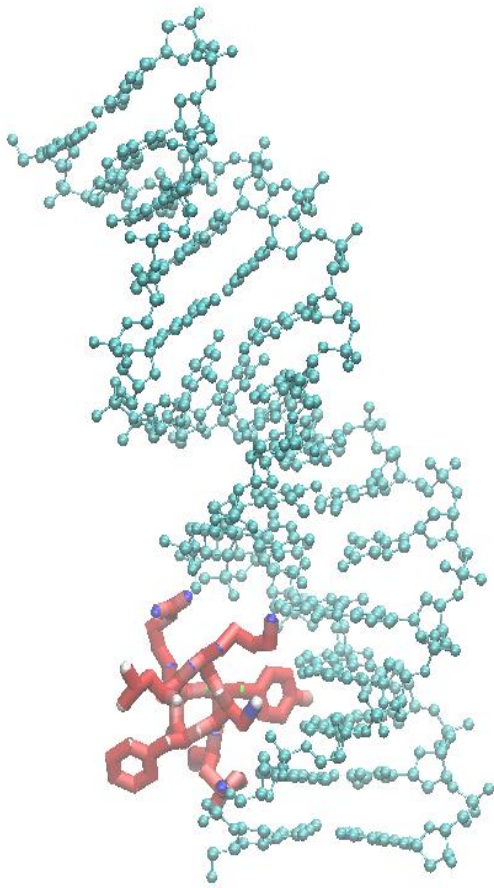
Figura 14. Proteína E2–subtipo 6a del VPH (2AYB). Virus. El color rojo representa la secuencia Fasta se seleccionaron los ácidos nucleótidos que interaccionan directamente. A continuación se muestra su secuencia FASTA:

```
>2AYB:C|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
```

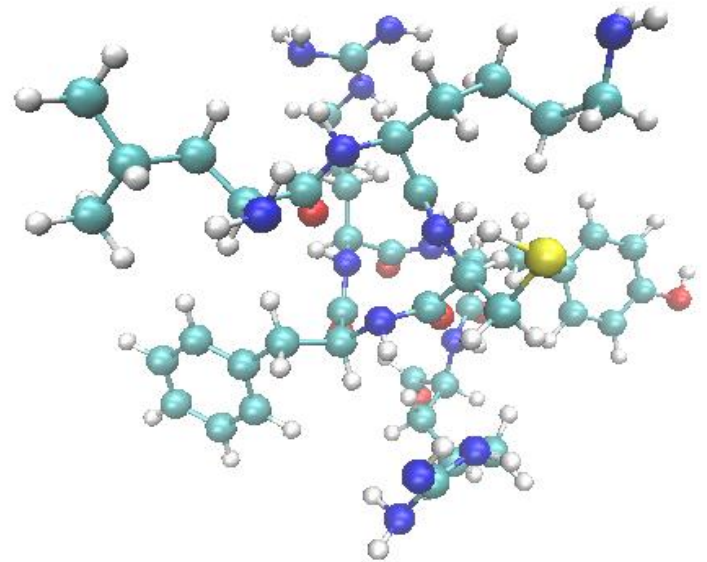
```
CAACCGAATTCGGTTG
```

```
>2AYB:D|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
```

```
CAACCGAATTCGGTTG
```



a)



b)

Figura 15. a) Se representa únicamente el fragmento de interacción con el ADN, donde los aminoácidos Arginina, Cistina, Lisina y Tirosina interacciona más cercano al ADN. b) Representa los 7 aminoácidos aislados que se estudiaron.

c. VPH-11 E2 TAD estructura cristalina (1R6K)

Es una estructura formada por 1515 átomos obtenida a partir de la difracción de rayos X. Recientemente se han descrito una serie de moléculas pequeñas que se unen al dominio de transactivación N-terminal (TAD) de E2 del VPH-11. La unión con el inhibidor no genera ninguna alteración significativa de la columna de la proteína, pero los movimientos de varias cadenas laterales de aminoácidos en el sitio de unión, en particular los de Tyr-19, Su-32, Leu-94, y Glu-100, dan lugar a la formación de un bolsillo hidrófobo del inhibidor. La tabla 4 muestra las características espaciales de la molécula.

Tabla 4. Datos energéticos y espaciales de la proteína E2 – 11 del Virus 1R6K.

Proteína E2 – 11 (1R6K)	
Energía	-2821.31580 Hartrees (-1769132.87 kcal/mol)
Momento Dipolar	23.64 debye
Peso	732.837 uma
Área	737.30 Å ²
PSA	272.881 Å ²
Volumen	698.05 Å ³

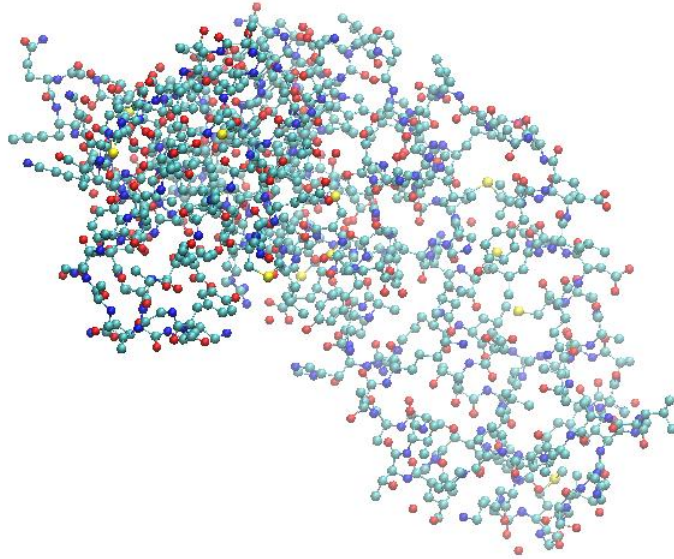


Figura 16. Proteína E2–subtipo 11 del VPH (1R6K). La molécula interactúa con la proteína E1; esta interacción aumenta en gran medida la especificidad E1 ADN vinculante. Interactúa con L2; esta interacción inhibe la actividad transcripcional de E2 pero no la función de replicación del ADN E2. Interactúa con E7; esta interacción inhibe la actividad oncogénica E7. Interactúa con TAF1; esta interacción modula la regulación transcripcional dependiente de E2.

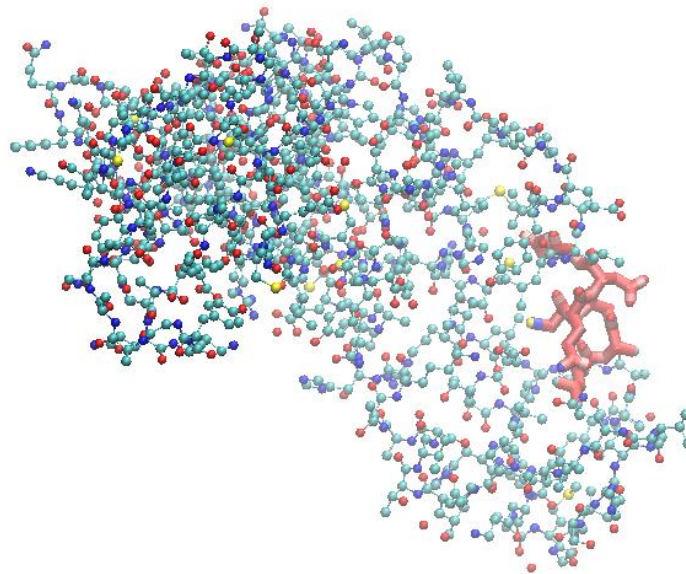


Figura 17. Proteína E2 – subtipo 11 del VPH (1R6K). Aminoácidos que interactúan directamente con el ADN. El fragmento señalado en la molécula se encuentra representado en la siguiente secuencia FASTA:

```
>1R6K:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
GHHHHHHEAIAKRLDACQDQLLELYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGLSHIGLQVVPPLTVSETKGHNAIE
MQMHLESLAKTQYGVPEWTLQDTSYEMWLTPPKRCFKKQGNTVEVKFDGCEDNVMYVWWTHIYLQDNDSWVKVTSSVDA
KGIYYTCGQFKTYVNFNKEAQKYGSTNHWEVCYGSTVICSPASVSS
```

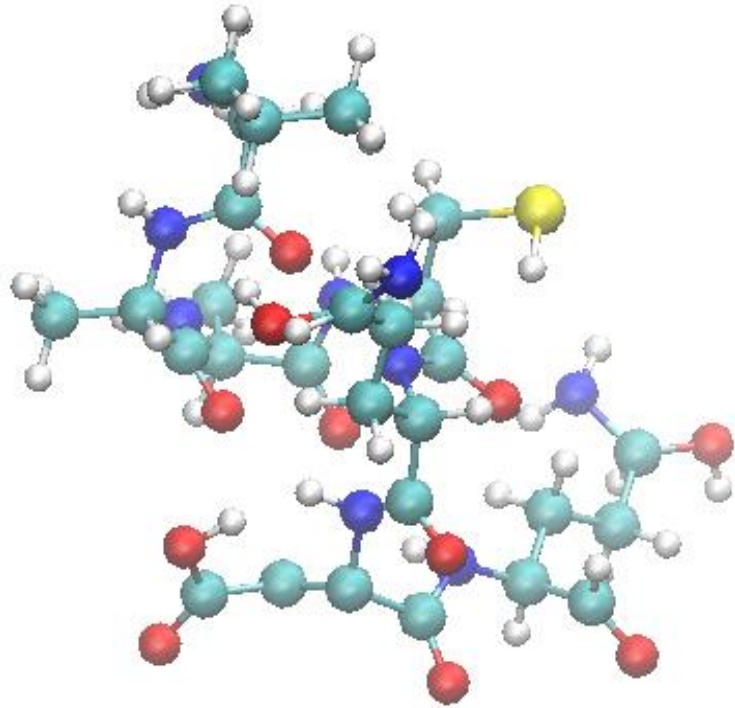


Figura 18. Proteína E2–subtipo 11 del VPH (1R6K). Representación esquemática los 7 aminoácidos que se estudiaron.

d. VPH-16 E2 Unido a 16 pares de bases del ADN (1ZZF)

Estructura que contiene 2664 átomos, fue obtenida a partir de datos de RMN de la proteína E2 del Virus de Papiloma Humano tipo 16. Se encuentra en el 25.5% de los casos reportados en muestras positivas a Cáncer Cervicouterino. Esta proteína juega un papel accesorio en la iniciación de la replicación del ADN.

Un dímero de E2 interactúa con un dímero de E1 con el fin de mejorar la especificidad de la actividad de unión al ADN E1. Sus características físicas de la molécula se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Datos energéticos y espaciales de la proteína E2 – 16 del Virus 1ZZF.

Proteína E2 – 16 (1ZZF)	
Energía	-3372.89882 Hartrees (-2115008.25kcal/mol)
Momento Dipolar	32.16 debye
Peso	934.202 uma
Área	996.92 Å ²
PSA	310.351 Å ²
Volumen	937.58 Å ³

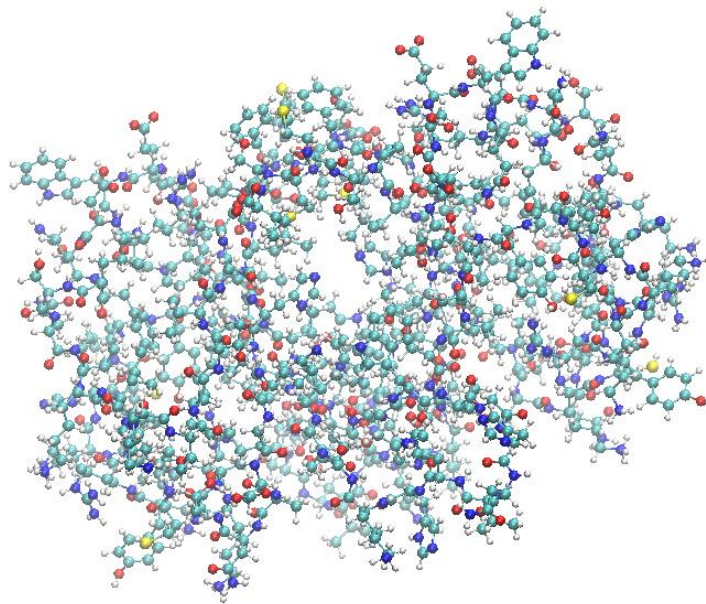


Figura 19. Proteína E2–subtipo 16 del VPH (1ZZF). Una vez que el complejo reconoce y se une el ADN en sitios específicos, el dímero E2 se elimina del ADN.

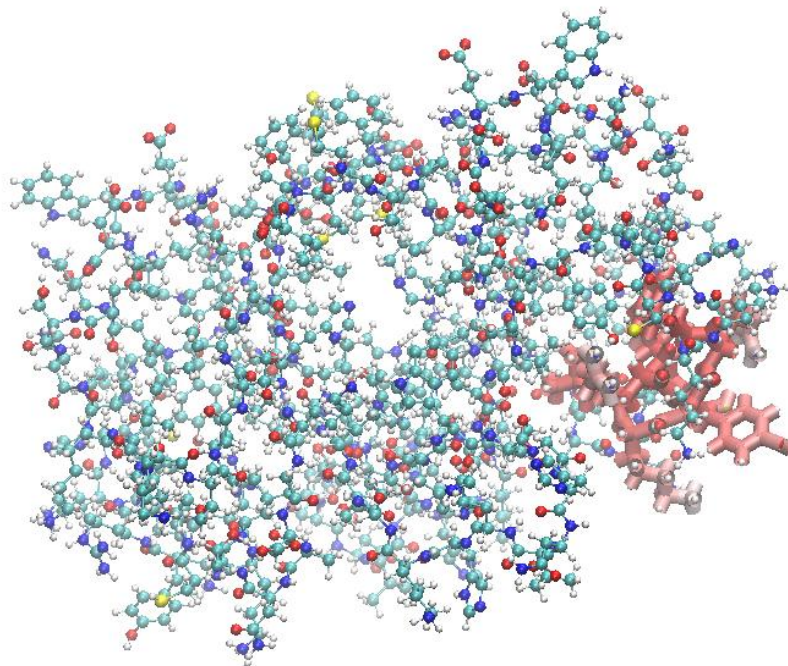


Figura 20. Proteína E2–subtipo 11 del VPH (1ZZF). Los aminoácidos marcados o señalados con rojo están representados en la siguiente secuencia FASTA:

```
>1ZZF:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
MTPIVHLKGDANTLKCLRYRFKKHCTLYTAVSSTWHWTGHNVKHKSAIVTLTYDSEWQRDQFLSQVKIPKTITVSTGFMSI
>1ZZF:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
MTPIVHLKGDANTLKCLRYRFKKHCTLYTAVSSTWHWTGHNVKHKSAIVTLTYDSEWQRDQFLSQVKIPKTITVSTGFMSI
```

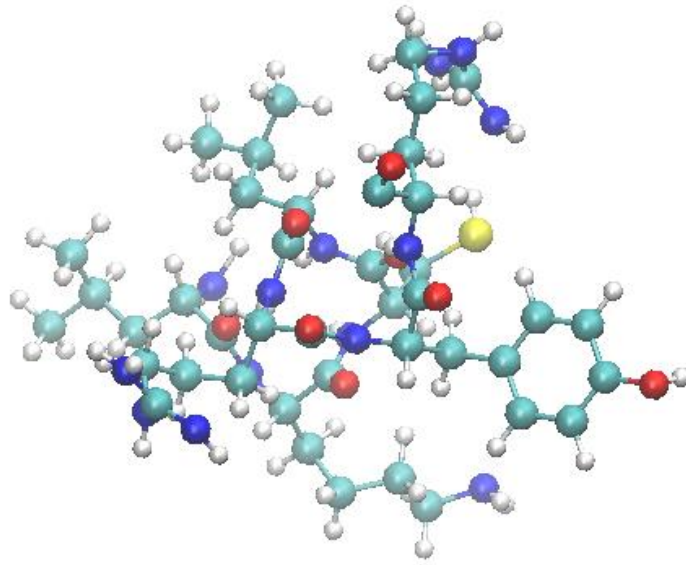


Figura 21. Proteína E2–subtipo 11 del VPH (1ZZF). Representación esquemática los 7 aminoácidos que se estudiaron.

e. Estructura de la unión de VPH-18 E2-ADN (1JJ4)

La estructura contiene 2035 átomos, fue obtenida a partir de la difracción de rayos X. Las proteínas E2 del virus del papiloma regulan la transcripción de todos los genes del virus del papiloma y son necesarios para la replicación del ADN viral. La interrupción del gen E2 se asocia comúnmente con la malignidad en el carcinoma de cuello uterino, lo que indica que E2 tiene un papel en la regulación de la progresión del tumor. Aunque las proteínas E2 de todos los papilomavirus caracterizadas se unen específicamente a la misma secuencia de ADN por 12 pares de bases, las proteínas E2 asociadas al cáncer por VPH muestran una capacidad única para detectar la flexibilidad de ADN y la curvatura intrínseca. En la tabla 6 se presentan sus características energéticas.

Tabla 6. Datos energéticos y espaciales de la proteína E2 –VPH 18 del Virus 1JJ4.

Proteína E2 – 18 (1JJ4)	
Energía	-3372.26391 Hartrees (-2114610.12 kcal/mol)
Momento Dipolar	17.54 debye
Peso	933.194 uma
Área	1000.48 Å ²
PSA	312.395 Å ²
Volumen	940.15 Å ³

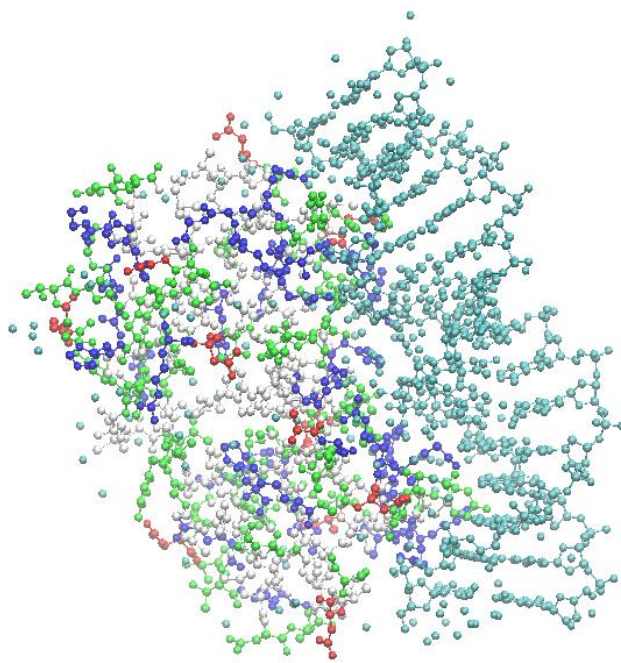


Figura 22. Proteína E2–subtipo 18 del VPH (1JJ4). Completa. Función E2 regula la transcripción viral y la replicación del ADN. Se une al elemento de respuesta E2RE (5'-ACCNNNNNNGGT-3 ') presente en múltiples copias en la región reguladora.

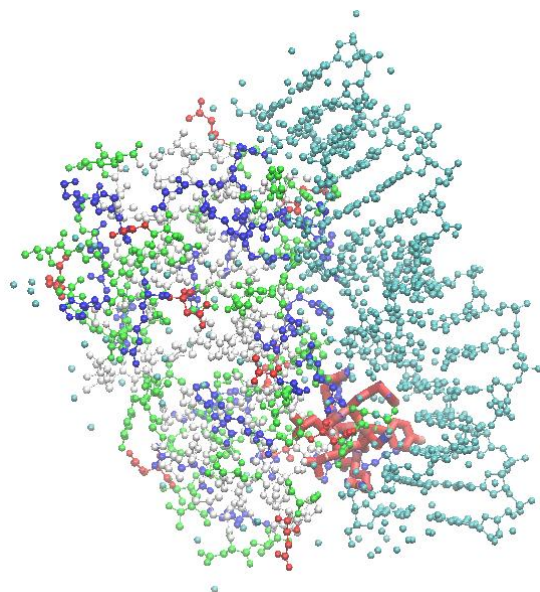


Figura 23. Proteína E2–subtipo 18 del VPH (1JJ4). Los aminoácidos que presentan una interacción directamente con el ADN se encuentran enlistados en la siguiente secuencia FASTA:

```
>1JJ4:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
GSHMTPIIHLKGDNRNSLKCLRYRLRKHSDHYRDISSTWHWTGAGNEKTGILTVTYHSETQRTKFLNTVAIPDSVQILVGYMTM
>1JJ4:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
GSHMTPIIHLKGDNRNSLKCLRYRLRKHSDHYRDISSTWHWTGAGNEKTGILTVTYHSETQRTKFLNTVAIPDSVQILVGYMTM
```

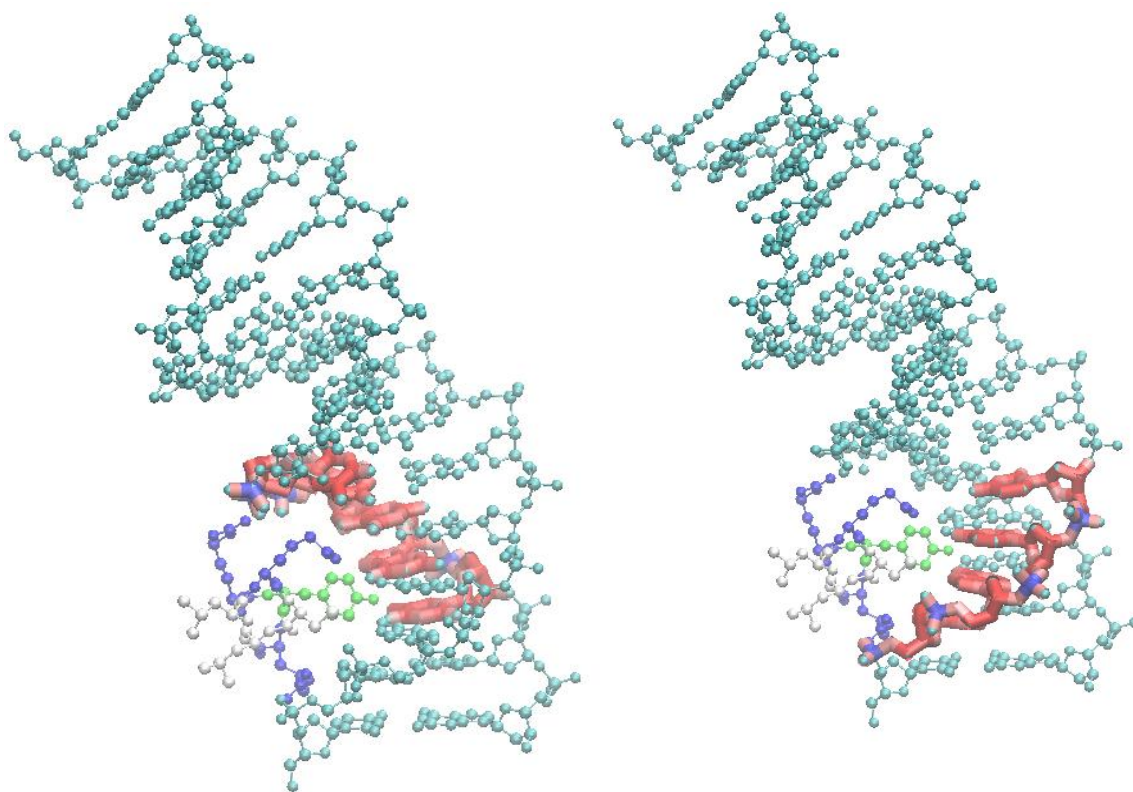


Figura 24. Proteína E2 – subtipo 18 del VPH (1JJ4). De la secuencia Fasta se seleccionaron los ácidos nucleótidos que interaccionan directamente, se muestra su secuencia FASTA:

```
>1JJ4:C|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
```

```
CAACCGAATTCGGTTG
```

```
>1JJ4:D|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
```

```
CAACCGAATTCGGTTG
```

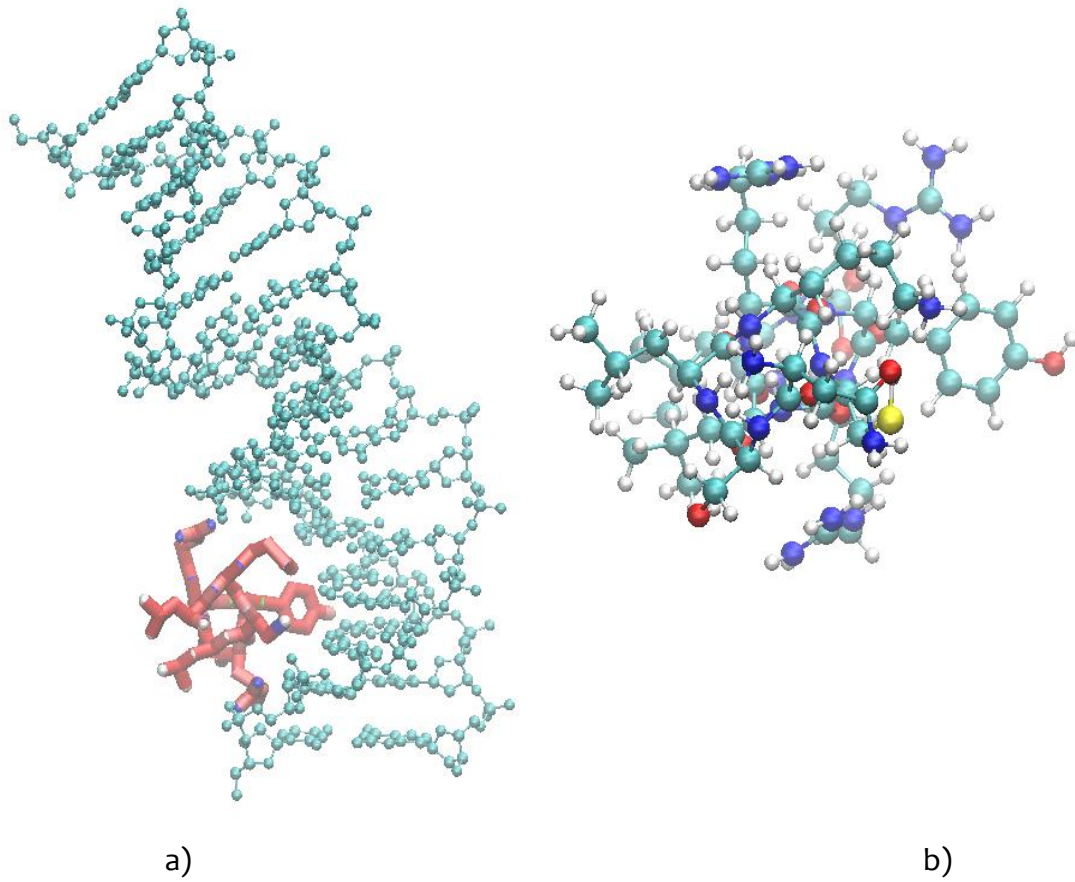


Figura 25. a) Se representa únicamente el fragmento de interacción con el ADN, donde los aminoácidos Arginina, Cistina y Tirosina interacciona más cerca al ADN. b) Representa los 7 aminoácidos que se estudiaron.

f. VPH-31 E2 estructura cristalina (1DHM)

La molécula contiene 2698 átomos, su estructura tridimensional del dominio de unión a ADN de la proteína E2 del virus del papiloma humano - 31 se determinó mediante el uso de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de múltiples heteronuclear dimensional (NMR).

Se obtuvieron un total de 83 subunidades para cada uno de los residuos del dímero simétrico. La raíz promedio significa desviaciones cuadradas de 20 estructuras calculadas utilizando un protocolo de un simulador de geometría con distancia de 0,59 y 0,90 angstroms de la columna vertebral y todos los átomos pesados, respectivamente, para los residuos 2-83. La estructura de la proteína del virus humano libre en solución consiste en un barril beta de ocho hebras y dos pares de hélices alfa. Aunque el pliegue general de la proteína es similar a la estructura cristalina de la proteína del virus del papiloma bovino-1 E2 cuando se compleja con el ADN, se observan diferencias entre estas dos estructuras en la interfase de la subunidad. Sus propiedades energéticas se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Datos energéticos y espaciales de la proteína E2 –VPH11 del Virus 1DHM.

Proteína E2 – 31 (1DHM)	
Energía	-3372.84709 Hartrees (-2116493.59kcal/mol)
Momento Dipolar	24.19 debye
Peso	934.202 mu
Área	1005.28 Å ²
PSA	309.691 Å ²
Volumen	936.28 Å ³

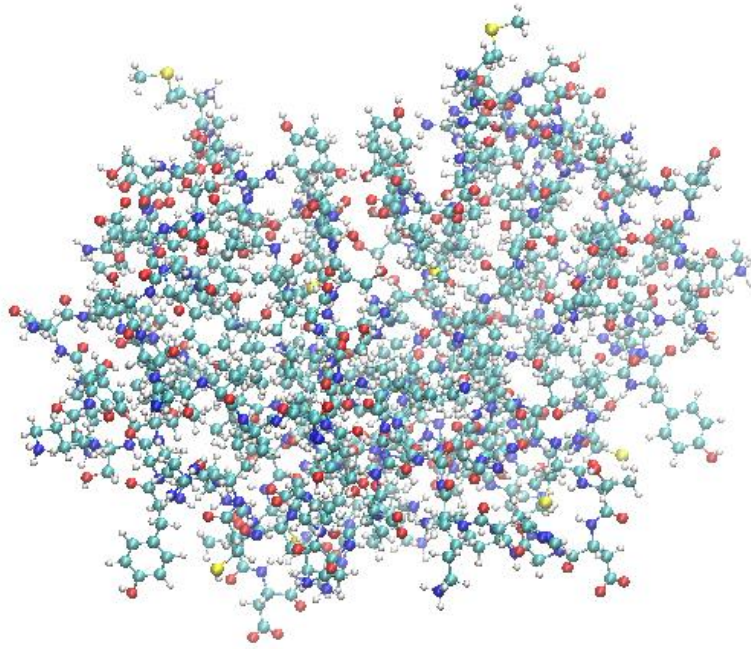


Figura 26. Proteína E2-subtipo 31 del VPH (1DHM).

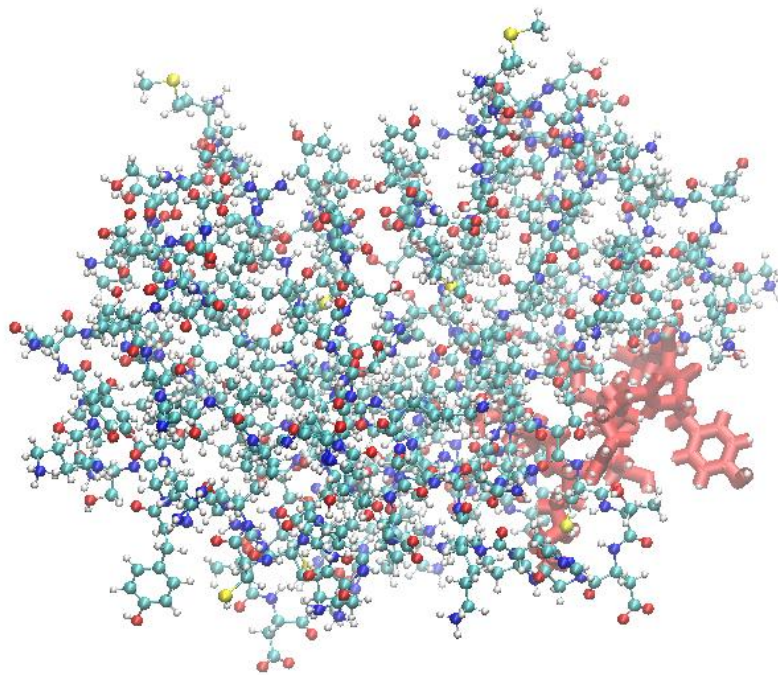


Figura 27. Proteína E2-subtipo 31 del VPH. (1DHM). Los aminoácidos que presentan una interacción directamente con el ADN se encuentran enlistados en la siguiente secuencia FASTA:

>1DHM:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

MATTPIIHLKGDANILKCLRYRLSKYKQLYEQVSSTWHWTCTDGKHKNAIVTLTYISTSQRDDLNTVKIPNTVSVSTGYMTI

>1DHM:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

MATTPIIHLKGDANIL**LKCLRYR**LSKYKQLYEQVSSTWHWTCTDGKHKNAIVTLTYISTSQRDDLNTVKIPNTVSVSTGYMTI

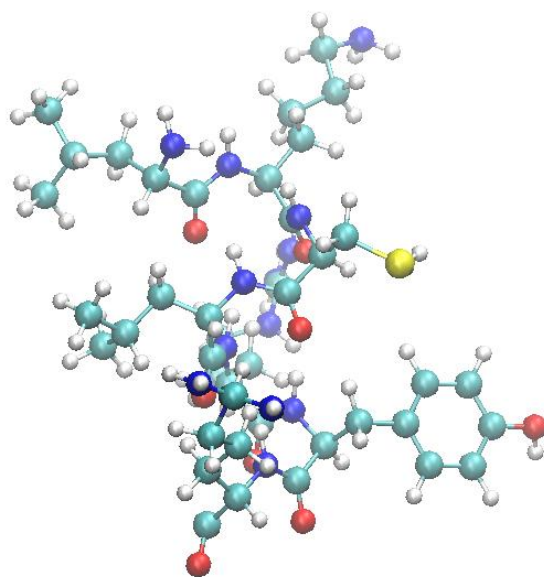


Figura 28. Proteína E2-subtipo 31 del VPH (1DHM). Segmento LKCLRYR.

Tabla. Características físicas de las 5 moléculas estudiadas.

Molécula	Área (Å ²)	Volumen (Å ³)	Momento Dipolar (debye)
1R6K	737.30	698.05	23.64
2AYB	1008.69	970.55	17.81
1DHM	1005.28	936.28	18.66
1JJ4	1000.48	940.15	17.54
1ZZF	996.92	937.58	32.16

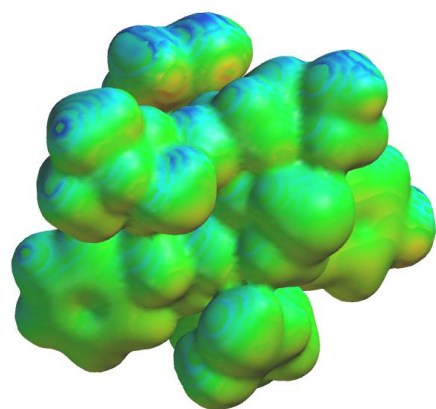
Las moléculas se encuentran organizadas por orden de virulencia (de menor a mayor), con éstas tres características se puede observar una tendencia que nos indica que entre más oncogénico resulta el tipo de VPH el Momento Dipolar que nos indica que sus electronegatividades son distintas, el de mayor electronegatividad atraerá a los electrones hacia sí, dando lugar a dos cargas opuestas en el enlace.

g. Propiedades Electrónicas

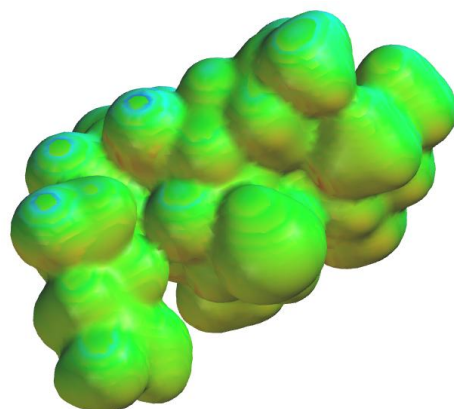
En las figuras 29 y 30 se observa la propiedad del potencial electrostático proyectado sobre una isosuperficie de densidad electrónica, es importante la proyección en una isosuperficie porque se tiene el valor de la propiedad electrónica en una misma distancia de los núcleos de los átomos. Esta propiedad fue calculada con el método semiempírico PM3.

Aunque la molécula presenta diversas cargas se observan regiones en donde se distribuye de manera desigual y por lo tanto se presentan regiones con diferente densidad electrónica. Se pueden apreciar por los colores las regiones que presentan mayor densidad electrónica o menor densidad electrónica. El color rojo indica mayor densidad electrónica, mientras que el color azul indica menor densidad electrónica y el color verde representa las regiones de distribución homogénea de la densidad electrónica.

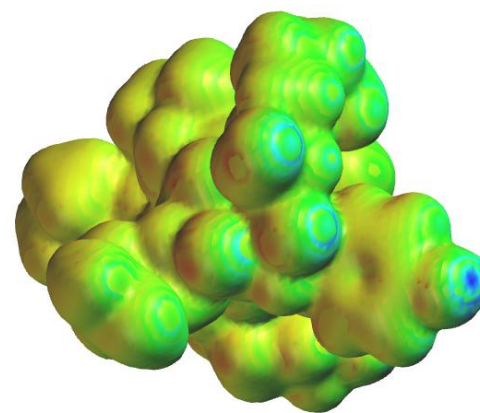
En cuanto a su densidad, las moléculas 2AYB (VPH-6a), 1R6K (VPH-11) que representan los virus de bajo riesgo, se puede observar que la Arginina y la Lisina tienen menor densidad electrónica, mientras que las moléculas 1ZZF (VPH-16), 1JJ4 (VPH-18) y 1DHM (VPH31) que representan los virus de alto riesgo, presentan mayor densidad electrónica en los anillos aromáticos, y ligeramente en el anillo de molécula 2AYB que tiene adherido al ADN.



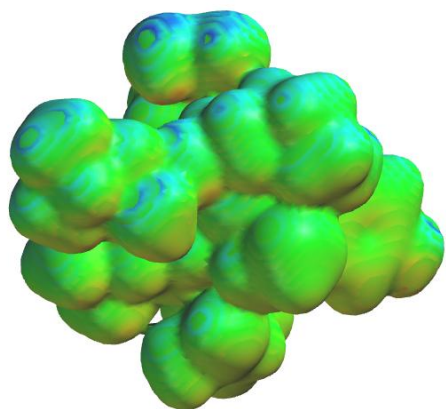
a) 2AYB



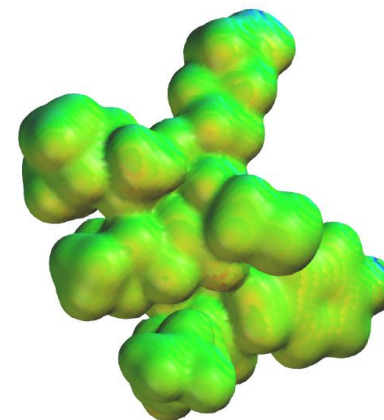
b) IR6K



c) IZZF

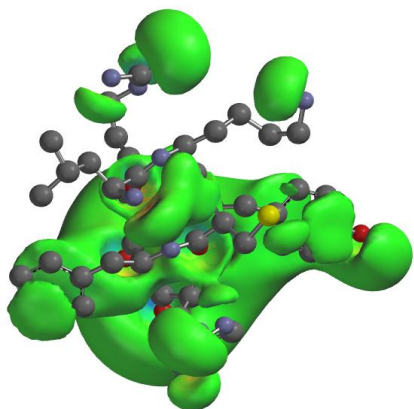


d) 1JJ4

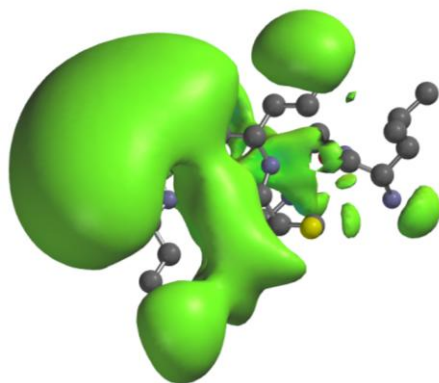


e) 1DHM

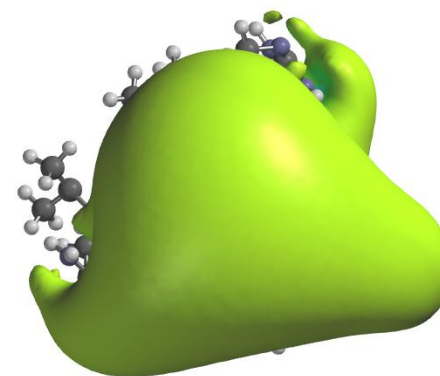
Figura 29. Densidades electrónicas de los segmentos que interactúan con el ADN de los tipos de VPH estudiados.



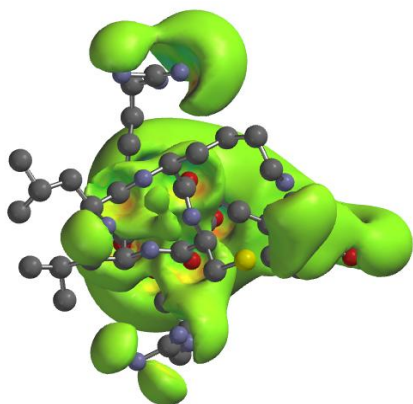
a) 2AYB



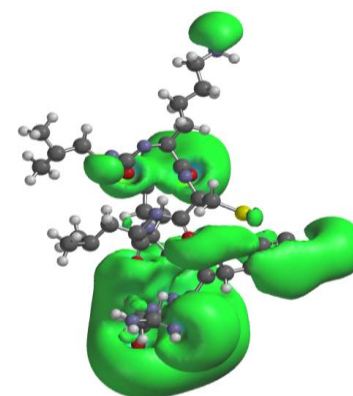
b) IR6K



c) IZZF



d) 1JJ4



e) 1DHM

Figura 30. Potenciales Electrostáticos de los segmentos que interactúan con el ADN de los tipos de VPH estudiados.

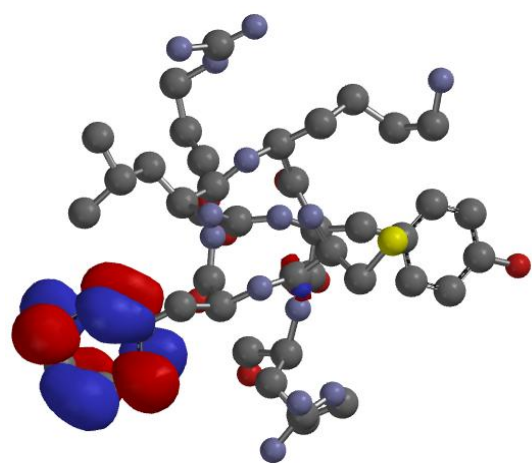
h. Orbitales Moleculares

En la figura 31 se observan las regiones de los orbitales más bajos desocupados, conocidos como LUMO por sus siglas en inglés. Estos orbitales están desocupados y representan las regiones en donde un electrón se podría alojar, en dado caso que hubiera una reducción o transferencia desde otra especie química.

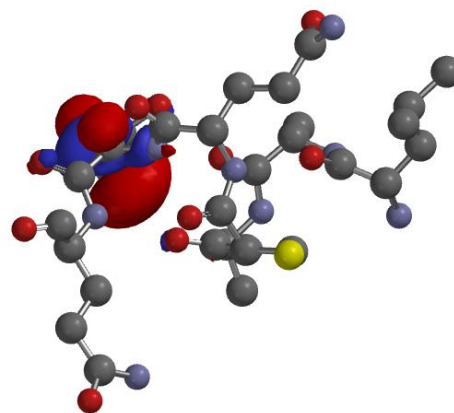
En estas regiones se observa que las moléculas 2AYB y 1JJ4 presentan un LUMO en la región de la tirosina (Tyr), que es la parte que más se acerca al ADN humano, que coincide con los anillos aromáticos donde hay mayor concentración electrónica.

En la figura 32 se observan las regiones de los orbitales más altos ocupados, conocidos como HOMO por sus siglas en inglés. Estos orbitales están ocupados y representan las regiones donde un electrón que podría transferirse hacia otra especie química. Resultando en una pérdida electrónica u oxidación.

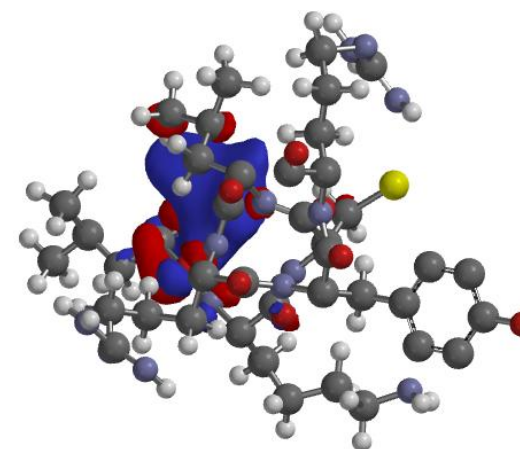
En estas estructuras no se observa alguna tendencia entre las moléculas, como se observa en la Tabla 8.



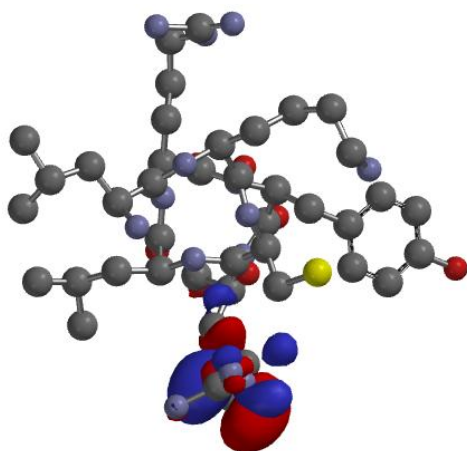
a) 2AYB



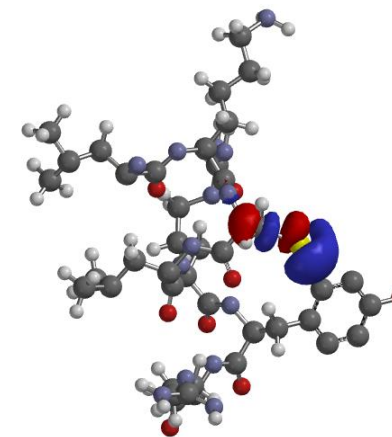
b) IR6K



c) 1ZZF

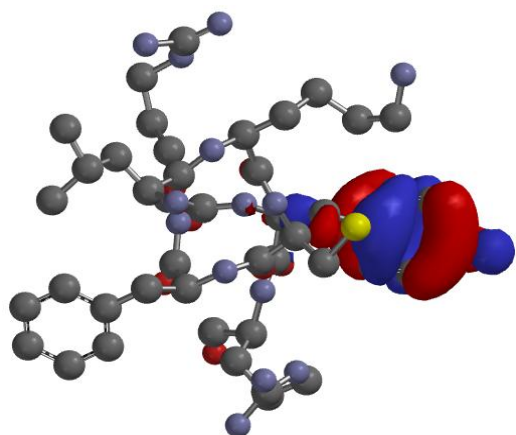


d) 1JJ4

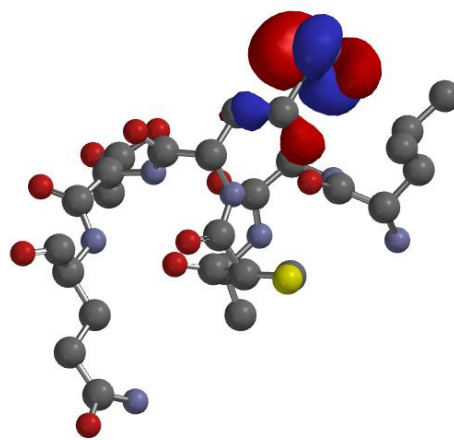


e) 1DHM

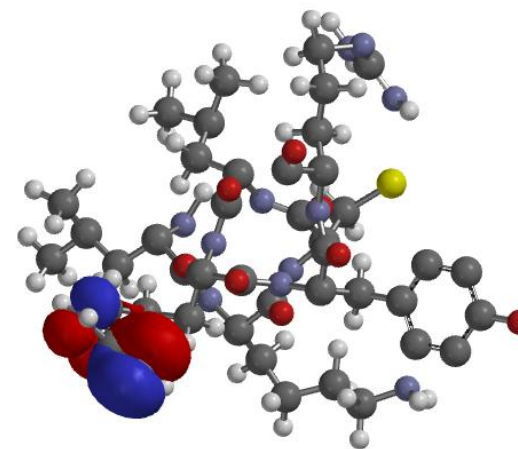
Figura 31. Orbitales moleculares desocupados de menor energía (LUMO) de los segmentos que interactúan con el ADN de los tipos de VPH estudiados.



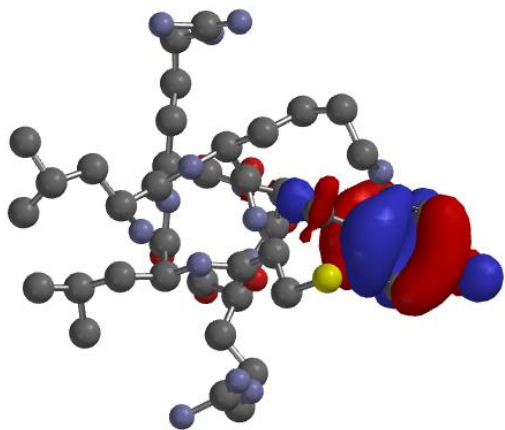
a) 2AYB



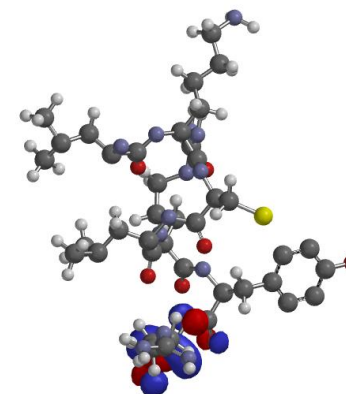
b) IR6K



c) IZZF



d) 1JJ4



e) IDHM

Figura 32. Orbitales moleculares ocupados de mayor energía (HOMO) de los segmentos que interactúan con el ADN de los tipos de VPH estudiados.

Tabla 8. Datos energéticos LUMO y HOMO de las proteínas estudiadas, ordenadas por virulencia, primero los de bajo riesgo y después los de alto riesgo.

Molécula	Energía LUMO (ua)	Energía HOMO (ua)	Gap HOMO-LUMO (ua)
2AYB	-0.01859	-0.20970	0.19111
1R6K	-0.09500	-0.12095	0.02595
1DHM	-0.00890	-0.16630	0.1574
1JJ4	-0.01172	-0.02421	0.01249
1ZZF	-0.03388	-0.15874	0.12486

Las moléculas se encuentran organizadas por orden de virulencia (del menor al mayor) y se puede observar que las energías más negativas se observan en la molécula 1ZZF, que representa al subtipo E2 VPH-16, la molécula más cancerígena de los de alto riesgo.

i. Distancias entre los aminoácidos

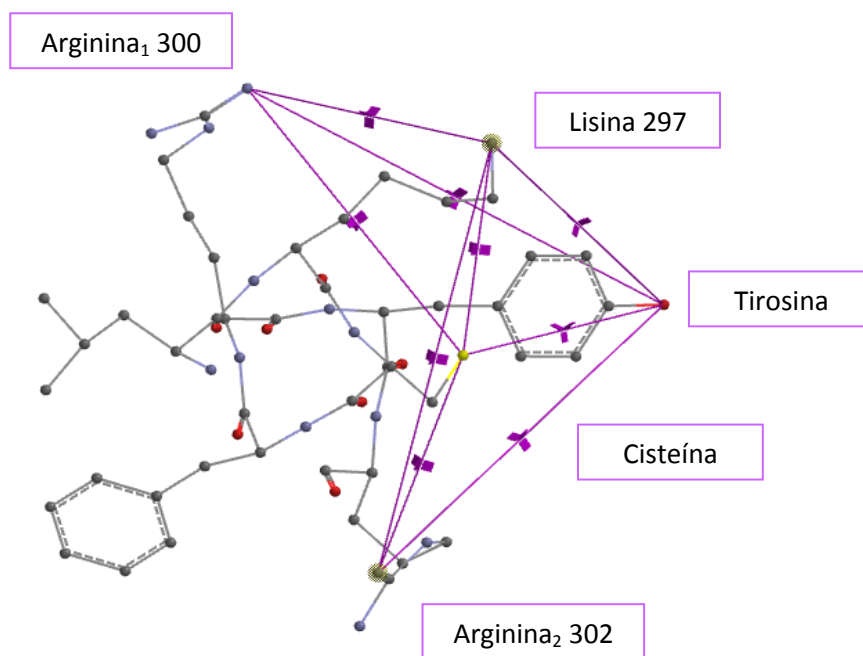


Figura 33. Distancia entre aminoácidos del VPH 6a. Cuyos valores se encuentran en la tabla 9.

Tabla 9. Distancia entre aminoácidos del VPH E2 - 6a.

Proteína E2 – 6a (2AYB)	
Cisteína – Tirosina	9.727 Å
Tirosina – Arginina1	12.042 Å
Cisteína – Arginina1	8.349 Å
Tirosina – Arginina2	11.325 Å
Cisteína – Arginina2	5.671 Å
Lisina – Cisteína	5.072 Å
Lisina – Tirosina	10.788 Å
Lisina – Arginina1	6.612 Å
Lisina – Arginina2	10.654 Å

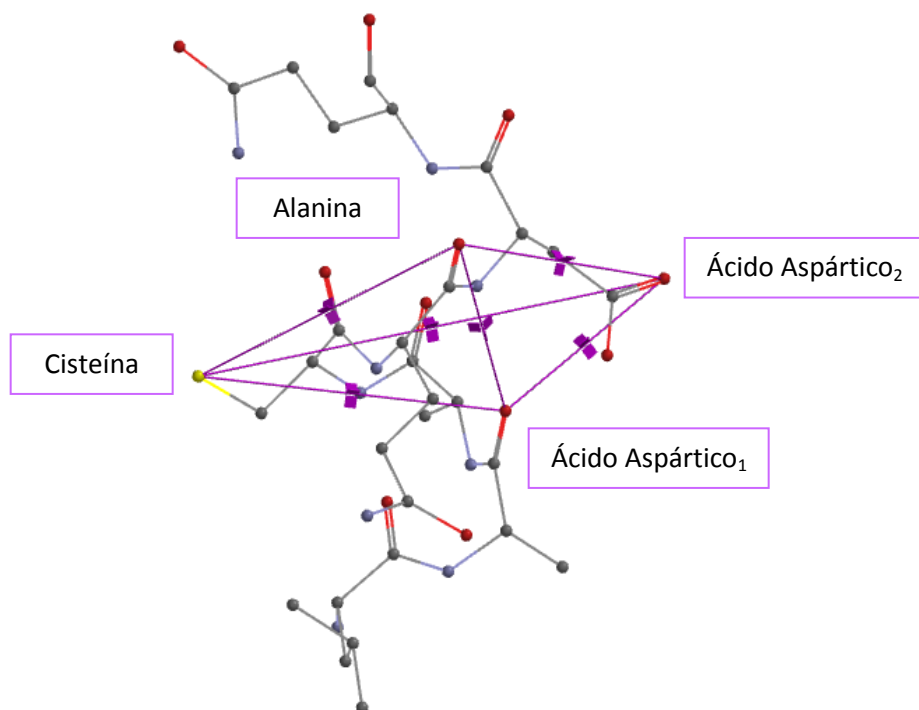


Figura 34. Distancia entre aminoácidos del VPH 11. Cuyos valores están en la tabla 10.

Tabla 10. Distancia entre aminoácidos del VPH E2 - 11.

Proteína E2 – 11 (1R6K)	
Ácido Aspártico1 - Alanina	5.005 Å
Alanina - Ácido Aspártico2	5.993 Å
Ácido Aspártico1 - Ácido Aspártico2	4.246 Å
Ácido Aspártico1 - Cisteína	6.480 Å
Ácido Aspártico2 - Cisteína	9.959 Å
Alanina – Cisteína	6.480 Å

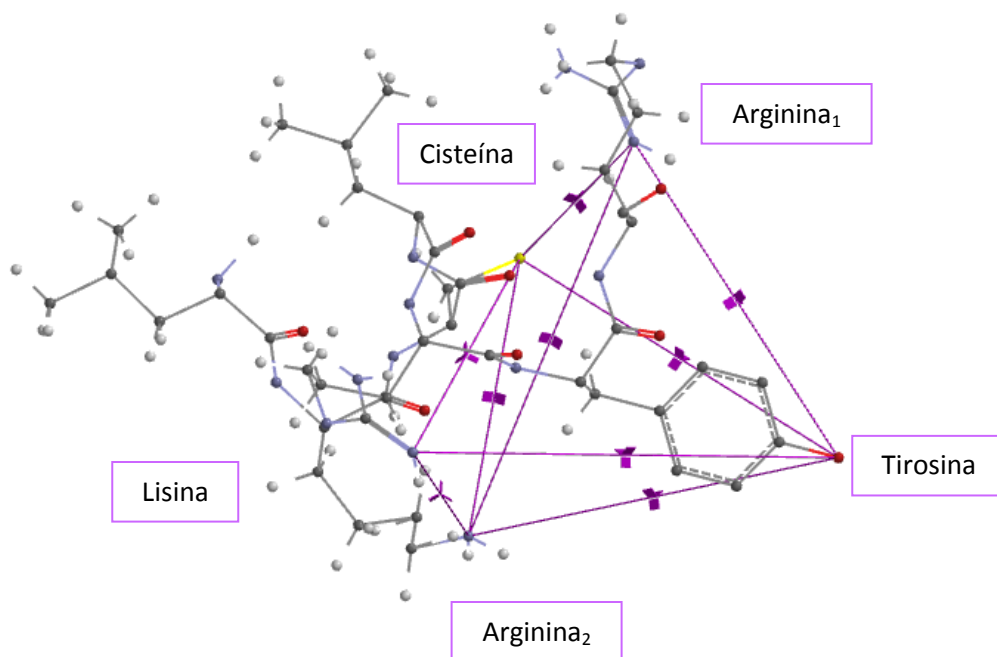


Figura 35. Distancia entre aminoácidos del VPH 16. Cuyos valores se encuentran en la tabla 11.

Tabla 11. Distancia entre aminoácidos del VPH E2 - 16.

Proteína E2 – 16 (ZZF)	
Cisteína – Tirosina	9.367 Å
Tirosina – Arginina1	8.583 Å
Cisteína – Arginina1	4.545 Å
Tirosina – Arginina2	11.489 Å
Cisteína – Arginina2	11.496 Å
Lisina – Cisteína	6.432 Å
Lisina – Tirosina	9.862 Å
Lisina – Arginina1	10.294 Å
Lisina – Arginina2	11.541 Å

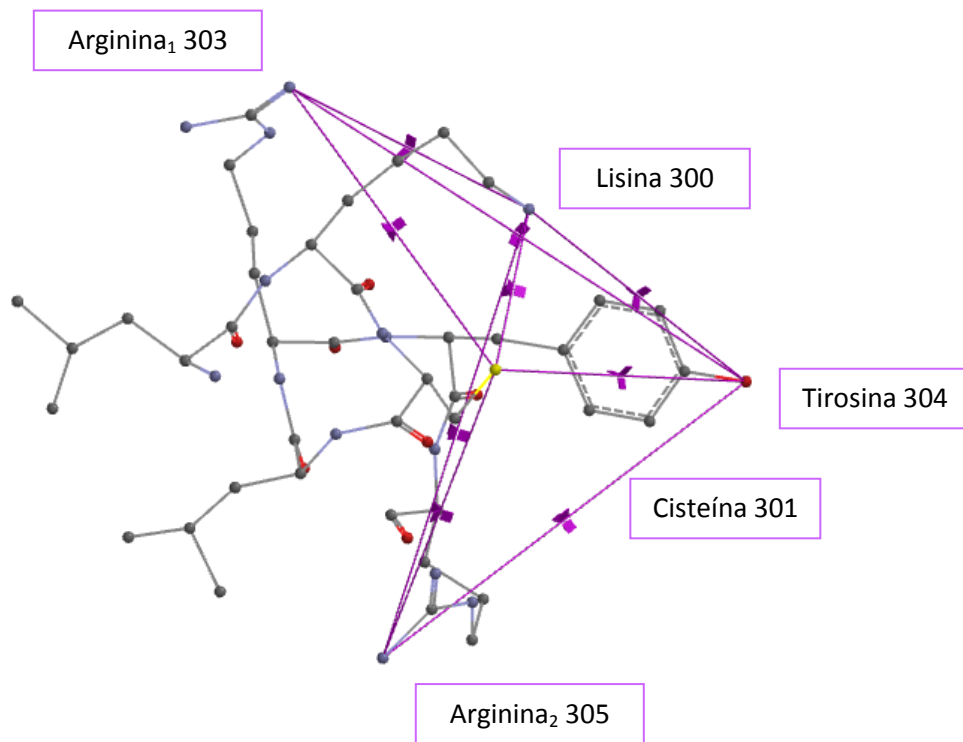


Figura 36. Distancia entre aminoácidos del VPH 18. Cuyos valores están en la tabla 12.

Tabla 12. Distancia entre aminoácidos del VPH E2 – 18.

Proteína E2 – 18 (1JJ4)	
Cisteína – Tirosina	9.667 Å
Tirosina – Arginina1	12.112 Å
Cisteína – Arginina1	8.600 Å
Tirosina – Arginina2	10.718 Å
Cisteína – Arginina2	7.436 Å
Lisina – Cisteína	3.665 Å
Lisina – Tirosina	9.072 Å
Lisina – Arginina1	6.540 Å
Lisina – Arginina2	10.297 Å

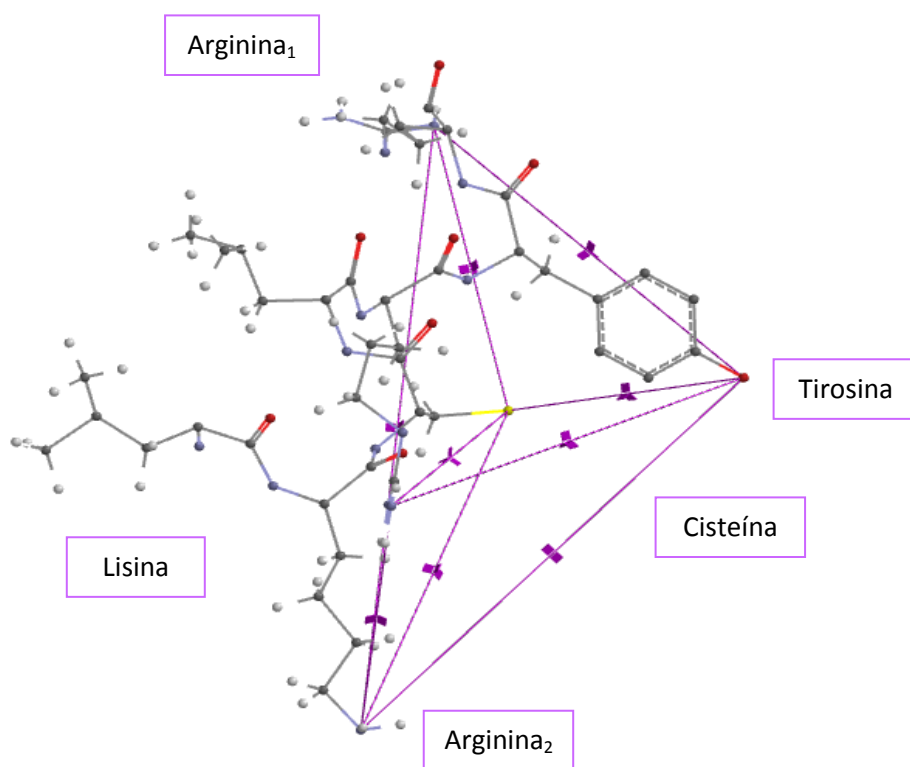


Figura 37. Distancia entre aminoácidos del VPH 31. Cuyos valores están en la tabla 13.

Tabla 13. Distancia entre aminoácidos del VPH E2 - 31.

Proteína E2 – 31 (1DHM)	
Cisteína – Tirosina	7.207 Å
Tirosina – Arginina1	12.444 Å
Cisteína – Arginina1	8.331 Å
Tirosina – Arginina2	10.545 Å
Cisteína – Arginina2	10.297 Å
Lisina – Cisteína	10.312 Å
Lisina – Tirosina	13.140 Å
Lisina – Arginina1	17.866 Å
Lisina – Arginina2	7.725 Å

j. Distancias entre los E2 de 2AYB y 1JJ4 con el ADN

Tabla 14. Distancia del VPH E2 – 6a al ADN.

Proteína E2 – 6a (2AYB) - ADN	
Lys 297 / NZ, OP2	2.938 Å
Cys 298 / SG, O6	3.716 Å
Arg 300 / NH2, OP2	3.015 Å
Tyr 301 / OH, C7	3.926 Å
Arg 302 / NH2, OP2	3.635 Å

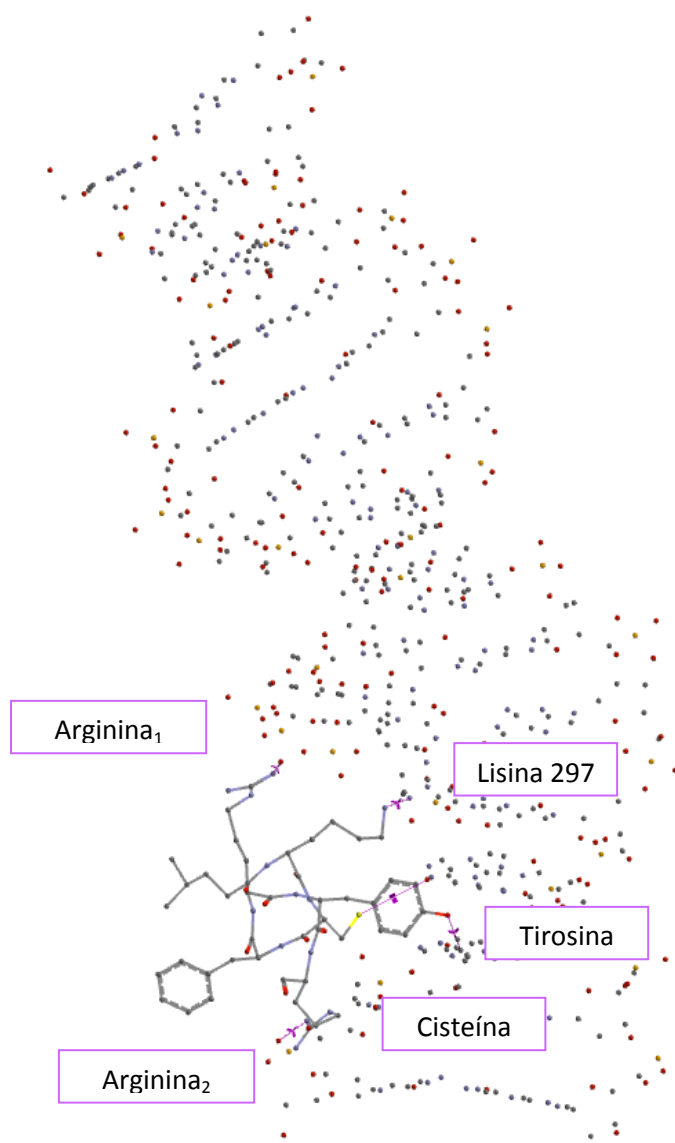


Figura 38. Distancia del VPH 6a al ADN. Cuyos valores están en la tabla 14.

Tabla 15. Distancia del VPH E2 – 18 al ADN.

Proteína E2 – 18 (1JJ4) - ADN	
Lys 300 / NZ, NZ	2.598 Å
Cys 301 / SG, N6	3.677 Å
Arg 303 / NH ₂ , OP2	2.840 Å
Tyr 304 / OH, C7	3.677 Å
Arg 305 / NH ₂ , OP2	5.392 Å

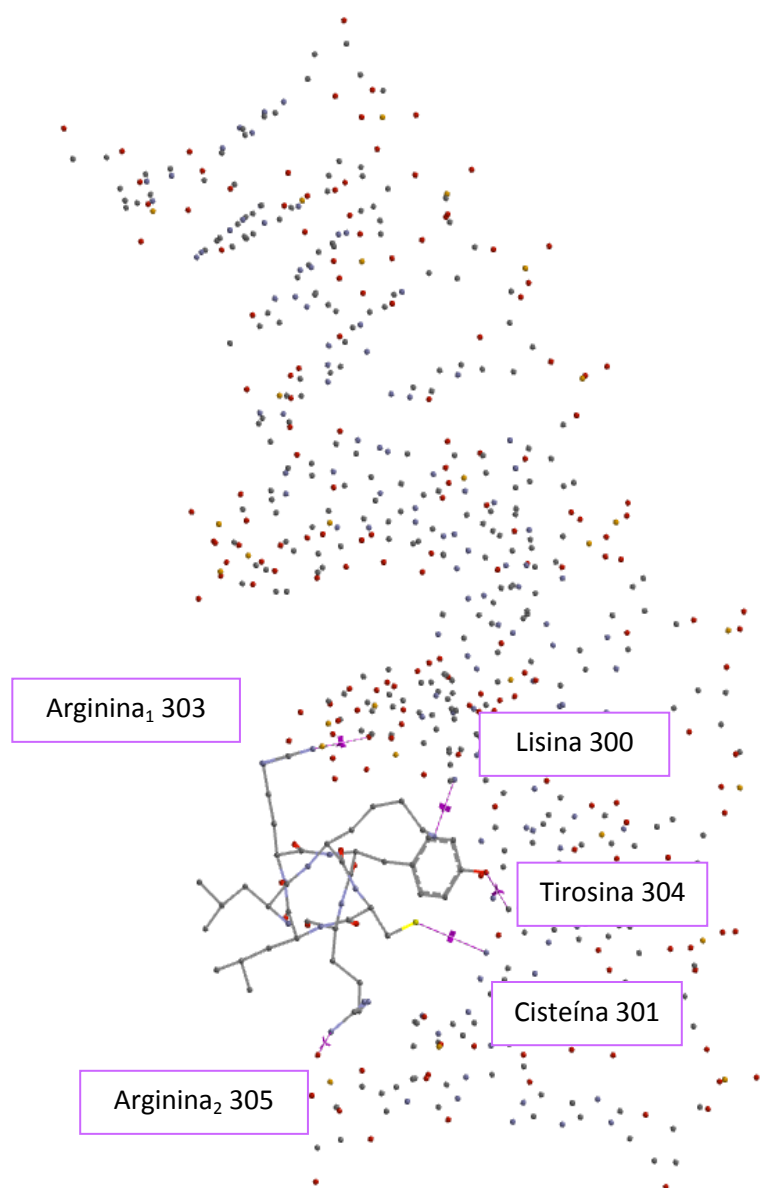


Figura 39. Distancia del VPH 18 al ADN. Cuyos valores están en la tabla 15.

En las moléculas 2AYB (VPH-6a), 1ZZF (VPH-16), y 1JJ4 (VPH-18) la Lisina y Cisteína son las más cercanas entre ellas, razón por lo cual el átomo del Azufre presenta una fuerte electronegatividad.

Las 3 moléculas de alto riesgo: 1ZZF (VPH-16), 1JJ4 (VPH-18) y 1DHM (VPH-31) tienen la misma secuencia de aminoácidos, semejante al subtipo de bajo riesgo 2AYB (VPH-6a), con la única diferencia del cambio de la segunda Leucina de los de alto riesgo por la Fenilalanina, sin embargo estos aminoácidos están más alejados que los 5 anteriores.

XI.CONCLUSIONES

- Se observa que la secuencia de aminoácidos de los segmentos E2 de los tipos de VPH estudiados, es la principal causa del grado de lesión.
- En la actividad del virus es más importante la estructura primaria y secundaria, que factores energéticos en el daño oncogénico
- De los 7 aminoácidos que interaccionan con el ADN, sólo la Lisina, la Cisteína, las dos Arginina y la Tirosina son las que están más cercanos.
- Los aminoácidos que presentan un mayor acercamiento al ADN son la Arginina, Cistina, Lisina y Tirosina, siendo la Lisina la que presenta una distancia menor de 2.598 Å (en el caso de la molécula 1JJ4 del VPH-18) y de 2.938 Å (en el caso de la molécula 2AYB del VPH-6a).
- En el caso de la Tirosina la distancia con la base 14T del polímero D, es de 3.926 Å para el VPH 6a. Para el tipo 1JJ4 la distancia entre la tirosina y la base 915T del polímero D, es de 3.677 Å.
- Los orbitales LUMO de las estructuras 2AYB y 1JJ4 tienen su ubicación sobre el residuo de la tirosina (TYR), lo cual hace suponer que su cercanía con el DNA los orienta a esa posición.
- Los orbitales HOMO muestran diferencias en su distribución en la molécula. Lo cual indica que no son condicionantes del daño oncogénico. Además como no hay una reacción de intercambio electrónico, no son relevantes.
- La diferencia de afinidades se correlaciona con la distribución de cargas (+) en sus superficies de interacción de ADN, lo que sugiere un papel para las fuerzas electrostáticas en reconocimiento de la deformidad de ADN.
- La energía, las densidades electrónicas, los potenciales electrostáticos y el momento dipolar aparentemente no son un factor condicionante del daño oncogénico entre los tipos VPH con el ADN.

XII.BIBLIOGRAFÍA

- (1) Garcia, C.A. (2011). Virus Oncogénicos. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología Instituto de Investigaciones Biomédicas - UNAM. Recuperado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/virus-oncogenicos.html>.
- (2) Steve, M. (2004). Oncogene. University of California at Berkeley, Department of Molecular and Cell Biology. Recuperado de : <http://www.nature.com/onc/journal/v23/n48/full/1208077a.html>.
- (3) Arango, A, P. (2012). El Virus del Papiloma Humano. Recuperado de: http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=42385&id_seccion=2476&id_ejemplar=4312&id_revista=152
- (4) Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina, López-Saavedra y Lizano-Soberón, *Cancerología 1* (2006): 31-55, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer. UNAM – INCan, Subdirección de investigación básica. Instituto Nacional de Cancerología. México D.F.
- (5) Chen E.Y., Howley P.M., Levinson A.D., Seeburg P.H. (1982). The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature*, 299:529–534.
- (6) Danos O., Katinka M., Yaniv M. (1982). Human papillomavirus 1a complete ADN sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.*, 1:231-236.
- (7) Gissmann, L., zur Hausen, H. (1980). Partial characterization of viral ADN from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int. J. Cancer.*, 25:605–609.
- (8) Orth G., Jablonska S., Favre M., Croissant O., Jarzabek-Chorzelska M., Rzesza G. (1978). Characterization of two types of human papillomaviruses in lesion of epidermodysplasia verruciformis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1537-1541.
- (9) Zur Hausen H., de Villiers E.M., Gissmann L. (1981). Papillomavirus infections and human genital cancer. *Ginecol. Oncol.*, 12:124-128.

- (10) Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus ADN from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *PNAS*, 80:3812–381.
- (11) Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., zur Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus ADN, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.*, 3:1151–1157.
- (12) Parkin D.M. (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer*, 118:3030-3044.
- (13) Ferlay J., Bray P., Pisani P, Parker D.M., GLOBOCAN (2002): Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase No 5, Version 2.0, Lyon: IARCPress,
- (14) Castellsagué X., de Sanjosé S., Bosch F.X. (2007). Epidemiología de la infección por VPH y del cáncer de cuello de útero. Nuevas opciones preventivas. En: Virus del Papiloma humano y Cáncer de cuello de útero. Carreras R., Xercavins J. Y Checa M.A. Ed médica Panamericana. pp. 1-25.
- (15) Walboomers JM, et al. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12–29.
- (16) zur Hausen. (1994). Human papillomaviruses. *Annu Rev Biochem* 48: 427–447.
- (17) deVilliers EM. (1994). Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbial Immunol* 186: 1–12.
- (18) Manual de Norma y procedimientos (1993). Prevención de los cánceres cervicouterino y mamario. Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Salud. Dirección General de Medicina Preventiva.
- (19) Boring CC, et al. Cancer statistics (1994); *CA CancerJ Clin* 1994; 44: 7–26.
- (20) Pisani P, Bray F, Parkin DM. (2002). Estimates of the worldwide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 97: 72–81.

- (21) Singer A. Cervical cancer screening: state of the art. (1995). *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 9: 39–64.
- (22) Estadísticas de mortalidad en México: Muertes registradas en el 2001. *Salud Pública de México* (2002); 44:565-81.
- (23) Bosch F.X., de Sanjosé S. (2007). The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis. Markers*, 23:213-27.
- (24) Munday JS, Kiupel. (2010). M. Papillomavirus-Associated Cutaneous Neoplasia in Mammals. *Vet Pathol* 254-64.
- (25) Iftner A, Klug SJ, Garbe C, Blum A, Stancu A, Wilczynski SP, et al. (2003). The prevalence of Human Papillomavirus Genotypes in Nonmelanoma Skin Cancers of Nonimmunosuppressed Individuals Identifies High-Risk Genital Types as Possible Risk Factors. *Cancer Res* Nov; 1; 63: 7515-9.
- (26) Andersson K, Waterboer T, Kirnbauer R, Slupetzky K, Iftner T, de Villiers EM, et al. (2008). Seroreactivity to Cutaneous Human Papillomaviruses among Patients with Nonmelanoma Skin Cancer or Benign Skin Lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Jan; 17:189-95.
- (27) Bernard H.U. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. Clin. Virol.*, 32S:S1-S6.
- (28) de Villiers E. M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324:17-27.
- (29) Bosch F.X., Manos M.M., Muñoz N., Sherman M., Jansen A.M., Peto J., Schiffman M.H., Moreno V., Kurman R., Shah, (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International and biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J. Ntl. Cancer Inst.*, 87:796-802
- (30) Franco E.L. (1996). Epidemiology of anogenital warts and cancer. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.*, 23:597-623.

- (31) Muñoz N., Bosch X., de Sanjosé S., Herrero R., Castellsagué X., Shah K.V., Snijders P.J.F., Meijer C.J.L.M. (2003). Epidemiologic classification of Human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl J. Med.*, 348:518-527.
- (32) Muñoz N., Bosch X., Castellsagué X., Díaz M., de Sanjosé S., Shah K.V., Meijer C.J.L.M. (2004). Against which human papillomaviruses types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int. J. Cancer*, 111:278-285.
- (33) Baker T.S., Newcomb W.W., Olson N.H., Cowser L.M., Carl Olson C., Brown J.C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.*, 60: 1445-1456.
- (34) Touzé A., Mahé D., El Mehdaoui S., Dupuy C., Combita-Rojas A.L., Bousarghin L., Sizaret P.Y., Coursaget P. (2000). The nine C-terminal amino acids of the major capsid protein of the human papillomavirus type 16 are essential for ADN binding and gene transfer capacity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 189:121-127.
- (35) Schäfer F., Florin L., Sapp M. (2002). ADN binding of L1 is required for human papillomavirus morphogenesis in-vivo. *Virology*, 295:172-181.
- (36) Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Lemmer J. (2009). Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infect Agent Cancer*. Nov 25; 4:16.
- (37) Liu J-S, Kuo S.R., Broker T.R., Chow L.T. (1995) The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free ADN replication. *J. Biol. Chem.*, 270:27283- 27291.
- (38) Cueille N., Nougarede R., Mechali F., Philippe M., Bonne-Andrea C. (1998). Functional interaction between the bovine papillomavirus virus type 1 replicative helicase E1 and cyclin E-Cdk2. *J. Virol.*, 72: 7255 – 7262.
- (39) Klumpp DJ, Laimins LA. (1999). Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology* 257: 239–246.

- (40) Ozbun MA, Meyers C. (1998). Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology*; 248: 218–230.
- (41) Raj K, Stanley MA. (1995). The ATP-binding and ATPase activities of human papillomavirus type 16 E1 are significantly weakened by the absence of prolines in its ATP-binding domain. *J Gen Virol* 76: 2949–2956.
- (42) Hughes FJ, Romanos MA. (1993). E1 protein of human papillomavirus is a ADN helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res* 21: 5817–5823.
- (43) Conger KL, et al. (1999). Human papillomavirus ADN replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human ADN polymerase alpha/primase. *J Biol Chem*; 274: 2696–2705.
- (44) Masterson PJ, et al. (1998). A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the ADN polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol*; 72: 7407–7419.
- (45) Frattini MG, Laimins LA. (1994). Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91: 12398–12402.
- (46) Sedman J, Stenlund A. (1998). The papillomavirus E1 protein forms a ADN-dependent hexameric complex with ATPase and ADN helicase activities. *J Virol*; 72: 6893–6897.
- (47) Liu JS, et al. (1998). Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free ADN replication. *J Biol Chem*; 273: 30704– 30712.
- (48) Gardiol D, et al. (1999). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*; 18: 5487–5496.
- (49) Ma T, et al. (1999). Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: 382– 387.

- (50) McBride A.A., Romanczuk H., Howley P.M. (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J. Biol. Chem.*, 266:18411-18414.
- (51) Howley P.M., Lowy D.R. (2007). Papillomaviruses. En: *Fields Virology Vol 2, 5ª*. Knipe D.M. & Howley P.M. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 2299-2354.
- (52) Doorbar J. (2007). Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis. Markers*, 23:297-313.
- (53) Rivera R., Delgado J., Painel V., Barrero R., Larraín A. (2006). Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el eptelio cervical. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.*, 71:135-140.
- (54) Motoyama S., Ladines-Llave C.A., Villanueva S.L., Maruo T. (2004). The role of human papillomavirus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *J. Med. Sci.*, 50:9-19.
- (55) Conrad M., Bubb V.J., Schlegel R. (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.*, 67:6170-6178.
- (56) Thorland E.C., Myers S.L., Persing D.H., Sarkar G., McGovern M.R., Gostout B.S., Smith D.I. (2000). Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res.*, 60: 591621.
- (57) Zhang B., Li P., Wang E., Brahmi Z., Dunn K.W., Blum J.S., Roman A. (2003). The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology*, 310:100-108
- (58) Zur Hausen H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 92:690-698.
- (59) Huibregtse J.M., Scheffner M., Howley P.M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.*, 10:4129-4135.
- (60) Oh S.T., Longworth M.S., Laimins L.A. (2004). Roles of the E6 and E7 proteins in the life cycle of low-risk human papillomavirus type 11. *J. Virol.*, 78:2620-2626.

- (61) Hengstermann A, D'silva MA, Kuballa P, Butz K, Hoppe-Seyler F, Scheffner M, San José S, Muñoz N. (2005). Growth suppression induced by downregulation of E6-AP expression in human papillomavirus-positive cancer cell lines depends on p53. *J Virol.* Jul;79:9296-300. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994823>
- (62) Castellsagué X (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760711>.
- (63) Munger K., Baldwin A., Edwards K.M., Hayakawa H., Nguyen C.L., Owens M., Grace M., Huh K.W. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.*, 78:11451-11460.
- (64) McLaughlin-Drubin ME, Huh KW, Münger K. (2008). The Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Associates with E2F6. *Journal of Virology.* Sep; 82: 8695-8705. Disponible en: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/82/17/8695>
- (65) Altekruse SF, Lacey JV Jr, Brinton LA, Gravitt PE, Silverberg SG, Barnes WA Jr et al. (2003). Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors or cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma=Northeastern United States. *Am J Obstet Gynecol*, Mar; 18: 657. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634637>
- (66) Trus B.L., Roden B.S., Greenstone H.L., Vrhel M., Schiller J.T. Booy F.P. (1997) Novel structural features of bovine papillomavirus revealed by a three dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.*, 4:413-420.
- (67) Florin L., Sapp C., Streeck R.E., Sapp M. (2002). Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J. Virol.*, 76:10009-10014.
- (68) Chen X.S., Garcea R.L., Goldberg I., Casini G., Harison C. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol. Cell*, 5:557-567.
- (69) Buck CB, et al. (2005). Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol* 79: 2839–2846.
- (70) Nelson LM, Rose RC, Moroianu J. (2002). Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem*; 277: 23958–23964.

- (71) Ozbun M, Meyers C. (1997). Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol*; 71: 5161–5172.
- (72) Chen XS, et al. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell*; 5: 557–567.
- (73) Sapp M, et al. (1995). Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Virol*; 76: 2407–2412.
- (74) Finnen RL, et al. (2003). Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 77: 4818–4826.
- (75) Darshan MS, et al. (2004). The L2 minor capsid protein of human papillomavirus type 16 interacts with a network of nuclear import receptors. *J Virol*; 78: 12179–12188.
- (76) Zhou J, et al. (1994). Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV ADN requires an intact L2 N-terminal sequence. *J Virol*; 68: 619–625.
- (77) Roden R., Day M., Bronzo B.,lv W.H, Yang Y., Lowy D.R., Schiller J.T. (2001). Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus Infection. *J.Virol.*, 75: 10493–10497.
- (78) Watt FM. (1998). Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 353: 831–837.
- (79) Berezutskaya E, et al. (1997). Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ*; 8: 1277–1286.
- (80) Flores ER, et al. (2000). The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J Virol*; 74: 6622–6631.
- (81) Bouvard V, et al. (1994). Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of transactivation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J*; 13: 5451–5459.
- (82) Steger G, Corbach S. (1997). Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol*; 71: 50–58.

- (83) Lima, L. M., and Silva, J. L. (2004) Positive contribution of hydration on ADN binding by E2c protein from papillomavirus, *J. Biol. Chem.* 279, 47968-47974.
- (84) Brinda, K. V., Kannan, N., and Vishveshwara, S. (2002) Analysis of homodimeric protein interfaces by graph-spectral methods, *Protein Eng.* 15, 265-277.
- (85) Mok, Y.-K., Prat-Gay, G. D., Butler, P. J., and Bycroft, M. (1996) Equilibrium dissociation and unfolding of the dimeric human papillomavirus strain-16 E2 ADN-binding domain, *Protein Sci.* 5, 310-319.
- (86) Hegde, R., and Androphy, E. (1998) Crystal structure of the E2 ADN-binding domain from human papillomavirus type 16: Implications for its ADN binding-site selection mechanism, *J. Mol. Biol.* 284, 1479-1489.
- (87) Carson, A., Z. Wang, X. Xiao, and S. A. Khan. (2005). A ADN recombinationbased approach to eliminate papillomavirus infection. *Gene Ther.* 12:534– 540.
- (88) Kim,S.S., Tam,J.K., Wang,A.F. and Hegde,R.S. (2000) The structural basis of ADN target discrimination by papillomavirus E2 proteins. *J. Biol. Chem.*, 275, 31245–31254.
- (89) Hegde,R.S., Wang,A.F., Kim,S.S. and Schapira,M. (1998) Subunit rearrangement accompanies sequence specific ADN binding by the bovine papillomavirus-1 E2 protein. *J. Mol. Biol.*, 276, 797–808.
- (90) You,J., Croyle,J.L., Nishimura,A., Ozato,K. and Howley,P.M. (2004) Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral ADN to host mitotic chromosomes. *Cell*, 117, 349–360.
- (91) Veeraraghavan,S., Mello,C.C., Androphy,E.J. and Baleja,J.D. (1999) Structural correlates for enhanced stability in the E2 ADN-binding domain from bovine papillomavirus. *Biochemistry*, 38, 16115–16124.
- (92) Antson AA, et al. (2000). Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature*; 403: 805–809.

- (93) Hegde RS, et al. (1992). Crystal structure at 1.7 Å of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature*; 359: 505–512.
- (94) Lagunas-Martinez A, Madrid-Marina V, Gariglio P (2010) Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. *BBA-Rev Cancer* 1805:6–16
- (95) Barbosa, M.S., Vass, W.C. and Lowy, D.R. (1991) *J. Virol.*, 65, 292–298.
- (96) Halbert, C.L., Demers, G.W. and Galloway, D.A. (1991) *J. Virol.*, 65, 473–478.
- (97) Hawley-Nelson, P., Vousden, H.K., Hubert, N.L., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (1989) *EMBO J.*, 8, 3905–3910.
- (98) Kaur, P. and McDougall, J.D. (1988) *J. Virol.*, 62, 1917–1924.
- (99) Munger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M. and Schlegel, R. (1989) *J. Virol.*, 63, 4417–4421.
- (100) Klumpp DJ, Laimins LA. (1999). Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology*; 257: 239–246.
- (101) Ozbun MA, Meyers C. (1998). Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology*; 248: 218–230.
- (102) Jeon S, Allen-Hoffmann B, Lambert P. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol*; 69: 2989–2997.
- (103) Pett MR, et al. (2004). Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res*; 64: 1359–1368.
- (104) Lee D, et al. (2000). Response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription. *J Biol Chem*; 275: 7045–7051.

- (105) Lee D, et al. (2002). Functional interaction between p/CAF and human papillomavirus E2 protein. *J Biol Chem*; 277: 6483–6489.
- (106) Demeret C, Yaniv M, Thierry F. (1994). The E2 transcriptional repressor can compensate for Sp1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *J Virol*; 68: 7075–7082.
- (107) Stubenrauch F, Lim HB, Laimins LA. (1998). Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31. *J Virol*; 72: 1071–1077.
- (108) Hadaschik D, et al. (2003). The Papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation. *J Virol*; 77: 5253–5265.
- (109) A.M. Sanchez-Perez, S. Soriano y A.R. Clarke, (1997). Disruption of the human papillomavirus type 16 E2 gene protects cervical carcinoma cells from E2F-induced apoptosis, *J. Gen. Virol.*, 78, 3009.
- (110) S. Blachon, S. Bellanger y C. Demeret, (2005). Nucleo-cytoplasmic shuttling of high risk human Papillomavirus E2 proteins induces apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 280, 36088.
- (111) N. Sathish, P. Abraham y A. Peedicayil, (2004). Human papillomavirus 16 E6/E7 transcript and E2 gene status in patients with cervical neoplasia, *Mol. Diagn.*, 8, 57.
- (112) M. Kalantari, F. Karlsen y G. Kristensen, (1998). Disruption of the E1 and E2 reading frames of VPH 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis, *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 17, 146.
- (113) S.A. Tonon, M.A. Picconi y P.D. Bos, (2001). Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions, *J. Clin. Virol.* 21, 129.
- (114) Durst, M., A. Kleinheinz, M. Hotz, and L. Gissmann. (1985). The physical state of human papillomavirus type 16 ADN in benign and malignant genital tumours. *J. Gen. Virol.* 66:1515–1522.
- (115) Hawley-Nelson, P., K. H. Vousden, N. L. Hubbert, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 8:3905–1910.

- (116) Hou, S. Y., S.-Y. Wu, T. Zhou, M. C. Thomas, and C.-M. Chiang. (2000). Alleviation of human papillomavirus E2-mediated transcriptional repression via formation of a TATA binding protein (or TFIID)-TFIIB-RNA polymerase II-TFIIF preinitiation complex. *Mol. Cell. Biol.* 20:113–125.
- (117) Steger, G., J. Ham, O. Lefebvre, and M. Yaniv. (1995). The bovine papillomavirus 1 E2 protein contains two activation domains: one that interacts with TBP and another that functions after TBP binding. *EMBO J.* 14:329–340.
- (118) Smotkin, D., H. Prokoph, and F. O. Wettstein. (1989). Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J. Virol.* 63:1441–1447.
- (119) Stenlund, A., and M. R. Botchan. (1990). The E2 trans-activator can act as a repressor by interfering with a cellular transcription factor. *Genes Dev.* 4:123–136.
- (120) Papworth, M., P. Kolasinska, and M. Minczuk. (2006). Designer zinc-finger proteins and their applications. *Gene* 366:27–38.
- (121) Papworth, M., M. Moore, M. Isalan, M. Minczuk, Y. Choo, and A. Klug. (2003). Inhibition of herpes simplex virus 1 gene expression by designer zincfinger transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:1621–1626.
- (122) Reynolds, L., C. Ullman, M. Moore, M. Isalan, M. J. West, P. Clapham, A. Klug, and Y. Choo. (2003). Repression of the HIV-1 5' LTR promoter and inhibition of HIV-1 replication by using engineered zinc-finger transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:1615–1620.
- (123) Segal, D. J., J. Goncalves, S. Eberhardy, C. H. Swan, B. E. Torbett, X. Li, and C. F. Barbas III. (2004). Attenuation of HIV-1 replication in primary human cells with a designed zinc finger transcription factor. *J. Biol. Chem.* 279: 14509–14519.
- (124) Wolfe, S. A., L. Nekludova, and C. O. Pabo. (2000). ADN recognition by Cys2His2 z
- (125) StoneJohn (2012). VMD. University of Illinois at Urbana-Champaign. EEUU.
- (126) Vázquez M. N, Paredes T. M (2008) Instituto Mexicano del Seguro Social. ISBN: 9788445809136, 2008. Editado por Elsevier – Masson.

XIII. ABREVIATURAS

ARN	Ácido Ribonucleico
CDK	Inhibidor de Ciclinas dependientes de Kinasa
CE	Celular enhancer
CMH	Complejo de Mayor Histocompatibilidad
CRPV	CottonTail Rabbit Papillomavirus
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epitelial
ERG	Glucocorticoides
EV	Epidermodisplasia Verruciforme
E2BS	Secuencia de unión
E2F	Factor transcripcional
E6 - AP	Proteína asociada a E6
ICTV	Comité Internacional Taxonómica de Virus
LCR	Región de Largo Control
LSIL	Lesiones Intraepiteliales escamosas
Mensajero Policistrónico	Molécula de RNA que es el producto de la transcripción de varios genes dispuestos en tándem
RE2	Endonucleasa de Restricción
Rb	Proteína Retinoblastoma
RSV	Virus del Sarcamo de Rous
SNF	Por sus siglas en inglés Sucrose Non Fermentable, este complejo posee actividad ATPasa estimulada por ADN, pudiendo desestabilizar las interacciones histonas-ADN de un modo dependiente de ATP.
SP1	Proteína Estimulante de la Transcripción
SV40	Virus del Simio 40
SWI	Por sus siglas en inglés SWItch, este complejo posee

	actividad ATPasa estimulada por ADN, pudiendo desestabilizar las interacciones histonas-ADN de un modo dependiente de ATP.
URR	Región Reguladora
VPB1	Virus del Papiloma Bovino tipo 1
VPH	Virus del Papiloma Humano
VLPs	Partículas similares al Virus
ZFPs	Factor de transcripción