



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“Papel del oncogén E6 HPV-16 y sus
productos de *splicing* en la inhibición
de la apoptosis en cáncer
cervicouterino.”

TESIS

Que presenta

M. en C. CAROLINA EUGENIA VAISMAN

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de la tesis

DR. NICOLAS VILLEGAS SEPULVEDA

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N. EN EL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR UNIDAD ZACATENCO BAJO LA TUTORIA DEL DR. NICOLAS VILLEGAS SEPULVEDA Y LA ASESORIA DE LAS DRAS. LETICIA CEDILLO BARRON, ROSAURA HERNANDEZ RIVAS, ANA LORENA GUTIERREZ ESCOLANO Y ELENA ARECHAGA OCAMPO.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	I
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	V
INDICE DE FIGURAS	VIII
INDICE DE TABLAS	X
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
<i>CANCER CERVICOUTERINO</i>	3
<i>PAPILOMAVIRUS (HPV)</i>	5
<i>¿COMO EL HPV PUEDE LLEVAR AL CÁNCER?</i>	6
<i>SPLICING DEL HPV 16</i>	8
<i>APOPTOSIS</i>	9
<i>CASPASA 9</i>	12
<i>CASPASA 9 ISOFORMA β</i>	14
<i>AUTOFAGIA</i>	16
<i>PI3K/Akt/mTOR Y CANCER DE CERVIX</i>	18
<i>Akt, IAPs Y CASPASAS</i>	21
<i>Akt Y RESISTENCIA AL CISPLATINO</i>	22
ANTECEDENTES DIRECTOS	25
JUSTIFICACION	26
HIPOTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
MATERIALES Y METODOS	28
<i>Cultivo celular</i>	28
<i>Extracción de proteínas, electroforesis SDS-PAGE y Western Blot</i>	28
<i>Ensayo de viabilidad</i>	29

<i>Ensayo de potencial de membrana mitocondrial.....</i>	<i>30</i>
<i>Ensayo de actividad de caspasas.....</i>	<i>30</i>
<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>31</i>
RESULTADOS.....	32
CAPITULO I: E6, E6*I Y E6*II MUESTRAN EFECTOS OPUESTOS AL CISPLATINO.....	32
<i>Células C33-A transfectadas con E6*II-GFP muestran un elevado nivel de despolarización de membrana mitocondrial.....</i>	<i>32</i>
<i>Proteínas mitocondriales se expresan sin diferencias en células C33-A transfectadas con E6 y sus variantes de splicing.....</i>	<i>32</i>
<i>Células C33-A transfectadas con E6 o E6*I-GFP tienen baja actividad de caspasas 9 y 3 respecto a C33-A E6*II-GFP.....</i>	<i>33</i>
<i>Células C33-A y C33-A transfectadas expresan bajo nivel de procaspasa- 8, pero no así su actividad.....</i>	<i>34</i>
<i>La procaspasa 8 fue inmunoprecipitada de células C33-A.....</i>	<i>35</i>
<i>El nivel de procesamiento de la caspasa 3 correlaciona con el procesamiento de su sustrato PARP.....</i>	<i>36</i>
CAPITULO II: PROCESAMIENTO DE CASPASA 9	38
<i>La caspasa 9 presenta alteración en su procesamiento.....</i>	<i>38</i>
<i>La transfección de E6 y sus variantes de splicing en células C33-A no conducen el procesamiento total de la caspasa 9.....</i>	<i>39</i>
<i>El fragmento de procesamiento completo de la caspasa 9 no se degrada vía proteosoma.....</i>	<i>39</i>
CAPITULO III: AUTOFAGIA.....	41
<i>Las variantes de splicing del oncogén E6 fusionadas a GFP no sufren modificación vía autofágica, y el modelo de estudio es apto para evaluar esta vía de degradación.....</i>	<i>41</i>
<i>La caspasa 9 activa no se degrada vía autofágica en células C33A transfectadas con variantes de splicing del oncogén E6.....</i>	<i>42</i>
<i>El tratamiento con cisplatino induce autofagia y en células C33-A E6 se favorece la conjugación de LC3-I con fosfatidiletanolamina (PE).....</i>	<i>42</i>
CAPITULO IV: FOSFORILACION DE CASPASA 9 POR AKT	44
<i>La caspasa 9 está fosforilada en células C33-A.....</i>	<i>44</i>

<i>Akt está activa en células C33-A.....</i>	<i>44</i>
<i>El inhibidor VIII de Akt no beneficia la apoptosis en células C33-A.....</i>	<i>45</i>
<i>CAPITULO V: CASPASA 9 ISOFORMAβ.....</i>	<i>46</i>
<i>La isoforma β de la caspasa 9 está presente en células C33-A constitutivamente al igual que la isoforma α o canónica.....</i>	<i>46</i>
<i>C33-A E6 GFP y C33-A E6*I GFP tienen más factor hn RNP L que C33-A E6*II luego del estímulo apoptótico del cisplatino.....</i>	<i>47</i>
<i>DISCUSIÓN.....</i>	<i>48</i>
<i>CONCLUSIONES</i>	<i>52</i>
<i>PERSPECTIVAS</i>	<i>53</i>
<i>BIBLIOGRAFIA.....</i>	<i>54</i>

AGRADECIMIENTOS

**AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA POR
HABERME OTORGADO LA BECA CON NÚMERO DE
REGISTO 368874**

- *A Dios y a la Virgen por marcarme el camino y no dejarme sola.*
- *A mi mamá Raquel que es mi pilar, por la empatía, el aliento, los sabios consejos y el amor infinito.*
- *A mis queridísimos abuelos, Dolores (Yaya) y Félix porque sin ellos no hubiera llegado hasta donde estoy.*
- *A mi hermana Jimena por su apoyo permanente.*
- *A mis dulces sobrinos Amparito, Abrilita y Tizianito por la alegría y motivación de siempre.*
- *A Alex por su infinito amor, su paciencia, su soporte y la constante motivación para impulsarme a seguir adelante y ser mejor cada día.*
- *A Juanita y Tony por el afecto y el apoyo desde siempre.*
- *A Paloma y Lucero por la compañía y alegría de cada día.*

- *Al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda por su orientación profesional, enseñanzas, sus valiosísimos consejos, su comprensión y sobre todo por brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de investigación. durante la realización de este trabajo*
- *A mis asesoras Dra. Leticia Cedillo Barrón, Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, Rosaura Hernández Rivas, Elena Arechaga-Ocampo por el cariño, los consejos, el apoyo, y la dedicación a lo largo de este trabajo.*
- *Al Biólogo Raúl Bonilla Moreno por su infinita paciencia, empatía, consejos y valiosísimo apoyo técnico durante la fase experimental del proyecto.*
- *A la Dra. Catalina Flores Maldonado por sus consejos experimentales, su ayuda técnica y académica y por el cariño.*
- *Al Dr Julio García Cordero por su apoyo técnico y la buena onda de siempre.*
- *A la M. en C. Ma. del Pilar Figueroa Corona por sus consejos experimentales y su ayuda técnica.*
- *Al Dr. Héctor Romero Ramírez por su ayuda técnica y sus consejos.*
- *A la Q.F.B. Leticia Alemán Lazarini por su ayuda experimental y el cariño.*
- *A mis compañeros de laboratorio.*
- *A la incondicional María de Jesús Maqueda, “la Maru bonita” por su ayuda y cariño a lo largo de estos años.*
- *A Guadalupe Guzmán, Lupita por su ayuda con los trámites migratorios de todos estos años y por su apoyo como secretaria del laboratorio del Dr. NVS.*
- *A todos los compañeros y/o amigos de Biomedicina que a lo largo de este doctorado de alguna manera, por pequeña que fuera me ayudaron a llevar a*

cabo este proyecto: Froylán Ramirez Gómez, MSc Alfredo Montes, MSc Sofía Carrillo Halfon, Dra Paola Valenzuela León, MSc Josselin Corzo, Dr Moisés Gonzalez, Dr Gaurav Srivastava, MSc Víctor Rosales, Sr. Manuel, MSc Daniela Lozano, Dr. Eduardo Vadillo Rosado, Dra Hilda Vargas Robles, MSc Sandra Chánez, MSc Selene Zúñiga Martínez, MSc Eliana Silva Casoluengo, MSc Martha Velázquez, Dr Alex García Ponce, MSc Itandehuí Martínez Cuevas, MSc Adrián Duque, MSc Berenice Jimenez Ramos, Dra. Laura Gómez Virgilio, Julio Ramirez Gómez, Benjamín Ortiz Lopez, , MSc Julio Vázquez, Dr Abraham García Gil, MSc Zayda Piedra Quinteros, Dr. José Luis Maravillas, Dra Mónica Mendoza, Lázaro, Carmen Dominguez, Alejandro Trejo Carmona, Dr Eloy Pérez Yopez,

- *A los serviciales chicos de los departamentos de Servicios escolares y Becas por brindarme siempre información clara y oportuna: Adrián, Gabriel, Ernesto, Darinka, e Iván.*
- *A mis amigas MSc Cynthia Vanegas Vila, Dra. Perla Leal Galicia y MSc Odette Verdejo.*

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

AIF	Factor inductor de la apoptosis
ACIP	"Advisory Committee on Immunization Practices"
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Atg	"AuTophagy-related"
BAX	Proteína asociada a Bcl-2
Bcl-2	Proteína antiapoptótica linfoma de células B-2
BIR	Dominios repetidos IAP de baculovirus
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
CASBAH	"Caspase Substrate dataBAse Homepage"
CCU	Cáncer Cérvico Uterino
CD40L	Ligando de CD40
CD95L	Ligando de CD95
CDC	"Centers for Disease Control and Prevention"
CDDP	Cis-diaminodicloroplatino
CDK	Ciclina dependiente de cinasas
cDNA	DNA complementario
cIAP1	Proteína celular inhibidora de la apoptosis 1
cIAP2	Proteína celular inhibidora de la apoptosis 2
CIN	Neoplasia cervical intraepitelial
CIS	Carcinoma cervical <i>in situ</i>
CisPt	Cisplatino
CLi	Cloruro de litio
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico
DD	Dominio de muerte

DED	Dominio efector de muerte
DIABLO	Proteína de unión directa a IAPs con bajo punto isoelectrico
DISC	Dominio de señalización inductor de muerte
dNTPs	Desoxinucleótidos de trifosfato
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
FAS	Antígeno de superficie mediador de apoptosis
FCCP	Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLICE	"FADD-like IL-1beta-converting enzyme"
FLIP	"FLICE-inhibitory proteins"
FMK	Fluorometilcetona
GFP	Proteína verde fluorescente
HDACs	Desacetilasas de histonas
HEF	Fibroblastos de embrión de hámster
HPV	Virus del papiloma humano
hrHPV	Virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico
HSIL	"High-grade cervical lesions"
IAPs	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
ICC	Cancer cervical invasor
IFN	Interferón
IKK	Kinasa de I κ B
IRF-1	Factor de regulación 1 de IFN
IκB	Inhibidor NF- κ B
kDa	Kilo Daltones
LAMP-2	"Lysosome-associated membrane protein 2"

LC3	"Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3"
LCR	Región larga de control
IrHPV	Virus del papiloma humano de bajo riesgo oncogénico
LSIL	"Low-grade cervical lesions"
LSIL	Lesiones de bajo grado
MAPK	"Mitogen-activated protein kinase"
MEM	Medio esencial mínimo
Min	Minutos
MOMP	Permeabilidad de la membrana mitocondrial externa
mRNA	Mensajero del RNA
mTORC	"Mammalian Target of Rapamycin Complex"
NF-κB	Factor nuclear κB
NIK	Kinasa de NF-κB
NO	Óxido Nítrico
NSCLC	Carcinoma de células no pequeñas de pulmón
ORF	Marco abierto de lectura
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PE	Fosfatidiletanolamina
PARP	"Poly (ADP-ribose) Polymerases"
pb	Pares de bases.
PBS	Solución salina de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PTPC	Complejo del poro de transición de la permeabilidad
Rb	Retinoblastoma
RING	"Really interesting new gene"

RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensajero
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
S / Ser	Serina
SDS	Dodecil sulfato de Sodio
SIL	"Squamous Intraepithelial Lesions"
SMAC	Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria
T /Thr	Treonina
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilendiamina
TNF	Factor de necrosis tumoral.
TNFR1	Receptor del factor de necrosis tumoral 1
TRADD	Dominio de muerte asociado a TNF-R
TRAF2	Proteína 2 asociada al receptor de TNF
TRAF3	Proteína 3 asociada al receptor de TNF
TRAIL	Ligado inductor de apoptosis relacionado a TNF
WB	<i>Western Blot</i>
XIAP	Proteína inhibidora de la apoptosis ligada al X
μg	Microgramos
μl	Microlitros
ψΔm	Potencial de membrana mitocondrial
°C	Grados centígrados
5' ss	Sitio de <i>splicing</i> 5'

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Tasa de incidencia de cánceres cada 10000 mujeres entre 15 y 44 años.
- Figura 2 Transición de la infección por HPV.
- Figura 3 Estadios de cáncer cervicouterino.
- Figura 4 Genotipos de HPV y su contribución al desarrollo de cáncer cervical
- Figura 5 Ciclo viral del HPV.
- Figura 6 Organización genómica de los genes HPV-16 E6/E7.
- Figura 7 Correlación entre el grado de lesión cervical y E6*I/E6*II en muestras de cáncer de cérvix positivas a ambos transcritos.
- Figura 8 Secuencias de aminoácidos de E6. E6*I y E6*II.
- Figura 9 Oncogén E6 y las vías de señalización que afecta.
- Figura 10 E7 afecta numerosos procesos celulares a través de interacciones con múltiples proteínas del hospedero
- Figura 11 Vías de la apoptosis
- Figura 12 Formación del apoptosoma
- Figura 13 Regulación de la caspasa 9 por reguladores endógenos en distintas vías de señalización.
- Figura 14 Estructura de la caspasa 9.
- Figura 15 Variantes de *splicing* de la caspasa 9.
- Figura 16 Modelo de la regulación de hnRNP U/L C9/E3 por fosforilación.

- Figura 17 Vía autofágica
- Figura 18 Interacción de proteínas implicadas en las vías de la apoptosis y de la autofagia.
- Figura 19 Isoformas de Akt, mostrando las diferencias en sus sitios de activación
- Figura 20 Estructura de Akt.
- Figura 21 Complejos de mTOR
- Figura 22 Sitios de escisión de Akt por la caspasa
- Figura 23 Cisplatino y Akt
- Figura 24 Potencial de membrana mitocondrial de células C33-Af transfectadas con las variantes de *splicing* del oncogen E6 HPV-16.
- Figura 25 Análisis de la expresión de proteínas mitocondriales implicadas en la apoptosis intrínseca mediante *Western Blot*.
- Figura 26 Niveles de actividad de caspasas -9 y -3 en células C33-A bajo estímulo apoptótico.
- Figura 27 Expresión de procaspasa-8 en células C33-A.
- Figura 28 Inmunoprecipitación de la caspasa-8.
- Figura 29 Procesamiento de caspasas en células C33-A
- Figura 30 Caspasa 9 y su procesamiento.
- Figura 31 Procesamiento de la caspasa 9 en células HMEC y C33-A
- Figura 32 Procesamiento parcial de la caspasa 9 en células C33-A transfectadas con pEGFPN1 (Mock), E6-GFP, E6*I-GFP, E6*II-GFP.
- Figura 33 Procaspasa 9 y MG132
- Figura 34 Procesamiento de la caspasa 9 con Cisplatino y MG132.

- Figura 35 *Las variantes de splicing del oncogén E6 transfectadas en células C33-A, no se degradaron por autofagia.*
- Figura 36 Fuerte inducción de apoptosis no altera autofagia.
- Figura 37 Caspasa 9 y autofagia.
- Figura 38 C33-A E6 favorece la conjugación de LC3-I con la fosfatidiletanolamina, convirtiéndola en LC3-II.
- Figura 39 Las formas cortas de *splicing* del oncogén E6, E6*I y E6*II no favorecen la conjugación de LC3-I.
- Figura 40 Caspasa 9 y fosfatasa lambda.
- Figura 41 Akt está activa en células C33-A.
- Figura 42 El inhibidor VIII específico de Akt no incrementa la apoptosis disparada con cisplatino.
- Figura 43 La isoforma β de la caspasa 9 está presente en células C33-A.
- Figura 44 El factor de *splicing* hnRNP L.

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1 Anticuerpos utilizados.

RESUMEN

El cisplatino es la droga antineoplásica de primera línea en el tratamiento del cáncer de cérvix; induce apoptosis vía mitocondrial a través del daño al DNA. Células de carcinoma cervical C33-A (HPV-), transfectadas establemente con monocistrones de variantes de *splicing* del oncogén E6 HPV-16, mostraron efectos opuestos al cisplatino ya que, E6*I confirió resistencia y E6*II sensibilidad al tratamiento. Se evaluaron las caspasas implicadas en el disparo y progresión de la apoptosis intrínseca evidenciándose una actividad diferencial entre E6*I y E6*II, así como en el descenso del potencial de membrana mitocondrial. Complementando el hallazgo, se analizó el procesamiento de la caspasa 9 el cual sorprendentemente mostró ser parcial y no completo en contraste con la caspasa 3. Analizando la causa de este resultado y a sabiendas que la caspasa 9 es regulada por fosforilaciones inhibitorias se evaluó concretamente la hecha por Akt en la serina 196. Esta fosforilación ha sido asociada a la resistencia a la quimioterapia en varias neoplasias. Si bien en células C33-A la caspasa 9 se encontró fosforilada en este residuo, ensayos de viabilidad sometiendo a las células a un inhibidor de Akt, revelaron que la inhibición de Akt no favoreció a la apoptosis. Por lo tanto, se sugirió que esta fosforilación puede no ser responsable del defecto en el procesamiento. Se investigó, además, la degradación de la caspasa 9 y de sus formas de procesamiento, por las dos vías más importantes, el proteosoma y la autofagia, mediante el uso de inhibidores específicos. Sorpresivamente los resultados insinuaron que el oncogén E6 HPV-16

aumenta la conjugación de LC3, favoreciendo la autofagia en células tratadas con cisplatino. En conclusión, se sugiere que la resistencia diferencial a la apoptosis por cisplatino no tiene relación con el procesamiento parcial de la caspasa 9. Sin embargo, son necesarios más ensayos para dilucidar por qué E6*II sensibiliza a las células C33-A y E6* I confiere resistencia y, se plantea un nuevo interrogante acerca del rol de E6 HPV-16 sobre la autofagia.

ABSTRACT

Cisplatin is gold standard antineoplastic drug to treatment of cervical cancer; it induces mitochondrial pathway apoptosis by damage to DNA. Cervical carcinoma stably transfected C33-A cells (HPV-), with monocistronic of E6 HPV 16 *splicing* variants showed opposite effect to cisplatin, as E6*I conferred resistance and E6*II sensitivity to treatment. The caspases involved in the triggering and progression of intrinsic apoptosis were evaluated evidencing a differential activity between E6*I and E6*II, as well as a decrease in the mitochondrial membrane potential. Complementing the finding, the processing of caspase 9 was analyzed, which surprisingly showed to be partial and not complete such as caspase 3. The characteristic band of 15 kDa did not observe by *Western Blot*. Analyzing the cause of this result and knowing that caspase 9 is regulated by inhibitory phosphorylations, the one made by Akt in serine 196 was specifically

evaluated. This phosphorylation has been associated with resistance to chemotherapy in several cancers. Despite caspase 9 were found phosphorylated in this residue, viability assays with Akt inhibitor showed that inhibition by Akt did not favor the apoptosis. Therefore, it was suggested that this phosphorylation is not responsible for the defect processing. Also, caspase 9 degradation and its processing forms were investigated by the two most important pathways, the proteasome and autophagy. Using specific inhibitors of each pathway, the band 15 kDa did not evidence. Although, surprisingly the results suggested that E6 oncogene increases LC3 conjugation, favoring autophagy in cells treated with cisplatin. In conclusion, it is suggested that differential resistance to apoptosis by cisplatin is not related to the partial processing of caspase 9. More assays are necessary to elucidate why E6*II sensitizes to C33-A cells and E6*I confers resistance and, it is enunciated a new interrogate about the role of E6 HPV 16 on autophagy.

INTRODUCCION

CANCER CERVICOUTERINO

La población mundial estimada de mujeres mayores de 15 años es de 2,784 millones, las cuales están en riesgo de desarrollar cáncer cervical. La incidencia es en particular alta en mujeres que viven en América Central y del Sur, el Caribe, y el sur y el este de África. Actualmente, se estima que cada año 527,624 mujeres son diagnosticadas y por lo menos la mitad de ellas fallecen por la enfermedad. El cáncer de cérvix es el cuarto cáncer femenino en incidencia y mortalidad a nivel mundial y el segundo entre

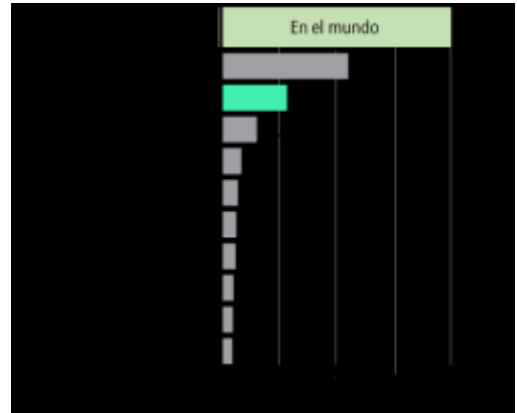


Figura 1: Tasa de incidencia de cánceres cada 10.000 mujeres entre 15 y 44 años

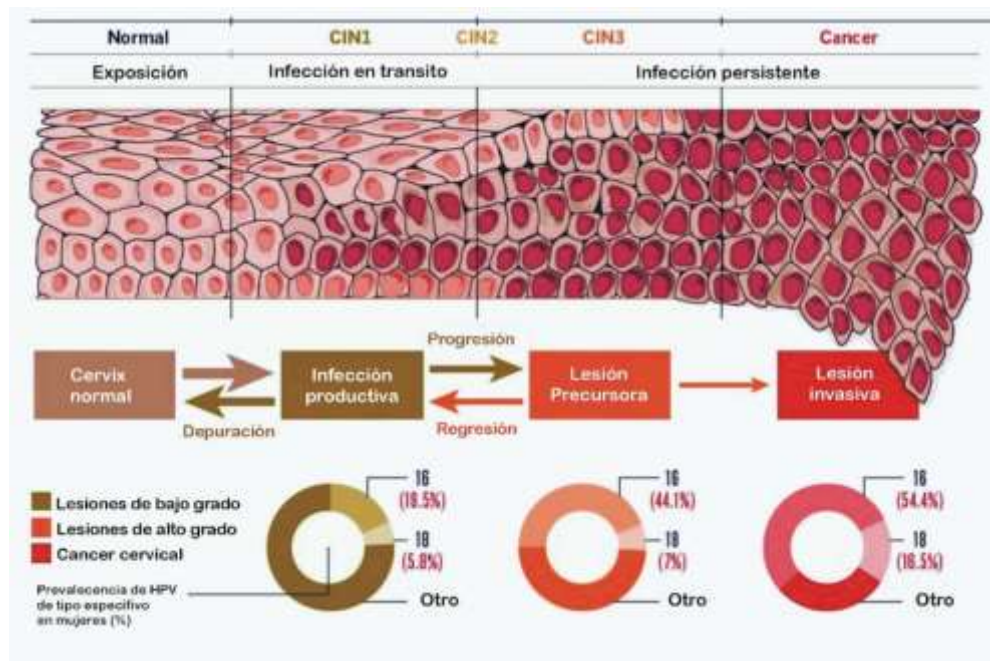


Figura 2: Transición de la infección por HPV. La mayoría de las infecciones resuelve en dos años. Pero si la infección persiste puede aparecer displasia leve (CIN 1) que se transforma a moderada (CIN 2) o severa (CIN 3). Si las células precancerosas atraviesan la membrana basal y se diseminan la condición se convierte en cáncer cervical. Los factores de riesgo incluyen un gran número de parejas sexuales, la edad de la primera relación sexual y antecedentes de enfermedad venérea. El tabaquismo es un cofactor; las fumadoras tienen un riesgo más alto de displasia con la infección de HPV. La infección con VIH, especialmente cuando se combina con un bajo recuento de

linfocitos T CD4+, se asocia con una tasa más elevada de displasia de alto grado y es probable

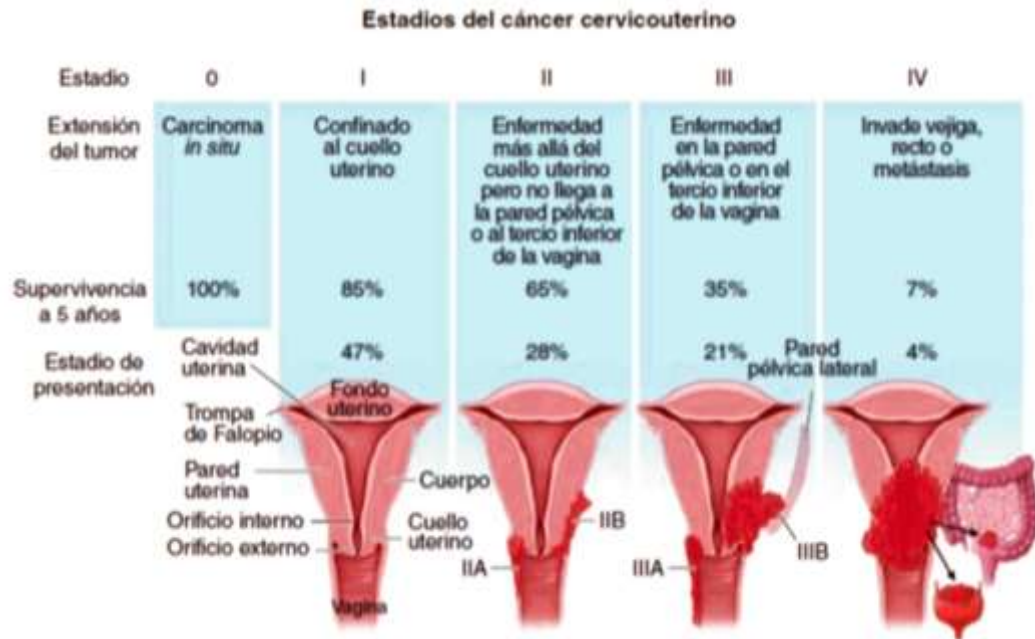


Figura 3: Estadios de cáncer cervicouterino. Los tumores de cuello uterino estadio I están confinados al cuello uterino, mientras que los tumores estadio II se extienden hacia la vagina o al tejido blando paracervical. Los tumores estadio III se extienden hacia la vagina inferior o las paredes laterales pélvicas, que haya un periodo más corto latencia entre la infección y la enfermedad invasiva.

Aunque las infecciones de HPV son comunes, el 90% de las infecciones se resuelven en 2 años. Si la infección persiste, pueden aparecer células anormales (Fig. 2). SIL (Lesiones intraepiteliales escamosas) y CIN (Neoplasia cervical intraepitelial) son términos que describen las lesiones precancerosas (Fig. 3). CIN es un diagnóstico histológico obtenido ya sea por biopsia o por escisión quirúrgica. El grado de CIN 1,2 o 3 depende del espesor de epitelio anormal. CIN 1 o LSIL son

lesiones definidas por cambios en el tamaño, forma y número de células anormales sobre la superficie del cérvix y pueden ser referidas como displasia leve que puede desaparecer en pocos meses sin tratamiento. Las lesiones de alto grado o HSIL están definidas por una mayor cantidad de células precancerosas distintivamente muy diferentes a las células normales. Tienen el potencial

de convertirse en células cancerosas e invadir los tejidos profundos del cérvix y son referidas como displasia severa o moderada (o CIN2, CIN3), o carcinoma cervical *in situ* (CIS) las cuales pueden ser reversibles con tratamiento. El carcinoma *in situ* es la lesión premaligna *limitada* al epitelio, sin la invasión de la membrana basal. Si invade la membrana basal se denomina cáncer cervical invasivo (ICC) que se clasifica en estadios del I (cáncer limitado al útero) al IV (el cáncer se ha diseminado a órganos distantes). El ICC se clasifica además en escamoso si está compuesto por células del epitelio escamoso o en adenocarcinoma cuando tiene elementos glandulares². Los tumores cervicales muy pequeños estadio I pueden ser tratados con una variedad de procedimientos quirúrgicos. En mujeres jóvenes que desean mantener la fertilidad, la cervicectomía radical elimina el cuello uterino con la subsiguiente anastomosis de la vagina superior hacia el cuerpo uterino. Los tumores cervicales más grandes confinados al cuello uterino pueden ser tratados con resección quirúrgica, o con radioterapia o su combinación basada en cisplatino. El tratamiento de la enfermedad recurrente o metastásica es insatisfactorio debido a la relativa resistencia de estos tumores a la quimioterapia y a los fármacos biológicos disponibles en la actualidad.

Las vacunas existentes contra el HPV tienen efectos profilácticos potentes, pero no efectos terapéuticos. Ambas vacunas son altamente inmunógenas. Las vacunas aprobadas incluyen las proteínas recombinantes L1 y L2 de los HPV 16 y 18. Tienen una protección parcial contra otros tipos de HPV, a pesar de que las mujeres vacunadas aún están en riesgo de infección por otros tipos de HPVs, ya que se han reportado infecciones por multigenotipos³. Hasta la fecha se han aprobado un producto cuadrivalente que contiene los tipos de HPV 6, 11, 16 y 18 y un producto bivalente que contiene a los tipos del HPV 16 y 18. El *Advisory Committee on Immunization Practices* (ACIP) de los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recomienda aplicar la vacuna anti-HPV en forma sistemática a las niñas y mujeres jóvenes de 9 a 26 años. Se contempla además vacunar a los niños lo que contribuiría al concepto de inmunidad de rebaño^{4,5}.

PAPILOMAVIRUS (HPV)

Los papilomavirus infectan las mucosas y los queratinocitos de la piel. Más de 120 genotipos de HPV han sido reportados y se agrupan en alto riesgo u oncogénicos (hr-HPVs) y bajos riesgo (lr-HPVs) según su capacidad de formar tumores; los no oncogénicos son productores de verrugas benignas. Más del 95% de los cánceres cervicales son asociados a la infección persistente y a la integración de los HPV de alto riesgo. Entre los principales

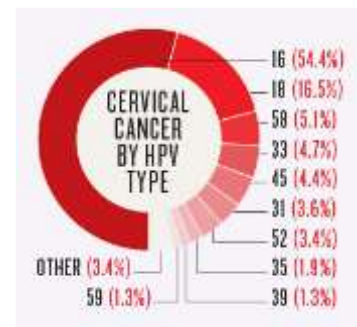


Figura 4: Genotipos de HPV y su contribución al desarrollo de cáncer cervical ³.

genotipos de hr-HPVs se encuentran el HPV 16, -18, -31, -33, -45 y -58, siendo el HPV 16 el de mayor prevalencia, ya que es encontrado en más del 60% de los cánceres cervicales en el mundo (Fig.4); también se asocian con los tumores anogenitales y al 25% de los cánceres orales. ^{6, 7, 8} Los HPV oncogénicos deben su actividad a los productos de los genes tempranos E6 y E7 requeridos para el desarrollo de las lesiones precursoras de cáncer y para el mantenimiento del fenotipo maligno de las células cancerosas.

Los HPV son virus sin envoltura, contienen un genoma de DNA circular bicatenario con aproximadamente 7 900 pares de bases y codifican ocho marcos de lectura abierta (ORF); su expresión es diferencial durante la diferenciación del queratinocito ⁹. Las proteínas tempranas E1, E2, E5, E6, E7 están implicadas en el control transcripcional y la replicación del ADN viral. Las tardías o estructurales L1, L2 se encargan del ensamblaje de las partículas virales. La replicación del HPV se inicia con la infección de las células basales (Fig. 5). A medida que se desarrolla la diferenciación celular, el DNA del HPV se replica y es transcrito. Finalmente, los viriones se ensamblan en el núcleo y se liberan con la descamación de los queratinocitos ¹⁰. En los núcleos de las células infectadas por lr-HPVs el DNA está en episomas mientras que, en las displasias graves y los cánceres, el DNA del HPV está integrado al genoma de la célula. La integración del

genoma viral en el genoma celular interfiere con la regulación normal de la expresión E6/E7 debido a la interrupción del control transcripcional mediado por la proteína viral E2.

Esto conduce a una regulación positiva de E6 y E7, que interactúan con las vías importantes de señalización que

llevan al descontrol del ciclo celular y a la proliferación viral. Se necesita la expresión de las proteínas E6 y E7 para que aparezca y persista el estado de transformación en los cánceres cervicouterinos y las líneas celulares derivadas de ellos⁴.

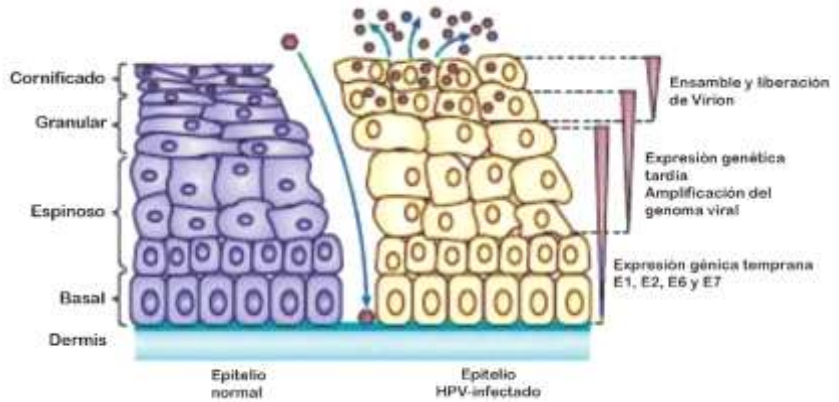


Figura 5: Ciclo viral del HPV. El HPV infecta a los queratinocitos de la capa basal del epitelio expuesto. El genoma viral se establece en el núcleo como episoma y los genes tempranos (E6 y E7) son expresados. Después de la división celular una célula hija migra lejos del estrato basal y se diferencia.

¿COMO EL HPV PUEDE LLEVAR AL CÁNCER?

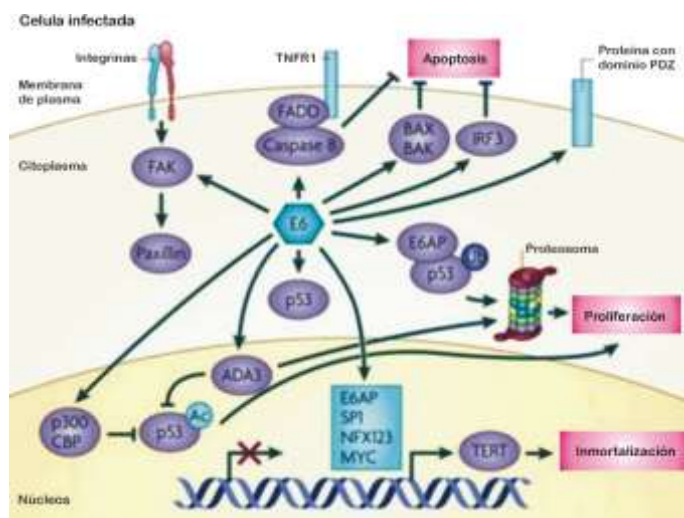


Figura 9: Oncogén E6 y las vías de señalización que afecta. Modificado de Moodv et al 2010

La expresión de las oncoproteínas promueve la transformación neoplásica por alteración en la expresión o interfiriendo con la función de las proteínas involucradas en la proliferación celular y en la apoptosis^{11,12}. E6 se une a la proteína asociada a E6 (E6AP) formando un

complejo E6-E6AP que media la degradación dependiente de ubiquitina de p53 (Fig. 9). La unión

con E6AP, además estabiliza a E6¹³. Aunque esta habilidad claramente contribuye a su potencial oncogénico, E6 tiene actividades biológicas adicionales que parecen ser independientes de p53. E6 interactúa con: a) proteínas involucradas en la regulación de la replicación del DNA como p300/CBP, IRF-3, hMcm, y ADA3 que evita la acetilación de p53 inhibiendo la transcripción de genes de respuesta a p53 ; b) proteínas involucradas en la organización epitelial y diferenciación como paxilina, E6BP/ERC-55, zyxina, fibulina; c) proteínas involucradas en la adhesión celular , polaridad y control de la proliferación que contienen dominios PDZ como Hdlg, hScrib, MAGI-I, MAGI-2, MAGI-3 lo que conduce a la pérdida de la polaridad celular e induce hiperplasia; d) proteínas involucradas en la reparación del DNA como XRCC1 y 6-O-metilguanina-DNAmetiltransferasa ; e) la interacción de E6 con SP1, MYC, NFX123 y E6AP activan a la telomerasa (TERT), una transcriptasa reversa que evita el acortamiento de los telómeros en respuesta a la proliferación persistente y a su vez promueve la inmortalización.

El complejo E6-E6AP tiene además de p53, varios blancos pro apoptóticos que son enviados a degradación proteosómica incluyendo a Bak, FADD y TNFR1 evitando la transmisión de la señal apoptótica vía receptores^{14,15}. Los Ir-HPVs como el HPV 6 y 11 también marcan a Bak para degradación proteosómica ¹⁶. E6 también interactúa con la procaspasa 8 a través de sus dominios efectores de muerte (DEDs) mediando también su degradación. Survivina, una de las proteínas inhibidoras de la apoptosis, fue identificada como un blanco indirecto de E6, el cual regula positivamente su promotor.

Los genes virales codifican transcritos de ARNm policistrónicos y son sujetos de *splicing* alternativo¹⁷. En el caso concreto del bicistrón E6/E7 del HPV 16, contiene el intrón 1, con un sitio dador y tres sitios aceptores de *splicing*, se generan cuatro transcritos alternativos a partir del pre-mRNA de E6/E7 (Fig. 6): RNA E6/E7 sin madurar, el cual es la única fuente de E6 y la mayor fuente de E7¹⁸; E6*I/E7 y E6*II/E7 que

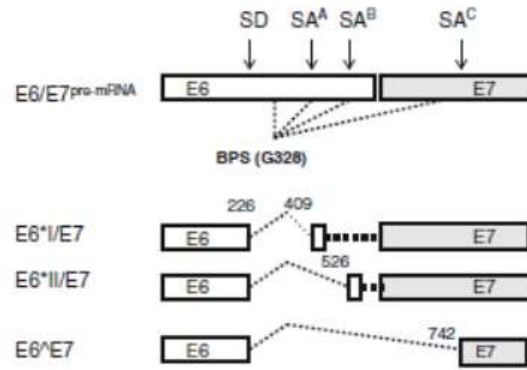


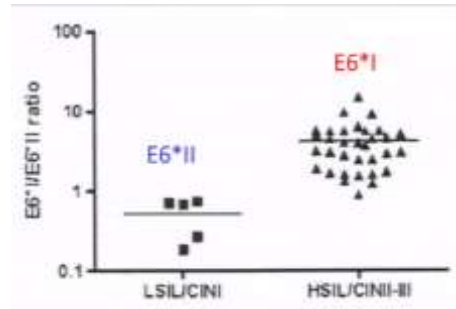
Figura 6: Organización genómica de los genes HPV-16 E6/E7. El Intrón 1 tiene un sitio donador de *splicing* (SD) en nt 226 y tres sitios aceptores en nt 409 (SA^A), 526 (SA^B) y 742 (SA^C).

codifican las formas cortas E6*I y E6*II respectivamente y E7 ; y un transcrito menor llamado E6^E7 el cual está formado por el marco de fusión del extremo terminal 5' de E6 y el extremo 3' terminal de E7. E6*I/E7 es la forma más abundante y E6^E7 la menos. Estas formas alternativas de *splicing* se han observado expresadas heterogéneamente en muestras de cáncer de cérvix y en líneas celulares. Esto se debe al reconocimiento diferencial de los sitios de *splicing* por distintos factores celulares. Cabe destacar que estos productos de *splicing* podrían tener un papel distintivo en el desarrollo del cáncer, aunque no ha sido estudiado a profundidad.

Se ha encontrado una asociación significativa entre la elevada expresión de la oncoproteína E6 y el grado de CIN demostrando el rol de E6 en la carcinogénesis¹⁹ (Fig. 7) . Interesantemente los grados de las lesiones cervicales se han asociado distintivamente con la presencia de los transcritos alternativos del oncogén E6. Por lo que la detección de transcritos podría servir como identificador de factores de riesgo. Desde hacen varios años se sugirió que E6*I podía tener un rol crítico en el desarrollo y mantenimiento del

Figura 7: Correlación entre el grado de lesión cervical y E6*I/E6*II en muestras de cáncer de cérvix positivas a ambos transcritos. ¹⁵

carcinoma cervical ²⁰. En la actualidad, E6*I se asocia a HSIL (CIN II-III) y E6*II se encuentra mayormente en LSIL (CIN I) ²¹⁻²³. Se ha sugerido que bajos niveles de E6*I en HSIL son indicativos de regresión a CIN I²⁴ y que E6*II retarda la progresión de CIN por interacción



con proteínas o por reducción concomitante de E6*I (y E7) debajo de los niveles requeridos para la transformación ²³. La correlación entre el grado de lesión cervical y el estado físico del genoma viral es evidente. Cuando el DNA viral está como episoma en LSIL/CIN 1 hay mayor detección de mRNA E6*II y en HSIL/CIN2-3 donde está integrado además de episoma hay mayor detección de E6*I. ²¹ Hasta la fecha sólo un trabajo²⁵ con una cohorte pequeña de muestras, encontró expresión alta de mRNA E6*II en CIN 2 y CIN 3.

Las proteínas codificadas por estos transcritos cortos de E6 han sido recientemente reportados en ensayos *in vitro* ²⁶. Estas proteínas difieren en sólo cinco aminoácidos en el extremo carboxi-terminal (Fig. 8). La oncoproteína completa E6 tiene una secuencia que es sustrato de caspasas según CASBAH; se trata de la secuencia peptídica VYRD entre las posiciones 60-63, la cual es compartida con el factor de *splicing* SF ASF-2 ²⁷.



Figura 8: Secuencias de aminoácidos de E6. E6*I y E6*II. En color azul se denotan las secuencias que forman los dedos de zinc. La secuencia subrayada DFAFRD corresponde al sitio de unión de P53. En rojo, RE corresponde a los aminoácidos arginina 47 y ácido glutámico 48 (RE) mutados por ácido glutámico y fenilalanina(EF) respectivamente para anular el sitio dador de *splicing* y así obtener una proteína E6 completa. Estos cambios no afectan el sitio de unión a E6AP y P53 (Zanier et al, 2012). En celeste se indican los 5 aminoácidos de diferencia entre las proteínas cortas E6*II y E6*I.

APOPTOSIS

El origen del cáncer involucra la desregulación de la proliferación celular y la supresión de procesos apoptóticos llevando al establecimiento y crecimiento del tumor. Los organismos multicelulares emplean al menos dos mecanismos para la eliminación de las células excedentes o enfermas: la necrosis y la apoptosis. La necrosis puede ser disparada por la ruptura de la membrana plasmática y está acompañada de un proceso inflamatorio. Al contrario, la apoptosis involucra una muerte limpia en la cual la cromatina es condensada, el DNA se fragmenta formando vesículas llamadas cuerpos apoptóticos. Estos son rápidamente fagocitados por los macrófagos, y como resultado la célula desaparece sin ningún proceso inflamatorio.

En los mamíferos la apoptosis puede ser iniciada por 2 diferentes vías: 1) la extrínseca la cual es disparada por la ligación de los receptores de muerte y la subsecuente activación de la caspasa 8; y 2) la vía intrínseca la cual es iniciada por el estrés celular seguido de la activación de la caspasa 9 (Fig. 11). Cada una de estas vías converge en una fase ejecutora común que requiere

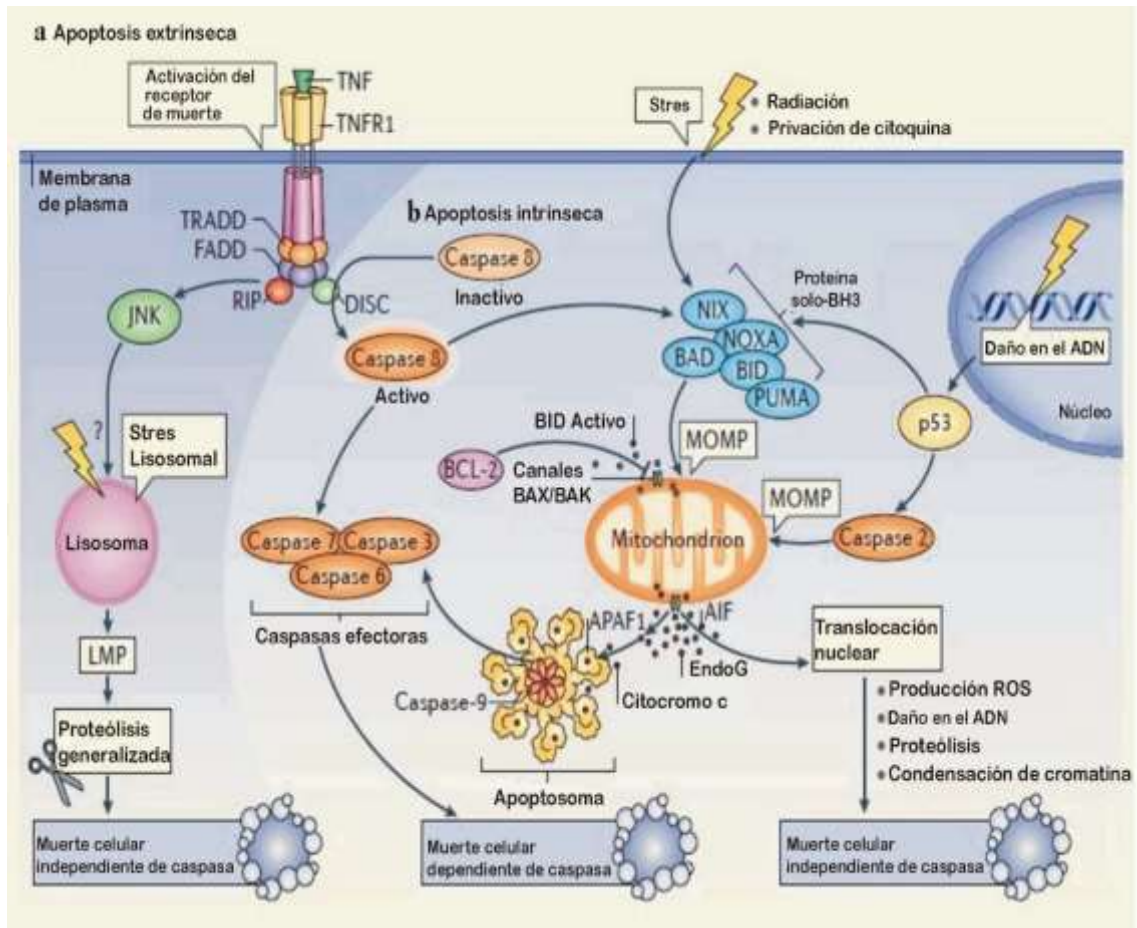


Figura 11: Vías de la apoptosis. A) Vía extrínseca. Es disparada en respuesta de la unión de los receptores de muerte (CD95, TNFR1, O TRAILR) con sus ligandos. Esto resulta en el reclutamiento de varias proteínas como FADD, TRADD y la procaspasa-8 que forman un complejo de señalización inductor de muerte o DISC que activa a la caspasa 8. La caspasa 8 proteolíticamente activa a caspasas efectoras y a Bid con lo cual coactiva la vía intrínseca. B) Vía intrínseca. Luego de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, se libera el citocromo c activando el ensamble del apoptosoma, un complejo formado por Apaf-1 y la caspasa 9. Allí la caspasa 9 es activada y activa proteolíticamente a las caspasas efectoras. Las proteínas solo BH3 pueden ser modificadas postraduccionalmente o movilizadas de sus compartimentos subcelulares en respuesta a p53 y provocar la MOMP. El daño al ADN estimula, la transactivación de genes que codifican proteínas proapoptóticas como PUMA y NOXA y, la activación de la caspasa 2 de una forma p53 dependiente. La caspasa 2 puede entonces inducir MOMP o activar a la caspasa 3. Entre las proteínas que son liberadas de la mitocondria después de la MOMP, AIF y EndoG pueden promover una muerte celular independiente de las caspasas, lo cual puede ser también debido a la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) con la liberación de catepsinas en el citoplasma. Las catepsinas pueden disparar la MOMP y la vía intrínseca de la apoptosis. Modificado de Nature Reviews, Mariño et al, 2014.

de la activación proteolítica de las caspasas 3 y 7. Bioquímicamente la principal característica de

la apoptosis incluye la activación de la cascada de caspasas y la fragmentación del DNA.

Los receptores que disparan la vía extrínseca están localizados en la membrana celular y son activados por ligandos extracelulares. Los receptores de muerte de la familia del receptor de TNF (TNFR) incluyen TNFR1, Fas o CD95, DR3/WSL y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL/Apo-2L) TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5. Los miembros de esta familia están caracterizados por presentar de dos a cinco copias de un dominio extracelular rico en cisteína y un dominio intracelular en el extremo carboxilo terminal denominado dominio de muerte. El miembro de los receptores de muerte más estudiado es el CD95 o Fas, conocido como

el guardián contra la autoinmidad y la tumorigénesis. La trimerización, del CD95 tras la unión de su ligando, FasL, es requerida para la transducción de la señal extrínseca apoptótica. Un complejo de proteínas se asocia con el CD95 activado. En este complejo de señalización inductor de muerte o DISC, primero se une la proteína adaptadora FADD a través de su dominio de muerte

al dominio de muerte del CD95. FADD también presenta un dominio efector de muerte (DED) y de nuevo por interacciones homólogas, recluta en el DISC la procaspasa-8 (o FLICE) que contiene un DED. La procaspasa-8 es activada por medio de proteólisis inducida por proximidad y es liberada del DISC al citoplasma formando un heterotetrámero con dos subunidades pequeñas y dos grandes²⁸. La caspasa-8 procesa a las caspasas efectoras 3 y 7 activándolas lo que resulta en la muerte

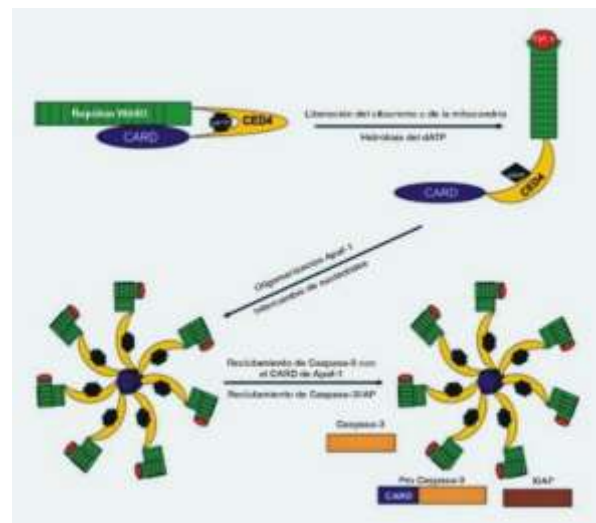


Figura 12. Formación del apoptosoma. Apaf-1 se encuentra en el citosol como un monómero inactivo, previo a la liberación del citocromo c de la mitocondria. Después de ser liberado, el citocromo se une a Apaf-1 induciéndole un cambio conformacional, y permitiendo la hidrólisis del ATP

celular. Las caspasas efectoras actúan específicamente sobre el DNA, proteínas del citoesqueleto y diversas proteínas reguladoras. La inhibición de esta ruta es realizada por proteínas que contienen dos DED y que se unen al complejo CD95-FADD. Esto inhibe el reclutamiento y la activación de la caspasa-8, antiguamente conocida como FLICE, de ahí el nombre de proteínas inhibidoras de FLICE (*FLICE-inhibitory proteins, FLIP*)^{29,30}. Las caspasas efectoras pueden ser activadas además de las caspasas iniciadoras, por proteasas no caspasas como las catepsinas, calpaínas y granzimas. El cáncer cervical es resistente a la apoptosis inducida por FasL, TRAIL y TNF α .^{14,15} La vía intrínseca o vía mitocondrial es activada por una variedad de estímulos por estrés extra e intracelular, incluyendo el estrés oxidativo, por radiaciones γ , UV o calor, daño del DNA, por acción de algunas oncoproteínas y genes supresores de tumores, pérdida de adherencia a la matriz extracelular, privación de factores de crecimiento, factores de virulencia virales, y por tratamiento con drogas citotóxicas como agentes quimioterápicos. La vía mitocondrial es mediada por la inserción de Bax/Bak en la membrana mitocondrial, permeabilizándola con la subsecuente liberación del citocromo c del espacio intermembranal al citosol. Miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bcl-2 y Bcl-XL evitan la liberación del citocromo c, presumiblemente por unión e inhibición de Bax and Bak. Proteínas BH3 como Bid y Bim contribuyen a la función proapoptótica de Bax o Bak induciendo la homo-oligomerización de estas proteínas³¹. Por lo tanto, el punto clave de la vía intrínseca de la apoptosis reside en los miembros proteicos de la familia Bcl-2 que controlan la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (MOMP) y la liberación del citocromo c. Por tanto, la mitocondria debe reconocerse no sólo como un organelo con funciones vitales en el metabolismo intermediario y en la fosforilación oxidativa, sino también como una estructura reguladora central del proceso apoptótico. En el citosol, el citocromo c promueve la oligomerización de Apaf-1, lo que lleva al reclutamiento y activación de la caspasa 9 en una gran plataforma llamada apoptosoma^{32, 33} (Figs. 11 b y 12). Una vez activada la caspasa 9 escinde y activa a las procaspasas 3 y 7 las cuales ejecutan el programa de apoptosis. Un control

fin de la apoptosis intrínseca es la regulación del apoptosoma, cuya función está influenciada por los niveles de expresión de Apaf-1 y la caspasa 9, ambas disminuidas en varios tipos de tumores ³⁴.

CASPASA 9

La caspasa 9 es esencial para eliminar células en estadios tempranos del desarrollo como

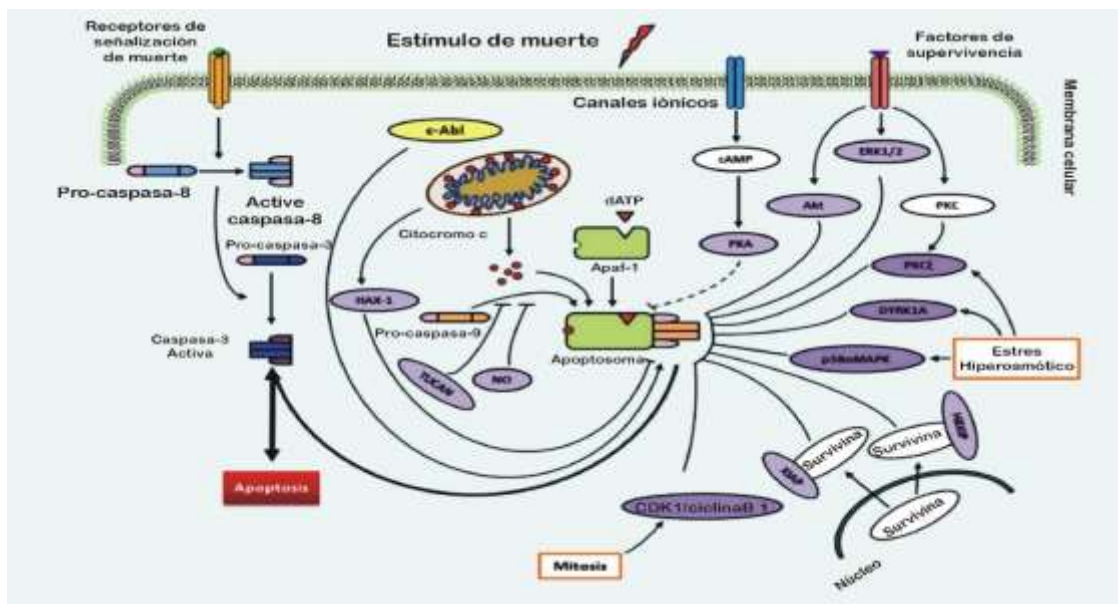


Figura 13. Regulación de la caspasa 9 por reguladores endógenos en distintas vías de señalización. La permeabilización de la membrana mitocondrial externa es iniciada por proteínas proapoptóticas que contienen un dominio BH3, en respuesta a una variedad de estímulos. La liberación del citocromo c de la mitocondria induce la formación del apoptosoma, complejo multimérico formado por Apaf-1 y la procaspasa 9. El reclutamiento de la caspasa 9 al apoptosoma es inhibido por TUCAN y por PKA. HAX-1 puede inhibir la activación de la caspasa, suprimiendo la apoptosis en las células cardíacas. La fosforilación directa de la Thr125 a través de señales de crecimiento y supervivencia por ERK1/2, durante la mitosis por CDK1-Ciclina B1, luego del estrés hiperosmótico por p38αMAPK, PKCε y DYRK1A (también durante el desarrollo) inhiben la actividad de la caspasa 9. Akt suprime la actividad de la caspasa 9 y también es indispensable para inhibir desórdenes proliferativos a través de la continua remoción de células dañadas a lo largo de la vida. La caspasa 9 es el blanco de reguladores endógenos en distintas vías de señalización. Hay reguladores que bloquean su unión al apoptosoma, otros

que impiden su procesamiento como las modificaciones postraduccionales y otros que impiden que actúe, estando ya activa (Fig. 13).

Factores como falta de ATP puede inhibir la interacción entre Apaf-1 y el citocromo c. El reclutamiento de la procaspasa 9 al apoptosoma es antagonizado por TUCAN³⁵. HAX-1 puede inhibir la activación de la caspasa 9. La caspasa 9 es el blanco de múltiples cinasas que responden a señales extracelulares, estrés celular o que son activadas durante el ciclo celular (Fig.14). La

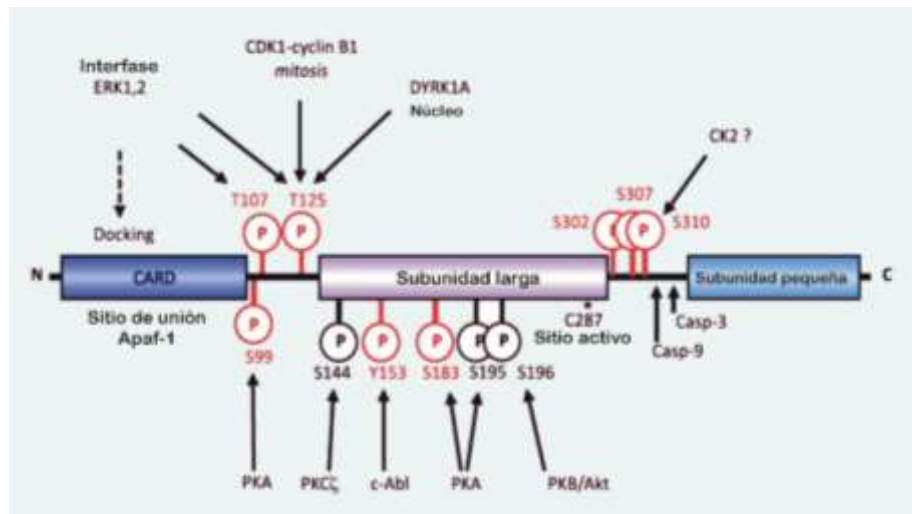


Figura14: Estructura de la caspasa 9. La caspasa 9 es fosforilada en múltiples sitios. En el diagrama se muestra la representación lineal de la procaspasa 9 haciendo énfasis en los sitios de fosforilación y sus respectivas proteincinasas. Los sitios conservados entre las caspasas 9 humana y la de ratón se observan en rojo y los que no en negro. Los sitios de escisión en la región de unión entre las subunidades larga y fosforilación en el sitio altamente conservado Thr 125, se cree que funciona como una "dominante negativa" que impide el reclutamiento al apoptosoma de la caspasa 9 no fosforilada³⁶. Sin embargo, el exacto mecanismo de la inhibición debido a la fosforilación en Thr 125 permanece sin aclararse. La Thr125 es un punto de integración de varias vías de señalización como ERK1/2 (señales de crecimiento, supervivencia) y CDK1/ciclinaB1 (en mitosis). La fosforilación de Thr125 muestra una regulación temporal durante el ciclo celular, estableciendo una conexión directa entre éste y la vía intrínseca de la apoptosis. La fosforilación inhibitoria de la caspasa 9 puede

jugar como un umbral variable para la activación de las caspasas y subsecuentemente la apoptosis durante el ciclo celular. Este umbral podría frenar la apoptosis en respuesta a señales generadas durante estadios específicos del ciclo celular³⁶. DYRK1A, una cinasa nuclear que también fosforila la Thr125 de la caspasa 9 en respuesta al estrés hiperosmótico, se cree que participa en su regulación nuclear³⁷. Otras cinasas que inhiben su actividad son PKC ξ , PKA y Akt. La PKC ξ fosforila a la caspasa 9 en S144 frenando la apoptosis, también en respuesta al estrés hiperosmótico. La PKA bloquea el reclutamiento de la caspasa 9 al apoptosoma comprometiendo la oligomerización con Apaf-1, aunque no está claro cuál es el mecanismo exacto. Interesantemente, PKA puede también fosforilar a Apaf-1 *in vitro*³⁸.

Akt/PKB suprime la activación de la caspasa 9 en respuesta a señales de crecimiento y supervivencia. Akt fosforila a la caspasa 9 en la Ser 196³⁹. La Ser 196 es un sitio que no está conservado en todas las especies, por ejemplo no existe en los roedores⁴⁰. La fosforilación de Akt sobre la S196 fue el primer reporte de fosforilación de la caspasa 9³⁹. Aunque el papel biológico de la señalización p-Akt/p-caspasa 9 no está claro, se sugiere que la elevada expresión de la p-caspasa 9 podría constituir un posible mecanismo de resistencia a la apoptosis mitocondrial. En contraste con las anteriores fosforilaciones inhibitorias en Thr125, S144 y S196, la fosforilación de Tyr153 por c-Abl tirosina cinasa hasta el momento, es la única fosforilación que estimula la activación de la caspasa 9, en respuesta a arabinósido (AraC) un inhibidor de la replicación del DNA⁴¹. Además, con un inhibidor de c-Abl se evita el procesamiento de la caspasa 9 inducido por daño al DNA.

La actividad enzimática de la caspasa 9 es inhibida por XIAP, quien media además su ubiquitinación y degradación por el proteosoma⁴². Las interacciones de XBIXP y XIAP bloquean la actividad de la caspasa 9 a través de distintos mecanismos. XIAP y la caspasa 9 forman un complejo bloqueando la dimerización de la proteasa, a través del dominio BIR3 de XIAP y del

nuevo dominio N-terminal de la subunidad pequeña de la caspasa 9 ^{43,44}. El complejo Survivina-HBXIP se une a la procaspasa 9 impidiendo su reclutamiento al apoptosoma por Apaf-1. Este mecanismo selectivamente impide la apoptosis disparada vía mitocondrial⁴⁵. La nitrosilación de la caspasa 9 por el dador de NO sugiere una inhibición del procesamiento ⁴⁶.

Como se mencionó anteriormente, no sólo modificaciones postraduccionales regulan la caspasa 9. Hasta la fecha se han identificado tres microRNAs (miRNAs) que suprimen la activación de la caspasa 9, bloqueando la apoptosis mitocondrial: miRNA-582-5p ⁴⁷, miRNA-24a⁴⁸ y miRNA-23a⁴⁹. Estas pequeñas moléculas de RNA no codificantes (miRNAs) además, regulan otros importantes procesos celulares como el desarrollo y la diferenciación.

CASPASA 9 ISOFORMA β :

El *splicing* alternativo juega un papel muy importante en la apoptosis, algunas proteínas que participan presentan variantes de *splicing*, y pueden tener papeles opuestos en la apoptosis. El *splicing* de la caspasa 9 genera al menos 3 variantes, las cuales son generadas por la inclusión o exclusión del cassette de los exones 3,4,5 y 6 o por acortamiento del primer exón⁵⁰ (Fig. 15).

En este último caso, se genera la isoforma 4 con un extremo amino-terminal más pequeño, al iniciarse la traducción en un codón de inicio que no es el canónico. Las otras isoformas generadas son la caspasa 9 α o 9L o isoforma canónica y la caspasa 9 β o 9S (s=short). La isoforma β contiene los primeros 139 residuos del prodominio fusionados en marco a los 127 últimos residuos de la subunidad pequeña y a la región bisagra; esta isoforma pierde completamente la subunidad larga (residuos 140-289) la cual contiene el sitio activo (QACGG). Su peso molecular es de 30.1 kDa. Se ha sugerido que la caspasa 9 β puede establecer un umbral que regula la activación de la caspasa 9 α previniendo la formación espontánea del apoptosoma. Funcionaría como un "seguro" ya que entre las isoformas podrían formarse heterodímeros⁵¹.

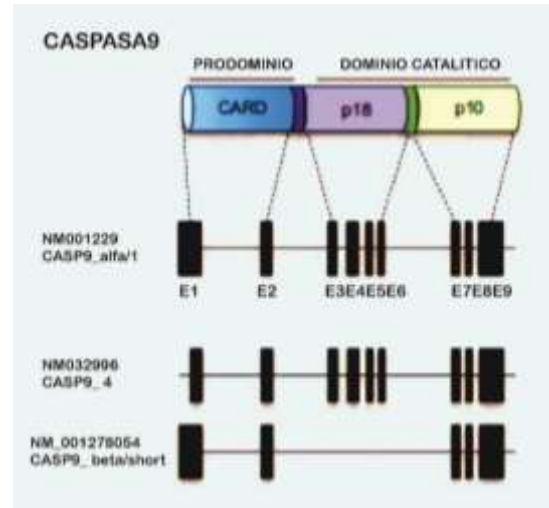


Figura 15: Variantes de *splicing* de la caspasa 9. La caspasa 9 está estructuralmente formada por un dominio CARD y dos dominios catalíticos p18 y p10 los cuales forman el tetrámero activo. La variante NM001229 (alfa o canónica o 1) codifica para la isoforma más larga, la caspasa 9 α de 416aa y 46 kDa; la variante 4 o NM032996 pierde una porción de 5'UTR y codifica una isoforma que tiene el extremo amino-terminal más corto (pierde los aa 1-83) , la isoforma 4 con 333 aa y 36 kDa; la variante NM 001278054 (β o short o 2)pierde el cassette con los exones 3,4,5,y 6 y codifica para la isoforma β o S con 266 aa y 30 kDa. Otra isoforma, no mostrada en el gráfico, es la 3 o

Varios factores están involucrados en el *splicing* alternativo de la caspasa 9 incluidos las ceramidas endógenas, SRSF1(SRp30a o ASF/SF2), hnRNP L y hnRNP U⁵². La síntesis de ceramidas, SRSF1 y hnRNP U promueven la inclusión del cassette de cuatro exones para formar la caspasa 9 α . En contraste, la activación de hnRNP L, por fosforilación de Akt, favorece el *splicing* de la isoforma β (Fig. 16). El factor hnRNP U compete con hnRNP L por la unión al exón 3 para potenciar la inclusión del cassette. La fosforilación de hnRNP L por Akt no es exclusiva, ya que Akt también fosforila *in vitro* directamente a SRSF1⁵³.



Figura 16: A) Modelo de la regulación de hnRNP U/L C9/E3 por fosforilación. Mientras la fosforilación de hnRNP L aumenta la asociación entre hnRNP L y C9/E3, la fosforilación de hnRNP U atenúa su unión al C9/E3. B) hnRNP L es fosforilado y activado por Akt promoviendo la exclusión del cassette de 4 exones, lo que favorece el esplicing de la variante β de la caspasa 9 con función antiapoptótica. Modificado de Yu et al

La caspasa 9 β compete equitativamente con la procaspasa 9 α por la unión de Apaf-1 e interfiere en su activación actuando como una dominante negativa ⁵¹. La isoforma β actuaría de modo similar a FLIP (FLICE-inhibitory protein) quien actúa sobre la procaspasa 8. En células MCF-7 ^{51,54} la caspasa 9 β fue capaz de inhibir la apoptosis disparada por estímulos tanto de la vía intrínseca como extrínseca (Fas Ab, TNF, TRAIL, Bax, Blk, luz UV). La caspasa 9 β está desregulada en los astrocitomas⁵⁵ y en varios subtipos de los NSCL en donde los hace resistentes a la quimioterapia por erlotinib⁵⁶. De modo que la sobreexpresión de esta isoforma puede contribuir al incremento de la resistencia en la apoptosis.

AUTOFAGIA

La autofagia se lleva a cabo a nivel basal para mantener la homeostasis de las células, eliminando organelos y proteínas dañadas. Se dispara por condiciones fisiológicas como la

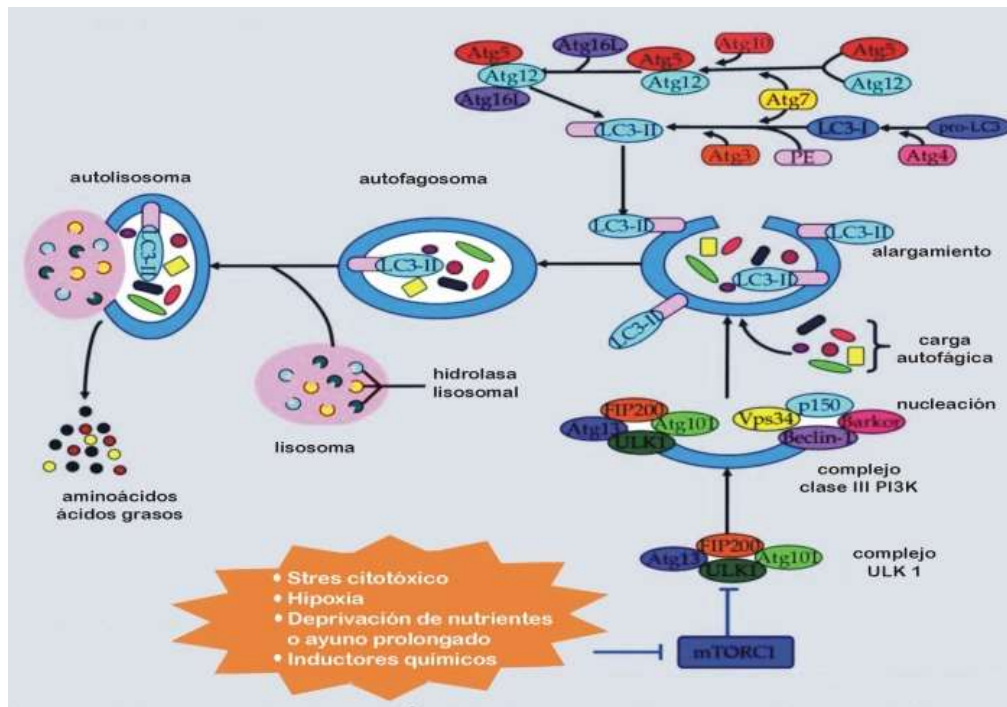


Figura 17: Vía autofágica. Cuando hay suficientes nutrientes en la célula el complejo 1 de mTOR (mTOR C1) suprime la autofagia a través de una interacción directa con el complejo ULK1. En cambio, en condiciones de ayuno, mTOR es inhibido y disociado del complejo. La proteína ULK1 se activa y fosforila a sí misma, además de fosforilar a Atg 13 y FIP200. Esto es primordial para que se inicie la autofagia. MAPK puede activar a ULK1 fosforilándola en Ser 317 y Ser 777. ULK1 promueve la formación del siguiente complejo llamado PI3K, a través de la fosforilación de AMBRA (molécula activadora de proteína 1 que regula a Beclina 1). El complejo PI3K participa en la nucleación y elongación del fagóforo inicial en donde Beclina 1 funciona como una plataforma de unión de varios factores como Barkor (regulador clave asociado a Beclina 1), p150 y UVRAG. Los siguientes pasos de elongación requieren reacciones de ubiquitinación. Atg 12 se une a Atg 5 y se transfiere a Atg 7, Atg 10, LC3 (formándose la conjugación Atg 9 de la proteína)

deprivación de nutrientes o ayuno prolongado y en respuesta a estímulos de estrés, las radiaciones o por compuestos farmacológicos citotóxicos⁵⁷. Es un proceso dinámico regulado en tres pasos: 1) nucleación y expansión de una estructura de doble membrana asilada llamada fagóforo, 2) formación de autofagosomas y 3) la fusión de autofagosomas con lisosomas formando los autolisosomas, donde la carga capturada es degradada por hidrolasas para ser reciclada (Fig. 17). Cada paso de este proceso dinámico puede ser seguido mediante el uso de

marcadores específicos. En el paso inicial son usados anticuerpos contra las proteínas Beclina 1 y Atg 5; para la formación de los autofagosomas y su maduración se utiliza LC3 y para observar si hay degradación en los lisosomas se usa la proteína 2 asociada a la membrana lisosomal (LAMP-2).

La autofagia tiene funciones paradójicas en los tumores^{58,59} y las investigaciones acerca del tema son contradictorias. La autofagia promueve el crecimiento de los tumores durante su desarrollo⁶⁰ pero además, ha sido relacionada con la promoción de la muerte celular e involucrada en mecanismos supresores de tumores⁶¹ y en la quimiorresistencia⁶². En el caso puntual del cáncer de cérvix, el bloqueo de la autofagia sensibiliza a las células a la quimioterapia con cisplatino⁶³. Una concentración no tóxica de cisplatino (15 μ M) induce autofagia en líneas celulares de cáncer cervical (HeLa y CaSki) por lo que se ha propuesto el uso de inhibidores de la autofagia como adyuvantes en el tratamiento⁶⁴.

Beclina 1 regulador clave de la autofagia se encuentra sobreexpresada en el cáncer gástrico y en líneas celulares derivadas⁶⁵, como también en la línea celular de cáncer de cérvix CaSki, inhibiendo la proliferación debido a un desbalance entre la expresión de las proteínas Ang-1, Ang-2 y Tie-2⁶⁶. Sin embargo, en el carcinoma cervical, Beclina 1 y LC3 se expresan menos que en epitelio normal cervical, de aquí se infirió que niveles bajos de expresión favorecerían la carcinogénesis. Esto correlaciona con la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR por HPV, lo que inhibe la autofagia⁶⁷. Y no correlaciona con otra investigación en donde se observa una respuesta autofágica en queratinocitos ante una infección por HPV⁶⁸.

Autofagia y apoptosis están relacionadas existiendo un balance entre ellas (Fig. 18). Hay proteínas de la vía autofágica que son procesadas por las caspasas y hay caspasas (como la 8) que son degradadas por vía autofágica. La membrana del autofagosoma sirve como una plataforma para formación del DISC intracelular y el autoprosesamiento y activación de la caspasa

8. La asociación de FADD con Atg12-Atg5 y además la proteína adaptadora p62 facilitan el reclutamiento de la caspasa 8 a la membrana del autofagosoma⁶⁹. Por otro lado, la caspasa 8 procesa a Atg 3, componente crítico para la formación del autofagosoma. Por lo que la caspasa 8 participa en el punto crítico de la inactivación de la autofagia, cuando la apoptosis ha sido disparada a través de los receptores de muerte ⁷⁰. Por su parte la caspasa 9 facilita la formación del autofagosoma promoviendo la conversión de LC3 gracias a la interacción con Atg 7, en su dominio C terminal. Esta interacción podría interferir con el reclutamiento de la caspasa 9 al apoptosoma y su siguiente procesamiento y activación⁷¹.

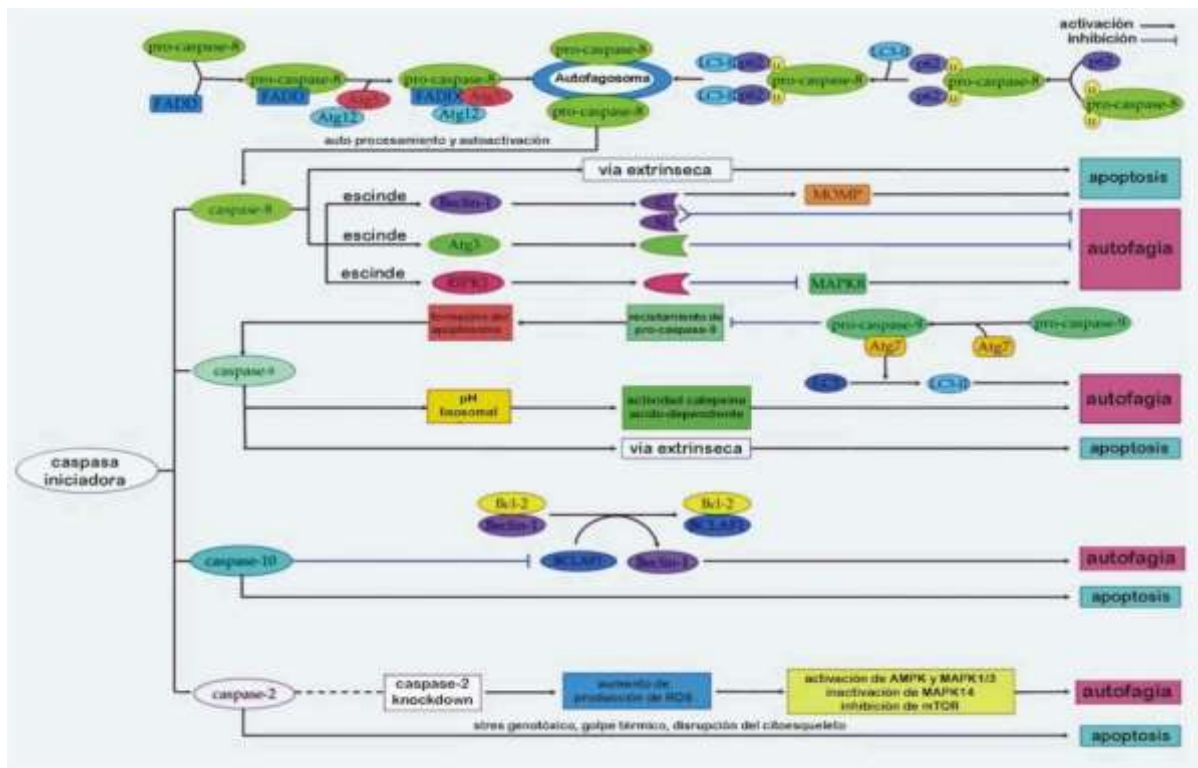


Figura 18: Interacción de proteínas implicadas en las vías de la apoptosis y de la autofagia. Ver el texto para más detalles. Modificado de Haijian Wu et al. 2014

La caspasa 10, homóloga de la caspasa 8, mantiene la autofagia en células de mieloma. El factor de transcripción asociado a Bcl-2 (BCLF1) un potente inductor de autofagia, que desplaza a Beclina 1 de la interacción con BCL-2, es procesado e inactivado por la caspasa 10⁷². Beclina 1 y Atg4D son sustratos de caspasa 3; caspasa 6 también tiene como sustratos a Beclina 1 y a Atg

5, Atg 3 y p62⁷³ y la caspasa 7 a Atg 16L⁷⁴. Se cree que la caspasa 2 participa también en la autofagia, aunque no está bien dilucidado el mecanismo. En fibroblastos de ratón que no tienen caspasa 2 se evidenció un aumento de la autofagia⁷⁵.

PI3K/Akt/mTOR Y CANCER DE CERVIX

La activación de los GFRs (por ejemplo, FGFR, IGF-1R) dispara la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR, involucrada también en el control de la síntesis de macromoléculas, metabolismo, crecimiento, y supervivencia. Además, es considerada la vía regulatoria central de la síntesis de proteínas ⁷⁶. PI3K induce la conversión del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃) el cual recluta factores hacia la membrana celular regulando las actividades de otras cinasas como Akt ⁷⁷. La fosfatasa PTEN regula la concentración de PIP₃, lo convierte en PIP₂ e inhibe su señalización. La actividad de PTEN o su sobreexpresión bloquea la vía PI3K/Akt, inhibiendo los mecanismos de supervivencia y, por lo tanto, los mecanismos de apoptosis son activados. Sin embargo, la transcripción de PTEN es dependiente de p53 ⁷⁸ el cual es abatido por acción del oncogen de E6 de HPV alto riesgo ⁷⁹, por lo que las células de cáncer cervical son resistentes a la apoptosis.



Figura 19. Isoformas de Akt, mostrando las diferencias en sus sitios de activación.

Akt o PKB es un factor clave en muchos tipos de cáncer. La activación de Akt, dependiente de fosforilaciones, se ha demostrado que contribuye a la resistencia a la quimioterapia y ha sido asociada a un peor pronóstico en muchos tipos de cáncer, como el de mama, próstata, y de células pequeñas de pulmón. Esta es una proteína que presenta tres isoformas, Akt1, Akt2 y Akt3, siendo Akt1 (62 kDa) la canónica y a la que se hará mención en adelante como Akt (Fig. 19) ⁸⁰. Akt presenta tres dominios: un dominio PH (homólogo a plekstrina) mediante el cual une al PIP₃, que la ancla a la membrana citoplasmática; un dominio KD o catalítico y un dominio regulatorio hidrofóbico C Terminal, que posee un sitio de unión a ATP (Fig. 20)⁸¹. Las interacciones entre estos dominios son un regulador clave en las funciones de Akt. La estimulación de factores de

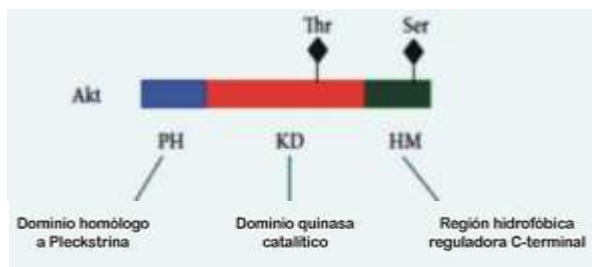


Figura 20. Estructura de Akt. Presenta tres dominios: un dominio PH u homólogo a plekstrina mediante el cual une a PIP₃ que la ancla a la membrana citoplasmática; un dominio KD o catalítico y un dominio regulatorio hidrofóbico C terminal que posee un sitio de unión a ATP. Esta estructura es común a las 3 isoformas, Akt1Akt2, Akt3. Akt1 está presente en todos los tejidos y es esencial para la supervivencia celular; Akt2 está principalmente en los tejidos muscular y esquelético

a la defosforilación de T308 y S473 ⁸². Las fosfatasa responsables de esto son: PP2A, PP1 y PHLPP, las cuales se han visto disminuidas en varios cánceres; PP2A es un blanco del oncogen E7 de HPV

83.

crecimiento induce cambios conformacionales en Akt y su traslocación a la membrana; el dominio PH asume una conformación "out" lo que facilita las fosforilaciones en las posiciones T308 y S473. Estas fosforilaciones, promueven que Akt sea "desprendida" de la membrana y dirigida a sus sitios blanco, en el citoplasma y en el núcleo. En su estado inactivo, el dominio PH asume una conformación "in" y su interacción con el dominio KD crea una cavidad que lleva

Akt es activada a través de dos fosforilaciones. Una cinasa llamada PDK1, localizada en la cara interna de la membrana citoplasmática por PIP3, fosforila el residuo T308. La identificación de una PDK2 fue controversial por muchos años y varios candidatos fueron propuestos ⁸⁴, pero estudios genéticos en ratón definieron el rol del complejo mTORC2 (*mammalian Target Of Rapamycin complex 2*) como la cinasa principal de la S473 ⁸⁵. Se cree que la proteína SIN1, a través de su dominio *PH-like*, localiza a mTORC2 en la membrana para fosforilar a Akt ⁸⁶. Se ha demostrado que la fosforilación de T308 es esencial y necesaria (no así en la S473) para la activación del otro complejo de mTOR, llamado mTORC1 (*mammalian Target Of Rapamycin Complex1*) ⁸⁷. El cual a su vez inhibe a mTORC2 ^{88, 89}. Por lo tanto, Akt constituye un nodo que integra los ejes de señalización de mTORC1 y mTORC2 (Fig. 21). Akt funciona río arriba de mTORC1, pero río abajo de mTORC2. mTORC1 puede ser inhibido por un macrólido antifúngico

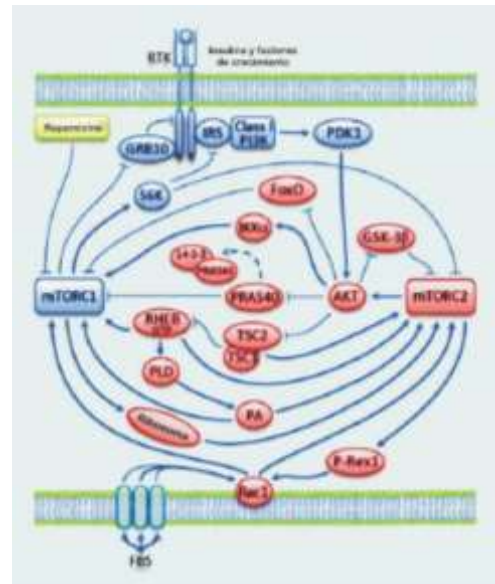


Figura 21: Complejos de mTOR: mTORC1 mantiene controlados diferentes reguladores río arriba de mTORC2, mTORC1 es a su vez un regulador negativo de mTORC2. Grb10 es un regulador esencial del cruce de las vías de estos dos complejos. Después de ser fosforilado por mTORC1 Grb10 inhibe la

llamado Rapamicina, el cual actúa como un inhibidor alostérico ⁹⁰. Aberraciones múltiples de la vía PI3K/Akt/mTOR han sido reportadas en el cáncer cervical, incluyendo la sobreexpresión de la PI3K ⁹¹, p-mTOR como sus efectores p70S6 cinasa(P70S6K) y el factor de iniciación 4EBP1. Por otro lado E6 induce la transcripción de eIF4E, en cáncer cervical ⁹². Sin embargo, el mecanismo específico por el que E6 lleva este efecto no se conoce. La activación de la vía P3K/Akt/mTOR es típicamente asociada con la expresión de proteínas virales de novo, con el objetivo de inhibir apoptosis y prolongar la infección⁹³. Proteínas tempranas como E5,E6,E7 HPV16 activan Akt y los

complejos de mTOR inhibiendo la apoptosis ^{94, 95, 83, 96}. Se ha observado que la expresión de E5 del HPV16 induce la dimerización de EGFR con la subsecuente activación de la vía PI3K/Akt ⁹⁴ y que se induce una rápida fosforilación de PTEN en la S380 inactivándolo. Además la activación de Akt es sensible a la inhibición específica de EGFR, indicando que la interacción del HPV16 con el EGFR inicia esta vía ⁶⁷. E6 HPV16 activa a Akt a través de PDK1 y mTORC2 en condiciones de privación de nutrientes ⁹⁶ por un mecanismo aún no dilucidado y la degradación de p53 por E6/E6AP, contribuye a sostener la actividad de mTORC1 . También hay reportes que muestran que E7 HPV16 puede activar a Akt mediante dos mecanismos: uno dependiente de p-Rb, causando la acumulación citoplasmática de p27 y la inducción de la migración celular ^{97, 95} ; y por otro independiente de p-Rb a través de la unión e inhibición de la fosfatasa PP2A ⁸³. Sin embargo, se ha reportado que la expresión de E7 no incrementa la traducción de proteínas, dependiente de cap ⁹⁶. En conclusión, el HPV 16 interacciona con vías de señalización importantes como lo es PI3K/Akt/mTOR favoreciendo la evasión de la apoptosis y la autofagia, la promoción de la transcripción y traducción viral, la proliferación y la infección prolongada.

Akt, IAPs Y CASPASAS

Las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) controlan la muerte celular, tienen influencia en vías de señalización, recambio de proteínas y en la progresión del ciclo celular. La unión de las IAPs a las caspasas evita la interacción con sus sustratos celulares y esto inhibe la degradación proteolítica de la célula, que marca la fase final ejecutora de la apoptosis. Akt también cumple un papel crucial en la regulación de la supervivencia de las células cancerosas, mediante la regulación positiva y específica de las IAPs ⁹⁸. Por ejemplo Akt está directamente involucrada en la regulación transcripcional y proteica de la expresión de cIAP1 ⁹⁸ en un modelo de cáncer endometrial donde la sobreexpresión de Akt, resultó en un aumento de la expresión de cIAP1. Akt evita la autoubiquitinación y degradación de XIAP estabilizándola por fosforilación

en S87 ⁹⁹. Por otro lado, XIAP promueve la actividad de Akt, ya que actúa como una E3 ubiquitín ligasa para PTEN. Esto se demostró mediante el silenciamiento de XIAP en donde se vio que disminuía la mono y poliubiquitinación de PTEN, incrementando sus niveles proteicos. La inhibición de XIAP y la subsecuente depleción de p-Akt tiene un efecto antitumoral a través de la atenuación de la supervivencia de las células cancerosas ¹⁰⁰. Se reportó que la supresión de XIAP por siRNA induce apoptosis y se inhibe la supervivencia estimulada por Akt en células de cáncer de ovario y de cérvix ^{101, 102}. En un modelo de estudio de cáncer de pulmón ¹⁰³ se observó que cIAP2 es regulada por E6 a través de la vía EGFR/PI3K/Akt. Previamente había sido reportado que cIAP2 es regulada positivamente por E6 a través de la vía del NF-κB en queratinocitos inmortalizados ^{104, 105}. El sitio promotor de cIAP2 presenta dos sitios de unión para NF-κB y uno para CREB quien es fosforilado por Akt activándolo. Si bien NF-κB es el regulador principal de la transcripción de cIAP2 ¹⁰⁶, p-CREB tiene un papel más importante en la inducción de cIAP2 por E6 en células de cáncer de pulmón, más que en células de cáncer de cérvix donde lo es NF-κB ¹⁰³.

Como se sabe la apoptosis está finamente coordinada por múltiples eventos de señalización, por ejemplo, la fosforilación directa de las caspasas; sin embargo, las cinasasa son sustratos de las caspasas activas. Por lo tanto, la ruptura de las cinasasa, mediada por las caspasas, puede acabar con la señal de supervivencia. Akt es funcionalmente inactivada por escisión de caspasa en respuesta a un gran variedad de estímulos apoptóticos como son la anoikis ¹⁰⁷ y la retirada de factores de crecimiento. Akt es escindida por la caspasa 3 en múltiples sitios lo que lleva a su inactivación por remoción de su dominio PH y/o de su motivo hidrofóbico en el extremo C-terminal, regiones que son críticas para la total activación de la cinasa ¹⁰⁸ (Fig. 22). Otro de los mecanismos por lo que se regula la apoptosis lo lleva a cabo una proteína

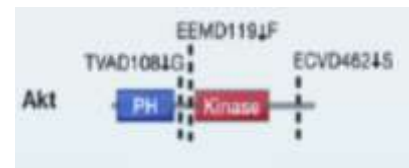


Figura 22: Sitios de escisión de Akt por la caspasa 3. Modificado

mitocondrial liberada ante un estímulo apoptótico, llamada SMAC/Diablo. En el citoplasma SMAC/Diablo se une a XIAP, cIAP1, cIAP2 ¹⁰⁹. No sólo antagoniza la capacidad de XIAP de inhibir a las caspasas, también causa la autoubiquitinación y degradación de cIAP1 y cIAP2 ^{110,111}.

Akt Y RESISTENCIA AL CISPLATINO

El cis-diaminodicloroplatino (CDDP) o cisplatino es una molécula inorgánica que ha sido aprobada para la terapéutica de tumores sólidos de vejiga, testículos, ovario, cérvix, pulmón y colon-recto. Es prácticamente inerte hasta que uno o dos de sus grupos cis-cloro son reemplazados por moléculas de agua. Esta hidratación ocurre espontáneamente en el citoplasma debido a la baja concentración de iones cloruro (2-10 mM comparados con los 100 mM del espacio extracelular). Las formas mono y dihidratadas del cisplatino son muy electrofílicas y por lo tanto son propensas a formar uniones con la metionina y también con péptidos y polipéptidos que contienen cisteínas, incluido el glutatión reducido (GSH) y las metalotioneínas. La interacción entre el cisplatino hidratado y los nucleófilos endógenos tiene como consecuencia la disminución en citosol de los equivalentes de reducción, lo que promueve que se establezca un estrés oxidativo, el cual directamente provoca el daño en el DNA ¹¹².

Después de la hidratación, el cisplatino se une con gran afinidad al DNA mitocondrial y nuclear. En particular, en el sitio nucleofílico N7 de las purinas favoreciendo la generación de complejos heterotípicos proteína-DNA y homotípicos intra e inter cadenas de DNA formando aductos, lo cual activa vías de señalización tales como ATR, p53, p73, y MAPK que culminan en la activación de la apoptosis ¹¹³. Es importante aclarar, que los efectos citostáticos y citotóxicos del cisplatino no representan sólo una mera consecuencia de su actividad genotóxica. Hay efectos citoplasmáticos que contribuyen a ella. Se destacan la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de óxido nítrico (NO), los cuales no sólo exacerban la genotoxicidad del

cisplatino, sino también ejercen efectos citotóxicos directos favoreciendo la apertura del complejo del poro de transición de la permeabilidad (PTPC) ¹¹⁴; la transducción de la señal que estimula la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (MOMP) vía BAK1 ,miembro proapoptótico de la familia Bcl-2; la activación de la reserva citoplasmática de p53 que es capaz de promover la MOMP por varios mecanismos ¹¹⁵.

Estas señales de apoptosis mediadas por el daño celular pueden ser atenuadas y aparecer resistencia al Cisplatino, siendo ésta la mayor limitación en la quimioterapia. Los mecanismos responsables de su resistencia son varios: disminución en la captación de la droga, incremento en la activación de la misma, e incremento en la reparación de los aductos ^{112,116}.

También se ha visto que la resistencia al cisplatino está influenciada por componentes del estroma del tumor incluídas proteínas de la matriz extracelular, el endotelio y poblaciones de células inmunosupresoras ^{117, 118}. Los mecanismos moleculares que inhiben la señal de propagación de daño al DNA y por ende la apoptosis incluyen pérdida del reconocimiento del daño, sobreexpresión de HER-2/neu, activación de PI3K/Akt, pérdida de la función de p53, sobreexpresión de bcl-2 y la interferencia en la activación de las caspasas (Fig. 23).

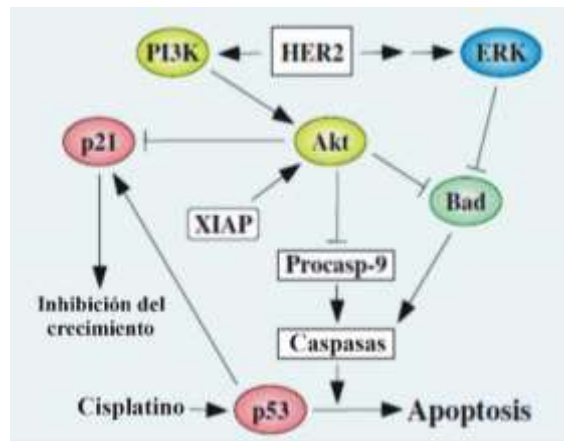


Figura 23: Cisplatino y Akt. La resistencia al cisplatino es afectada a través de las vías HER-2/neu y PI3K/Akt. La sobreexpresión en los cánceres de HER-2/neu potencia la actividad de PI3K/Akt la cual fosforila al inhibidor de CDK p21, asegurando su localización citoplasmática. Además, Akt promueve la fosforilación de Mdm2 y su traslocación al núcleo donde reprime a p53. La inactivación de Bad por las fosforilaciones de Akt...

La vía del Akt es uno de los principales factores asociados a la resistencia de la quimioterapia con el cisplatino ¹¹⁹. La resistencia al cisplatino mediada por Akt tiene lugar en

dos fases. Inicialmente la señalización de PI3K/Akt es mantenida en un nivel basal en donde hay un incremento de p21. Durante este periodo la célula dañada por acción del cisplatino toma ventaja del arresto celular inducido por p21 para tratar de reparar el daño del DNA genómico. En una segunda fase, sin embargo, las células sobrevivientes deben reanudar el programa de proliferación. Esto ocurre a través de un incremento de la actividad de la vía PI3K/Akt, la cual a su vez es responsable de la salida nuclear de p21, impidiendo su función y promoviendo la proliferación ¹¹⁹. Se ha documentado la relación de resistencia al cisplatino y la vía PI3K/Akt. En las líneas celulares KLE de Ca endometrial ⁹⁸, el silenciamiento mediante siRNA de las isoformas de Akt y de mTOR en células de cáncer cervicouterino ¹²⁰, fue suficiente para inducir la apoptosis mediada por el cisplatino. Células de cáncer de ovario sensibles a cisplatino, al ser transfectadas con Akt se vuelven resistentes, mientras que la sobreexpresión de una dominante negativa de Akt, las vuelve sensibles ⁹⁹. Otro estudio en células de cáncer de ovario, mostró que con la expresión constitutiva de Akt produce inhibición de la apoptosis ¹²¹. En células basales de cáncer de mama como MDA-MB-468 y HCC1937, pero no en células luminales T47D o en MCF-7, la Rapamicina potencia la muerte con el cisplatino, debido a la inducción de p73 ¹²². Además, en un modelo de cáncer de pulmón con expresión ectópica de E6 HPV16, la resistencia al cisplatino se debe al aumento de cIAP2 a través de la vía EGRF/PI3K/Akt ¹⁰³, que a su vez puede activar NFkB. Por otro lado, también hay evidencias de que las proteínas Gas inhiben la apoptosis inducida por el cisplatino, por el incremento de la expresión de XIAP a través de la vía AMPC – PKA-CREB-CRE like en células de cáncer de cervix ¹²³.

ANTECEDENTES DIRECTOS

Las líneas celulares derivadas de cáncer cervical muestran una resistencia diferencial al Cisplatino ¹²⁴, siendo HeLa (HPV 18) más sensible que SiHa (HPV 16) y ésta que CaSki (HPV 16). Además nuestros datos ¹²⁵ muestran que la transfección de la línea celular de carcinoma cervical C33A, libre de HPV, con los productos monocistrónicos E6, E6*I y E6*II de HPV 16 modifican la resistencia al Cisplatino. E6 y la forma corta E6*I que se ha detectado en las lesiones de alto grado (HSIL: CIN II-III) incrementan la resistencia; mientras E6*II que correlaciona con lesiones de

bajo grado (LSIL: CIN I) , la sensibiliza al tratamiento con el Cisplatino ^{21,24}. Estos antecedentes llevaron a tratar de dilucidar si los productos de *splicing* de E6 modulaban la expresión de proteínas proapoptóticas como SMAC/DIABLO y antiapoptóticas como Survivina ¹²⁵ entre otras. Los resultados arrojaron que no hubo alteración en la expresión de SMAC/DIABLO y de Survivina a nivel transcripcional ni traduccional. Además, no se obtuvo correlación entre los niveles de SMAC/DIABLO y Survivina con el porcentaje de supervivencia en las células tratadas con el Cisplatino. Por otro lado, análisis de nuestro laboratorio, en las líneas celulares de cáncer cervical y en muestras de carcinoma, mostraron una expresión diferencial de caspasas lo que sugirió la presencia de posibles alteraciones en su señalización¹²⁶. Además en líneas celulares de cáncer de cérvix se evidenció un retraso en el procesamiento de las caspasas 3 y 9 lo que podría favorecer a la resistencia a la apoptosis ¹²⁷ . Todos estos antecedentes contribuirían a la resistencia a la apoptosis tanto en líneas de cáncer de cérvix como en el carcinoma cervicouterino propiamente dicho, lo que facilitaría el desarrollo, crecimiento y supervivencia del tumor.

JUSTIFICACION

El Cisplatino, droga de elección para el tratamiento del cáncer cervical, provoca apoptosis vía mitocondrial, la que está finamente regulada por proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas. Por otro lado, se sabe que E6 HPV16 interacciona con la vía de señalización de Akt la cual puede regular negativamente a la caspasa 9. Estos hechos no han sido vinculados, por lo tanto, se justifica el estudio relacionando estos dos eventos en la apoptosis intrínseca y determinar si son mediados por el oncogén E6 HPV16 o sus formas de *splicing*.

HIPOTESIS

E6 HPV16 o sus formas de *splicing* alteran los mecanismos de procesamiento de la caspasa 9 (apoptosis intrínseca).

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la expresión del oncogén E6 HPV16 o sus productos de *splicing* en la activación de la caspasa 9 por cisplatino (en un modelo de apoptosis intrínseca).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Investigar a qué nivel afectan E6 y E6*s la apoptosis intrínseca.
2. Investigar el procesamiento de la caspasa 9 en presencia de los oncogenes E6 y E6*s.
3. Investigar si la fosforilación de la caspasa 9 por Akt altera su procesamiento.

MATERIALES Y METODOS

CULTIVO CELULAR

Células de carcinoma cervical C33A (HPV-) obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC®) y transfectadas establemente en el vector pEGFP-N1(Clontech) con productos de *splicing* del oncogén E6 (E6^{SDM}, E6*I, E6*II) fueron crecidas a 37°C con 5% de CO₂ en MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100U/ml de penicilina, 100ug/ml de estreptomicina y 500ug/ml de G418. El control sin transfectar se manejó bajo las mismas condiciones excepto que al MEM no se le agregó G418. El medio de cultivo, el SFB, los NEA y los antibióticos fueron comprados a Gibco (Invitrogen, USA).

Para los experimentos las células fueron inducidas a apoptosis mitocondrial o intrínseca con una dosis letal de 200µM (60µg/ml) de cisplatino (P4394 Sigma) por 8 horas. La dosis de cisplatino fue elegida de una curva de dosis-respuesta. Se utilizaron además MG132 (Sigma; 10 µM /2.5hs), cloroquina (Sigma; 40 µM /0.5 h), inhibidor VIII de Akt (Santa Cruz Biotechnology; 2.12 µM /4 hs) y fosfatasa lambda (NEB). En experimentos en donde las drogas iban disueltas en un vehículo como DMSO, éste fue usado como control negativo.

EXTRACCION DE PROTEÍNAS, ELECTROFORESIS *SDS-PAGE* Y *WESTERN BLOT*.

Para la obtención de proteínas totales las células fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia en placas de Petri de 100mm. Se lavaron dos veces con PBS 1x (Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 137 mM pH 7.5) frío y luego se sometieron a agitación orbital 10 minutos a temperatura ambiente con 400µl de buffer de lisis (M-PER, Thermo Scientific) suplementado con inhibidor de proteasas (Complete, Roche, DE) y con inhibidor de fosfatasas (Phosphostop, Roche).

Luego se cosecharon con una espátula y los extractos se obtuvieron mediante 20 minutos de centrifugación a 13000 rpm y a 4°C para eliminar los detritos. La concentración proteica de todos los extractos fue obtenida usando el ensayo de Bradford (Bio-Rad, USA). Veinte µg de proteínas se mezclaron en proporción volumen a volumen con buffer Laemmli 2x o 4x y se desnaturalizaron a 96 °C en bloque térmico por 10 minutos. Luego las proteínas se separaron por electroforesis en una cámara Bio Rad (Mini PROTEANT Tetra System) por SDS-PAGE con buffer de corrida Tris-Glicina-SDS (25mM/190mM/SDS 0.05%) y a continuación se transfirieron a una membrana de PDVF de 0.45nm (Perkin Elmer, USA). Las membranas se bloquearon una hora en agitación y a temperatura ambiente con una solución al 5% de leche descremada o al 1% de BSA (para anticuerpos fosforilados) en TBS (Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 100mM) suplementado con 1% de Tween20. Posteriormente se incubaron en agitación toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario; se lavaron 3 veces 5 minutos, con TBS-Tween y se incubaron por una hora y media a temperatura ambiente en agitación con el anticuerpo secundario. La tabla número 1 muestra las diluciones apropiadas a las cuales se usó cada anticuerpo. Luego de 3 lavados de 5 minutos con TBS 1x se revelaron las membranas con ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) por quimioluminiscencia usando Super Signal West Pico/Femto (Chemiluminiscent Substrate de Thermo Scientific, MA, USA). La mayoría de las membranas PVDF fueron desnudadas y decoradas o reveladas con otros anticuerpo y actina.

Anticuerpo	Casa comercial	Número de catálogo	Dilución
Actina	Obsequio Dr Manuel Hernandez-Hernandez (B.Celular CINVESTAV)		1/500
Anti Goat	Thermo Scientific	A-10668	1/4000
Anti Mouse	Invitrogen	62-6520	1/5000
Anti Rabbit	Invitrogen	65-6120	1/5000
Bax	Santa Cruz Biotechnology	7480	1/100
Bcl-XL	Cell Signaling Technology (CST)	2764	1/1000
Caspasa 10	Cell Signaling Technology (CST)	9752	1/1000
Caspasa 3	Cell Signaling Technology (CST)	9662	1/1000
Caspasa 6	Cell Signaling Technology (CST)	9762	1/1000
Caspasa 7 Cleaved	Cell Signaling Technology (CST)	9491	1/1000
Caspasa 8	Cell Signaling Technology (CST)	9746	1/1000

Caspasa 9	Cell Signaling Technology (CST)	9502	1/1000
Citocromo c	Cell Signaling Technology (CST)	4272	1/1000
GFP	Rockland	600-101-215	1/1000
hnRNPL	Santa Cruz Biotechnology	16550	1/100
MAP LC3B	Santa Cruz Biotechnology	271625	1 a 100
p53	Zymed	13-4000	1/100
P-AKT S473	Cell Signaling Technology (CST)	4058	1/1000
P-AKT T308	Cell Signaling Technology (CST)	13038	1/1000
PARP	Cell Signaling Technology (CST)	9542	1/1000
P-Caspasa 9 S196	Abgent	AP7974a	1/1000
P-MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling Technology (CST)	9106S	1/1000

Tabla 1: Lista de anticuerpos usados.

ENSAYO DE VIABILIDAD

Para esta prueba se empleó el kit LIVE/DEAD[®] Fixable Dead Cell Stain Kits (Invitrogen, L34960). Se crecieron 3×10^6 células hasta un 80% de confluencia, se trataron con cisplatino a una concentración de $200 \mu\text{M}$ ($60.6 \mu\text{g/ml}$) y se cosecharon a las 4 y 8 hs en experimentos separados. Sólo se usaron 1×10^6 células las cuales se tiñeron con $1 \mu\text{l}$ del reactivo de tinción rojo fluorescente ($\lambda_{\text{ex}} = 488\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 585\text{nm}$) y se procedió como recomendó el fabricante. Las células teñidas fueron analizadas por citometría de flujo (CyAn[™] ADP Analyzer Beckman Coulter) usando los canales FL-1 (FITC) versus FL-2 (PE). El control positivo de muerte consistió en células C33-A irradiadas a través de un cross-linker GS gene linker UV Chamber (Bio Rad) con 40 mJ/cm^2 de luz UV-C (220-280nm) por 2 minutos. Se controló además la expresión de GFP ($\lambda_{\text{ex}} = 396\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 508\text{nm}$) en las células transfectadas. Se consideraron células vivas aquellas que no fueron sometidas a tratamiento con cisplatino bajo las mismas condiciones de crecimiento de las células tratadas. Los datos fueron analizados con el programa Summit 5.1 y FlowJo.

ENSAYO DE POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

El cambio en el potencial de membrana mitocondrial ($\Psi\Delta\text{m}$) fue determinado tiñendo las células con el colorante TMRE (tetramethylrhodamine, ethyl ester, Mito Sciences, Abcam Kit ab 113852). TMRE (50nM) fue adicionado a células sin y con previo tratamiento de cisplatino, se

incubaron 20 min a 37 °C, y se procedió como recomienda el fabricante. Se usó el ionóforo desacoplador de la fosforilación oxidativa FCCP (carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazine, 20 μ M) como control de mitocondria despolarizada y también como control positivo de muerte se utilizaron células tratadas con luz UV como se mencionó anteriormente. El descenso del $\Psi\Delta m$ fue evaluado por citometría de flujo (CyAn™ ADP Analyzer Beckman Coulter) en canal FL2 (TMRE ($\lambda_{ex} = 549nm$; $\lambda_{em}=575nm$) con una disminución de fluorescencia (las mitocondrias inactivas o despolarizadas tienen un descenso del $\Psi\Delta m$ y no captan el colorante). Los datos analizados con los programas Summit 5.1 y Flow Jo, son dados en porcentaje de células con bajo $\Psi\Delta m$, lo que refleja el número de células que llegaron a apoptosis vía mitocondrial o intrínseca.

ENSAYO DE ACTIVIDAD DE CASPASAS.

Las actividades de caspasas fueron medidas en fluorómetro Delta RAM V™. Las células cultivadas en placas p100 con y sin tratamiento de cisplatino fueron lisadas con 700 μ l de buffer de lisis de caspasas (50mM Hepes, 5mM DTT y 1% de Tritón X-100), mediante intensa agitación orbital por 30 minutos a 4°C. El lisado se clarificó mediante centrifugación por 20 minutos a 4°C y a 13000rpm. El contenido de proteínas se determinó mediante Pierce (IDCR +Pierce, Thermo Scientific, USA) en lector de ELISA. Todos los ensayos se hicieron con 100 μ g de proteínas y los buffers fueron adicionados con DTT al momento de uso. Los experimentos se llevaron a cabo como se reportó anteriormente (en Benitez-Rangel, et al,2011, Garcia-Calvo, et al 1999) con algunas modificaciones:

Actividad de Caspasa 3. Buffer de ensayo conteniendo en mM: 20 Hepes, 5 DTT, 2 EDTA y 0.1%de Triton X-100 a pH 7.4. 2ml de buffer fue suplementado con 2 μ l de Ac-DEVD-AMC 1 mM (sustrato de caspasa 3, ALX, ENZO) con o sin 2 μ l de Ac-DEVD-CHO 2 mM (inhibidor de caspasa 3, R&D Systems #FMK004) y extracto proteico correspondiente. La mezcla se incubó 90 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Se tomaron en el fluorómetro 40 registros cada

0.25 seg por 10 minutos. La actividad de caspasa 3 fue determinada sustrayendo a la señal de fluorescencia la obtenida en presencia del inhibidor de caspasa. El valor de fluorescencia alcanzado para los queratinocitos incubados con 200 μ M de cisplatino fue considerado como el 100% de actividad.

Actividad de Caspasa 9: Buffer de ensayo conteniendo en mM: 100 MOPS, 10 DTT, 0.5% EDTA, 0.1% Tritón X-100 a pH 6.5 y 10% de glicerol. 2ml de buffer de ensayo fueron preincubados con la cantidad correspondiente de proteína por 30 min a 32°C antes de ser suplementado con 2 μ l de Ac-LEDH-AFC 1 mM (sustrato de caspasa 9, ALX, ENZO) con o sin 2 μ l de Ac-LEDH-CHO 2 mM (inhibidor de caspasa 9, R&D Systems #FMK008) e incubados a 32 °C por 24 hs. Los registros de actividad y la señal de fluorescencia se trataron como se hizo para el ensayo de caspasa 3.

Actividad de Caspasas 8 y 10: Buffer de ensayo conteniendo en mM: 20 Hepes, 5 DTT, 2 EDTA, 5% Sucrosa y 0.1% Tritón X-100 a pH 7.4. 2ml de buffer de ensayo fueron suplementados con 2 μ l de Ac-IETD-AMC 1 mM (sustrato de caspasa 8 y 10, ALX, ENZO) con o sin 2 μ l de Z-IETD-FMK 2 mM (inhibidor de caspasa 8, BioVision # 1064-100) y con 2 μ l de Z-AEVD-FMK 2 mM (inhibidor de caspasa 10, BioVision # 1112-100) en tubos separados e incubados a 32 °C por 2 hs. Los registros de actividad y la señal de fluorescencia se trataron como se hizo para el ensayo de caspasa 3.

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados son expresados como promedios \pm SD de por lo menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico fue hecho con el programa GraphPad Prism 5.0 (Hearne scientific, Pty Ltd, Melbourne, Australia).

RESULTADOS

*CAPITULO I: E6, E6*I Y E6*II MUESTRAN EFECTOS OPUESTOS AL CISPLATINO.*

Células C33-A transfectadas con E6*II-GFP muestran un elevado nivel de despolarización de membrana mitocondrial.

La despolarización de la membrana mitocondrial externa con pérdida o disminución del potencial de membrana es indicativa de una activación de la apoptosis vía intrínseca. Células C33-A transfectadas con las variantes de *splicing* del oncogén E6 HPV16 fueron sometidas al estímulo apoptótico del cisplatino. La despolarización de la membrana mitocondrial fue medida usando TMRE. Un alto nivel de despolarización se observó en C33-A E6*II-GFP contrario a los niveles de C33-A E6-GFP y C33-A E6*I-GFP (Fig. 24). Estos valores correlacionaron con antecedentes de nuestra investigación, donde ensayos de viabilidad (Live/Dead) con el mismo estímulo apoptótico mostraron que C33-A transfectada con E6 o E6*I inhibió la apoptosis, mientras que C33-A

transfectada con E6*II la sensibilizó. Toda esta información demostró que las células C33-A transfectadas y tratadas con cisplatino se mueren por apoptosis vía mitocondrial o intrínseca y que células C33-A transfectadas con E6*II-GFP tuvieron mayor nivel de despolarización que las transfectadas con E6 y E6*I.

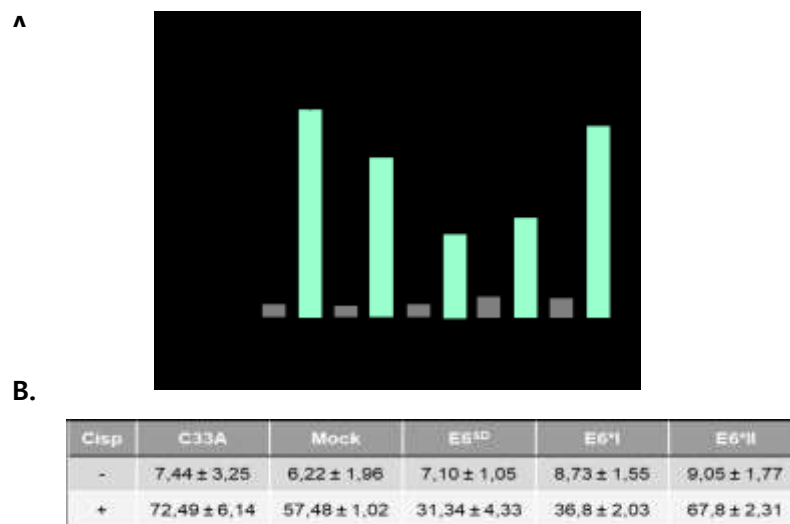


Figura 24: Potencial de membrana mitocondrial de células C33-A transfectedas con las variantes de *splicing* del oncogen E6 HPV-16. A) El ensayo se hizo usando TMRE y como control positivo fueron utilizadas células C33-A tratadas con 40 mJ / cm² de luz UV. B) En la tabla se muestran el valor

Proteínas mitocondriales se expresan sin deferencias en las células C33-A transfectadas con E6 HPV-16 y sus variantes de splicing.

El balance entre miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la familia BCL-2 regula la permeabilización y la despolarización de la membrana mitocondrial externa. Mediante *Western Blot* y el empleo de extractos solubles, se analizó la expresión de la proteína anti-apoptóticas BCL-2 y las pro-apoptóticas BAX y p-BAD, cabe destacar que cuando BAD es fosforilada se revierte su función. Bajo tratamiento de cisplatino la expresión de BCL-2 se observa en C33-A pEGFP-N1 (Mock) y en C33-A con la construcción de E6*II-GFP (Fig.25). Este resultado no fue congruente con el nivel de despolarización de membrana mitocondrial ni con el nivel de muerte previamente reportado. p-BAD no mostró diferencia significativa de expresión entre las muestras con y sin tratamiento. En C33-A E6-GFP bajo estímulo de cisplatino, se observó una muy discreta

disminución de BAX, lo que correlacionó con el bajo nivel de muerte que presentó C33-A transfectada con E6. Sin embargo, esto debe tomarse con cuidado porque C33-A transfectada con E6*I-GFP tuvo casi el mismo nivel de muerte que C33-A E6-GFP y tiene mismo nivel de expresión de BAX que C33-A E6*II-GFP.

Todos estos datos sugirieron que el nivel de expresión de las proteínas BCL-2, BAX y p-BAD no se relacionan con los niveles de despolarización de membrana mitocondrial en células C33-A.

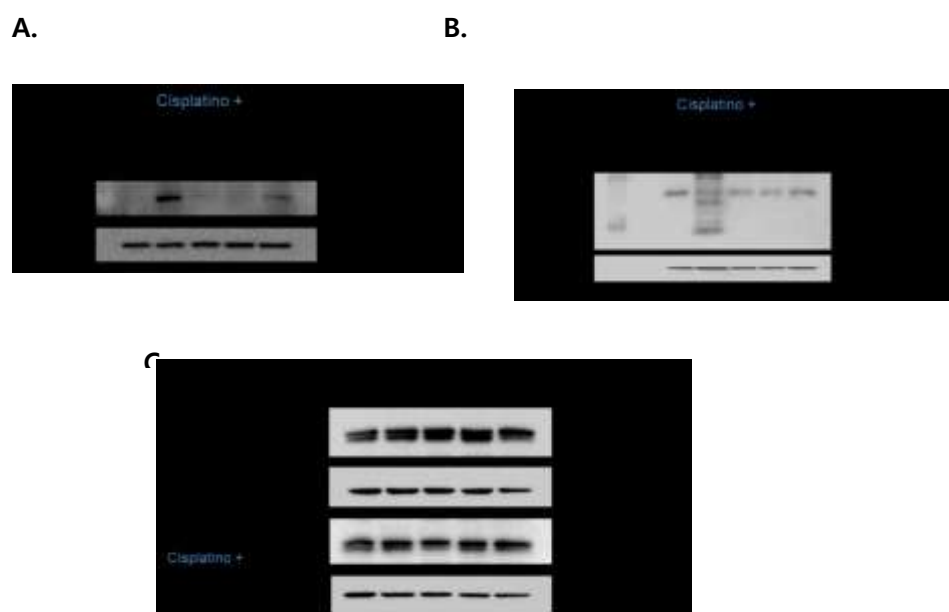
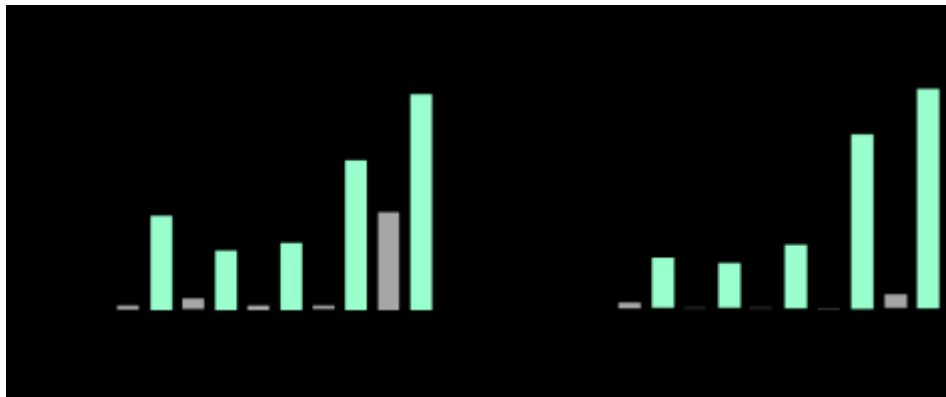


Figura 25: Análisis de la expresión de proteínas mitocondriales implicadas en la apoptosis intrínseca mediante *Western Blot*. A) La expresión de BCL-2 es evidente en C33-A transfectada con E6*II-GFP. B) Cuando BAD es fosforilada, es inhibida y pasa a ser una proteína antiapoptótica; no se observan diferencias entre las células tratadas con cisplatino. C) La proteína proapoptótica BAX presenta dos isoformas; Sin

Células C33-A transfectadas con E6 o E6*I-GFP tienen baja actividad de caspasas 9 y 3 respecto a C33-A E6*II-GFP.

La medida de la actividad de caspasas es una herramienta muy útil para evaluar la respuesta apoptótica. La despolarización de membrana mitocondrial sugiere que la apoptosis se llevó a cabo vía intrínseca por lo que se investigó la actividad de las caspasas -9 y -3 en células

C33-A transfectadas. Interesantemente un incremento en la actividad de las caspasas 9 y 3 fue observado para C33-A E6*II-GFP (Fig. 26) y fue consistente con el elevado nivel de apoptosis que mostró C33-A E6*II en nuestro antecedente y con su alto nivel de despolarización de la membrana mitocondrial.



Valores relativos de actividad de caspasa 9						
Caspasa	Cisplatino	Mock	E6	E6*I	E6*II	Pr/ks
Casp-9	-	12,958.22 ± 3,708.13	21,533.4 ± 679.9	9,809.9 ± 522.3	11,973.5 ± 928.1	160,601.8 ± 9,495.4
	+	147,327.9 ± 9,318.5	99,631.9 ± 5,031.1	110,078.6 ± 7,435.2	243,408.0 ± 3,901.3	347,640.8 ± 4,981.0
Casp-3	-	40,838.8 ± 12,425.7	2,404.0 ± 891.3	4,212.5 ± 2,115.9	5,398.3 ± 1,499.8	113,388.5 ± 24,539.1
	+	391,951.3 ± 14,279.5	335,131.8 ± 13,491.7	448,347.9 ± 41,589.5	1,198,513.7 ± 38,685.1	1,529,720.2 ± 220,777.4
Valores % referidos a la actividad de keratinocitos (100%)						
Casp-9	-	3.71	6.19	2.62	3.44	48.19
	+	42.37	28.85	31.66	70.01	100
Casp-3	-	2.70	0.15	0.28	0.35	7.51
	+	23.97	22.19	29.69	79.37	100

Figura 26: Niveles de actividad de caspasas -9 y -3 en células C33-A bajo estímulo apoptótico. A) Actividad de las caspasas -9 A) y -3 B) en C33-A tratadas con cisplatino por 8hs. Se comparan los extractos proteicos de C33-A transfectadas con HPV-16 E6, E6*I, E6*II-GFP con C33-A transfectadas con el vector pEGFP-N1 o con keratinocitos primarios tratados con 200 µM de cisplatino. La actividad de caspasas fue medida usando sustratos fluorogénicos específicos, Ac-DEVD-AMC para la caspasa-

En Células C33-A y C33-A transfectadas expresan un bajo nivel de procaspasa 8, pero no así de su actividad.

La caspasa 3 también es activada por la caspasa 8. La caspasa 8 ha sido reportada indetectable a nivel proteico en C33-A; la caspasa 10 es homóloga de la caspasa 8 estructuralmente y se piensa, que a nivel funcional también. Por ello la actividad de ambas

caspasas fue determinada. Sorprendentemente muy baja actividad de caspasa 8 fue detectada, pero no es claro si corresponde a su actividad específica, ya que la actividad inespecífica era 10 veces más alta que la obtenida en presencia de su inhibidor específico Z-IETD-FMK (información no mostrada). Para dilucidar este resultado, se realizó un ensayo de *Western Blot* con muestras proteicas concentradas 4 veces mediante columnas Amicon. Bajos niveles de procaspasa-8 fueron detectados tanto para C33-A como para C33-A transfectadas con E6, E6*I y E6*II-GFP (Fig.27). Aunque poca procaspasa 8 fue observada en las células transfectadas, no fuimos capaces de detectar su actividad específica y su procesamiento.

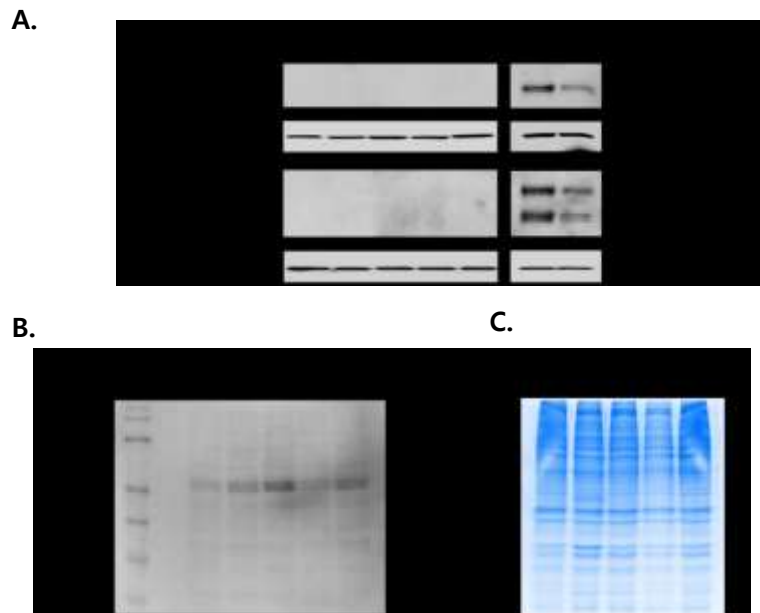


Figura 27: Expresión de procaspasa-8 en células C33-A. A) *Western Blot* con 25 μ g de proteína en donde sin y con estímulo de cisplatino no se observa la caspasa. Se usaron células CaSki y SiHa como controles en donde sí se evidencia la procaspasa 8. B) El *Western Blot* se realizó concentrando la muestra mediante columnas Amicon y usando 100 μ g de proteína en donde sí se evidenció una pequeña banda correspondiente a la procaspasa

La procaspasa 8 fue inmunoprecipitada de células C33-A.

Para corroborar la presencia de la procaspasa 8 en células C33-A se realizó estratégicamente un ensayo de inmunoprecipitación. Claramente fue detectada la procaspasa 8 en C33-A sin transfectar y transfectada con pEGFP-N1 y con E6-GFP (Fig.28). Todos estos datos

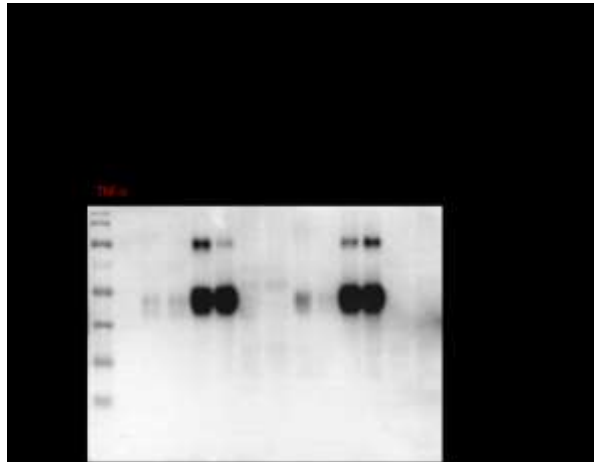


Figura 28: Inmunoprecipitación de caspasa-8 en células C33-A. Células C33-A transfectadas con el vector p-EGFP-N1 y con E6-GFP fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-caspasa 8.

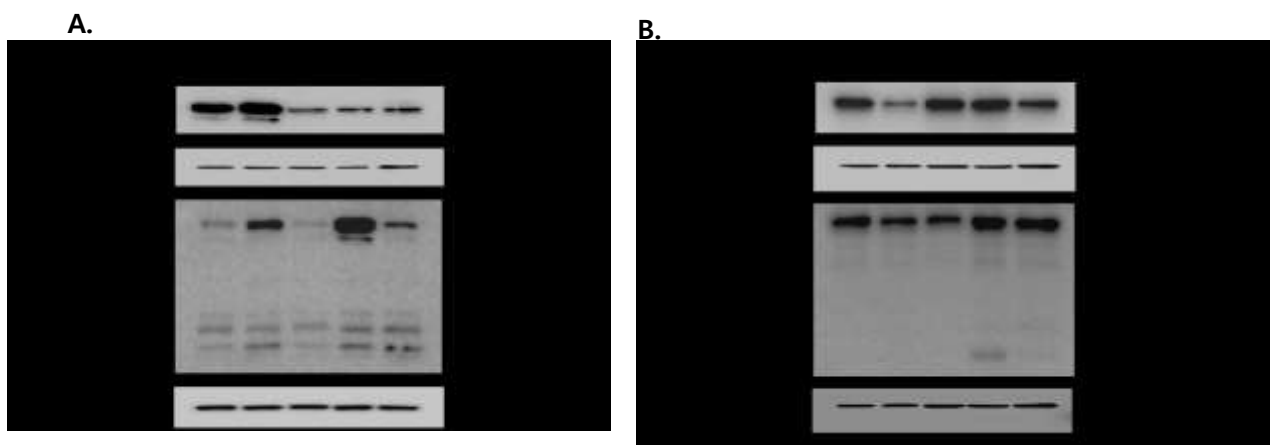
indicaron que las células C33-A expresan procaspasa 8 en bajos niveles, contrario a lo previamente reportado. Esto sugiere que la procaspasa 8 podría estar en compartimentos en las células C33-A.

El nivel de procesamiento de la procaspasa 3 correlaciona con el procesamiento de su sustrato PARP.

La actividad de caspasas está relacionada con el procesamiento de las mismas. Mediante ensayos de *Western Blot* se detectó el procesamiento las caspasas -10,- 6-, -9, -7 y-3. El procesamiento de la caspasa 10 fue claramente observado (Fig. 29 A) sin embargo, debido a que no pudimos detectar su actividad específica y, porque esta caspasa recientemente fue sugerida como un inhibidor de la caspasa 8, analizamos su nivel en todas las transfectantes. No se encontró relación entre los niveles de procaspasa 10 o su procesamiento con los niveles de muerte mostrados para las diferentes células transfectadas. Es de destacar que el procesamiento de las

caspasas 6 y 7 fue sólo observado para C33-A E6**I*-GFP y C33-A E6***II*-GFP (Fig. 29 B, D). Estos resultados requerirán más ensayos en el futuro.

El procesamiento de las caspasas 9 y 3 claramente correlacionó con los resultados anteriores, sin embargo, el procesamiento de la caspasa 9 es incompleto (Fig. 29C) y merece ser analizado en un capítulo aparte. Las células C33-A transfectadas con E6**I* o E6**II*-GFP mostraron niveles similares de procesamiento de la caspasa 3. Estos resultados no correlacionaron con la elevada actividad de caspasa 3 observada en las células transfectadas con E6**II*-GFP ni con la baja actividad en E6**I*-GFP. Para corroborar esta información, el procesamiento de PARP un sustrato conocido de caspasa 3 fue investigado en células tratadas con cisplatino. Se observó una clara diferencia entre células que expresan E6**I* o E6**II* (Fig. 29 F), estas últimas mostraron mayor procesamiento de caspasa 9, lo que correlacionó con la alta actividad de caspasa-3 en C33A E6**II*-GFP.



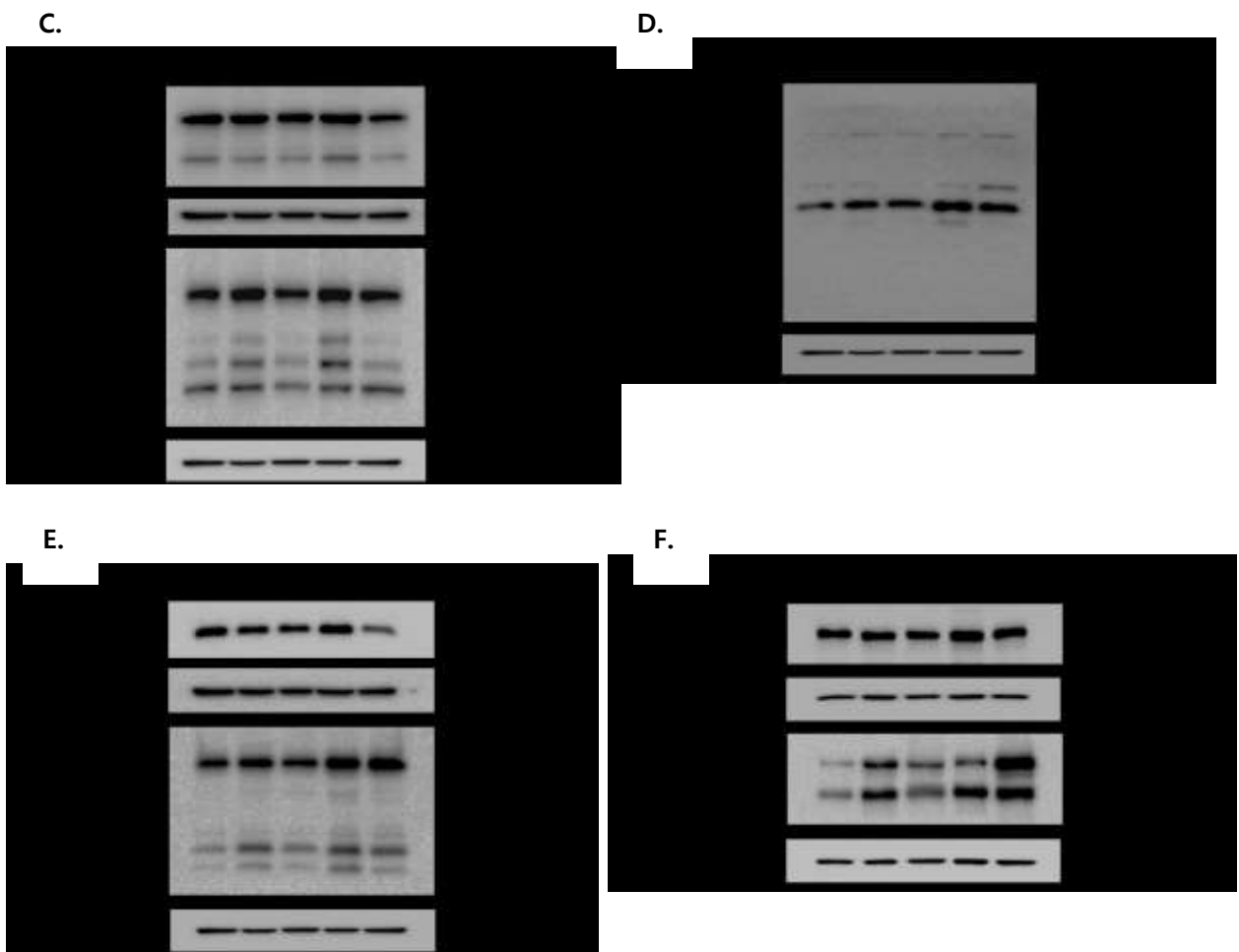


Figura 29: Procesamiento de caspasas en células C33-A inducidas a apoptosis con cisplatino. A) Caspasa 10. B) Caspasa 6. C) Caspasa 9; el asterisco indica una isoforma de la caspasa 9. D) Caspasa 7. El anticuerpo detecta los fragmentos activos procesados E) Caspasa 3. F) PARP. Las células fueron tratadas

La caspasa 9 presenta alteración en su procesamiento.

En la figura 29 se mostró el procesamiento de la caspasa 9 el cual merece ser analizado a detalle. La caspasa 9 estructuralmente constituida por un dominio CARD, una subunidad larga y una corta, cuando es sometida a un estímulo apoptótico se auto procesa en el sitio D315 y en D330, por la caspasa 3. De acuerdo cómo va siendo escindida (Fig. 30) presenta 4 formas de



Figura 30: Caspasa 9 y su procesamiento. A) La caspasa 9 está estructuralmente formada por un dominio CARD, una subunidad larga que posee el sitio de activación, y una subunidad pequeña o corta unidas entre sí por regiones bisagras. Entre estos límites están los sitios de escisión. B) De acuerdo cómo se va procesando presenta cuatro formas de procesamiento: p35/p12 cuando es autoprocada en el sitio D315, p35/10 cuando además es procesada por la caspasa 3 en el sitio D330, p37/p10 cuando es procesada sólo en el sitio D330 y cuando es totalmente procesada del CARD se libera la subunidad larga de aproximadamente procesamiento: p35/p12, p35/p10, p37/p10. Al ser procesada totalmente, quedan libres las subunidades larga y corta, y forman el tetrámero de la caspasa 9 activa. Sólo los fragmentos de la subunidad larga pueden ser revelados por anticuerpos en un ensayo de WB; hasta la fecha no se disponen de anticuerpos comerciales contra la subunidad pequeña. Los controles de Keratinocitos y células HMEC presentaron un total y correcto procesamiento de la caspasa 9, independientemente del estímulo apoptótico (Fig. 31 A). Contrariamente, las células C33-A (Fig. 31 B), sin transfectar y transfectadas con las variantes de *splicing* del oncogén E6, tratadas con una dosis letal de cisplatino, sólo evidenciaron las bandas correspondientes al procesamiento parcial y no la banda de 15 kDa. Toda esta información sugiere que la caspasa 9 en células C33-A sufre un procesamiento parcial o incompleto.

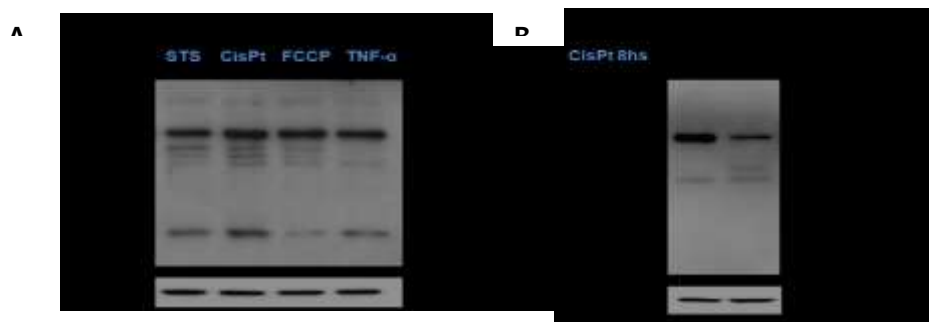


Figura 31: Procesamiento de la caspasa 9 en células HMEC y C33-A: A) Células HMEC bajo diferentes estímulos apoptóticos (STS 24hs, CisPt 8hs, FCCP 8hs, TNF- α 8hs) muestran un procesamiento completo de

La transfección de E6 y sus variantes de splicing en células C33-A no conducen el procesamiento total de la caspasa 9.

Todas las células C33-A transfectadas con E6-GFP y sus formas cortas E6*I y E6*II-GFP fueron inducidas a apoptosis con cisplatino por 8 hs posteriores a las cuales se determinó el procesamiento de la procaspasa 9. Es de destacar que bandas intermedias de procesamiento, discretamente menos intensas que el control Mock y C33-A E6*I-GFP, se observan para C33-A E6-GFP que fue la más resistente al tratamiento con cisplatino. Sin embargo, estos datos en conjunto sugieren que la transfección de E6 y sus variantes de *splicing* en células C33-A no evidencian el procesamiento total de la caspasa 9.

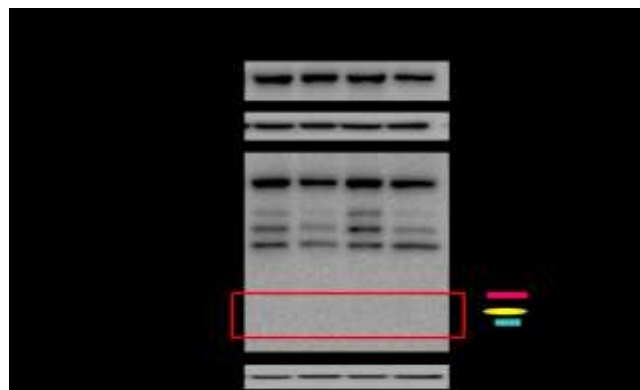


Figura 32: Procesamiento parcial de la caspasa 9 en células C33-A transfectadas con pEGFPN1 (Mock), E6-GFP, E6*I-GFP, E6*II-GFP. Se indica con un rectángulo rojo en donde debería aparecer la banda correspondiente al procesamiento total de la caspasa 9. El asterisco indica la banda de la isoforma β

El fragmento de procesamiento completo de la caspasa 9 no se degrada vía proteosoma.

Para analizar por qué el procesamiento de la caspasa 9 era parcial, y tratar de investigar si el fragmento correspondiente a la caspasa 9 activa era degradado vía proteosoma, las células fueron tratadas con 10 μ M MG132, inhibidor de la subunidad 26 del proteosoma, dos horas y media antes de la extracción de proteínas. A nivel basal se observó una discreta disminución de



Figura 33: Procaspsa 9 y MG132. A) WB de células C33-A y C33-A transfectadas tratadas con 10 μ M MG132 dos horas antes de la exacción proteica y sin cisplatino. B) Densitometría donde se observa una discreta tendencia a la disminución de la procaspasa 9 luego del MG132, en vez del esperado la procaspasa 9 en celulas que expresaban E6-GFP, E6*I-GFP y E6*II-GFP, respecto a los controles (Fig. 33).

Cuando las células fueron tratadas con cisplatino además del inhibidor de proteosoma, sorpresivamente la banda de 15 kDa no se evidenció (Fig. 34). Sin embargo, en células transfectadas se observó un aumento a nivel de procaspasa 9, exceptuando las células que expresaban E6*I y a C33-A, se observó en general una disminución de las formas de procesamiento intermedias; sugiriendo que estos fragmentos se podrían estar degradando mediante esta vía. Sin embargo, para descartar que los fragmentos de corte parcial de caspasa 9, no se degradaban por otra vía el siguiente paso fue evaluar la autofagia que es otro sistema de degradación celular.

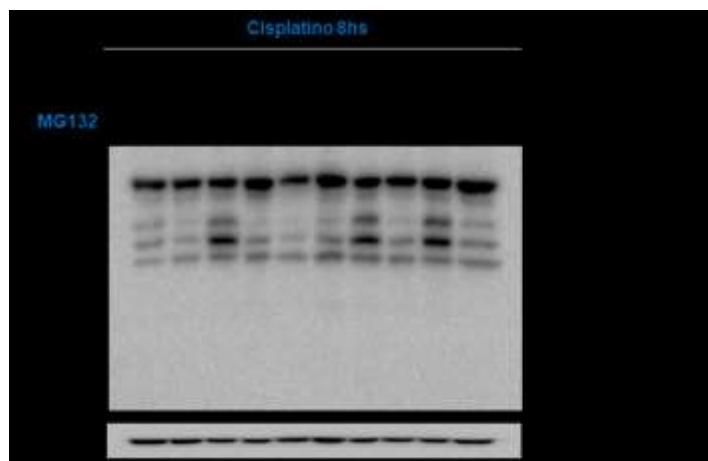


Figura 34: Procesamiento de la caspasa 9 con Cisplatino y MG132. Para C33A no hay cambios con el inhibidor tanto en procaspasa 9 y sus formas intermedias de procesamiento. E6-GFP con MG132 muestran un incremento en la procaspasa 9 y en las formas intermedias respecto a su control y al Mock. En E6*I y E6*II-GFP y el Mock, en cambio se observa un procesamiento menor que sus respectivos

CAPITULO III: AUTOFAGIA

Las variantes de splicing del oncogén E6 fusionadas a GFP no sufren modificación vía autofágica, y el modelo de estudio es apto para evaluar esta vía de degradación.

Antes de indagar en la autofagia en sí, se controló el modelo de estudio para estar seguros de que las variantes de *splicing* del oncogén E6 fusionadas a GFP no sufrían modificación alguna vía autofágica. Células C33-A transfectadas con E6^{SD}, E6*I y E6*II fueron evaluadas, bajo tratamiento con cloroquina (que impide la fusión del autofagosoma con el lisosoma) tanto a nivel

basal como con cisplatino (Fig. 35). Se realizaron WB contra la proteína reportera GFP, los cuales mostraron que en las muestras pareadas sin y con cloroquina, no se observó diferencia entre ellas. Este resultado sugirió que las variantes de *splicing* del oncogén E6 fusionadas a GFP no sufren degradación por autofagia.

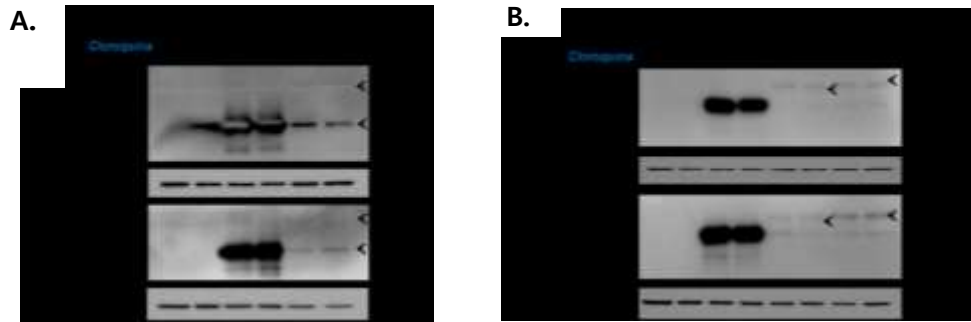


Figura 35: Las variantes de *splicing* del oncogén E6 transfectadas en células C33-A, no se degradaron por autofagia. A) C33-A, C33-A pEGFPN1(Mock), C33A-E6, B) C33-A, C33-A pEGFPN1(Mock), C33A-E6*I,

Para descartar además que la inducción de la apoptosis por cisplatino no alterara la autofagia, como control células C33-A fueron sometidas a apoptosis inducida por estaurosporina y se evaluó con el marcador de autofagia LC3 (Fig 36). El resultado del WB confirmó que bajo la inducción fuerte de estaurosporina, no se indujo autofagia comparada con la muestra control en donde tampoco se observa la banda de LC3-II característica del flujo autofágico.



Figura 36: Fuerte inducción de apoptosis no altera autofagia. En células C33-A tratadas bajo el inductor potente de apoptosis estaurosporina (1 μ M Por 24 hs) no produjo estímulo del flujo autofágico. En la sección siguiente se explica a profundidad la interpretación de LC3-II.

La caspasa 9 activa no se degrada vía autofágica en células C33A transfectadas con variantes de *splicing* del oncogén E6.

Las células se trataron con cloroquina 30 minutos antes de ser inducidas a apoptosis vía mitocondrial con el cisplatino. En C33A-E6, C33A-E6*I y C33A-E6*II se observaron los fragmentos de procesamiento correspondientes a 35 y 37 kDa, pero no el de 15 kDa, tampoco en el control (Fig. 37). Sin embargo, para C33-A y C33-A transfectadas con el Mock, E6*I y E6*II-GFP, se observó un ligero aumento a nivel de procaspasa, en presencia de la cloroquina (Fig. 37 B). El resultado muestra claramente que en las células que expresan el oncogen E6-GFP la caspasa 9 activa no se degrada vía autofágica. Se ha reportado que el HPV 16 induce la autofagia por lo tanto fue el siguiente punto a investigar.

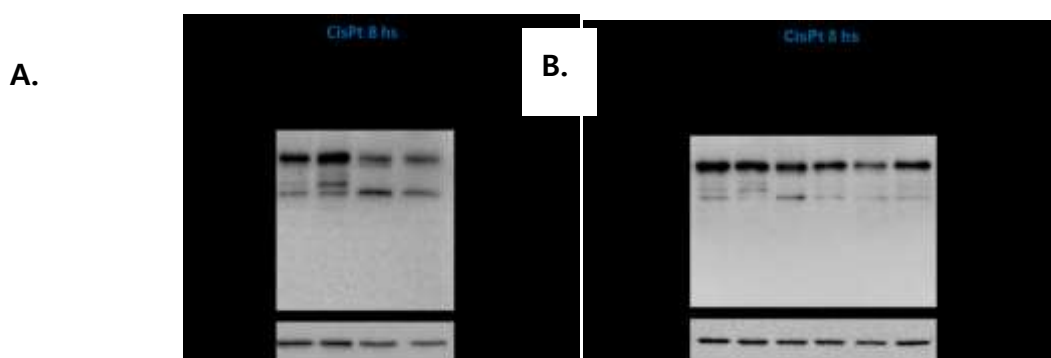


Figura 37: Caspasa 9 y autofagia. Las muestras bajo un estímulo de cisplatino fueron tratadas con el inhibidor de autofagia cloroquina y analizadas mediante SDS-PAGE. A) C33-A pEGFPN1(Mock) y C33A-E6. B) C33-A pEGFPN1(Mock), C33A-E6*I y C33-A E6*II. En ninguno de los dos WB se evidenció la banda

El tratamiento con cisplatino induce autofagia y en células C33-A E6 se favorece la conjugación de LC3-I con fosfatidiletanolamina (PE).

La proteína cadena 3 ligera asociada a microtúbulos (LC3-I) es conjugada con la PE (fosfatidiletanolamina) denominándose LC3-II durante la formación del autofagosoma. El flujo autofágico puede ser detectado mediante WB por el recambio de LC3-II, en presencia y ausencia de un inhibidor de la degradación lisosomal como cloroquina, NH₄Cl o Bafilomicina A. Si el flujo autofágico está ocurriendo, el nivel de LC3-II se incrementa en presencia de un inhibidor, porque el tránsito de LC3-II a través de la vía autofágica está bloqueado. En las figuras 38 y 39 se observa un leve incremento de LC3-I a nivel basal en todas las células transfectadas probablemente esto se deba al proceso de transfección en sí ¹²⁸. En cambio, cuando las mismas

células fueron sometidas bajo el estrés del cisplatino, sorpresivamente sólo para células C33-A que expresaban E6 se observó un incremento importante de LC3-II (Fig.38). En la figura 39 bajo

tratamiento con cisplatino y cloroquina en C33-A E6 se observa un evidente incremento de LC3-II. B) Representación gráfica de cómo interpretar un aumento de LC3-II

reportado anteriormente, el mecanismo por el cual el cisplatino favorece la conversión de LC3-I a LC3-II por un mecanismo aún desconocido favorece la conversión de LC3-I a LC3-II.

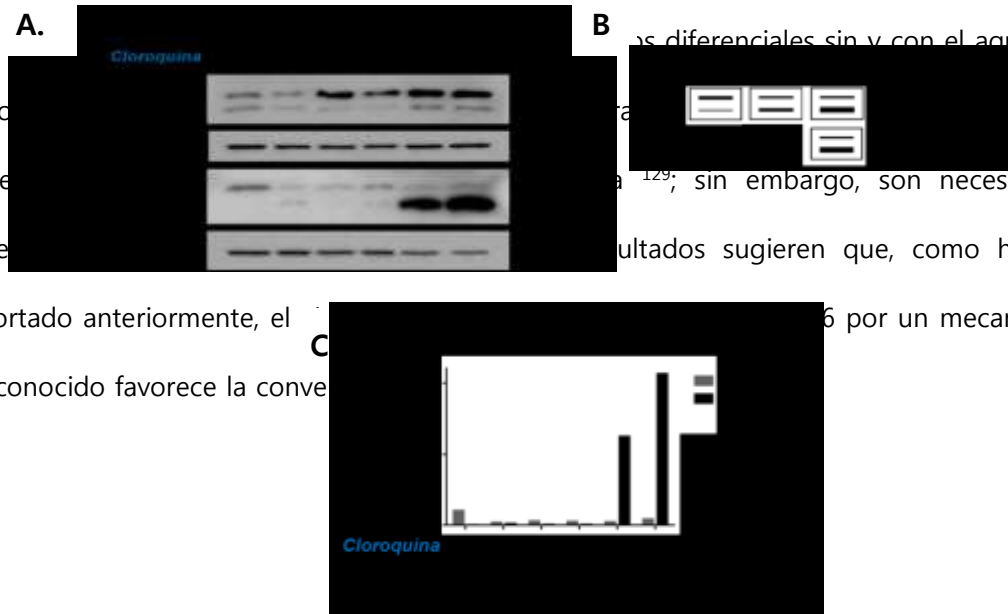


Figura 38: C33-A E6 favorece la conjugación de LC3-I con la fosfatidiletanolamina, convirtiéndola en LC3-II. A) Nótese que LC3-II teniendo un peso molecular superior a LC3-I migra más debido a su mayor hidrofobicidad. Cuando las células son tratadas con cisplatino y cloroquina en C33-A E6 se observa un evidente incremento de LC3-II. B) Representación gráfica de cómo interpretar un aumento de LC3-II

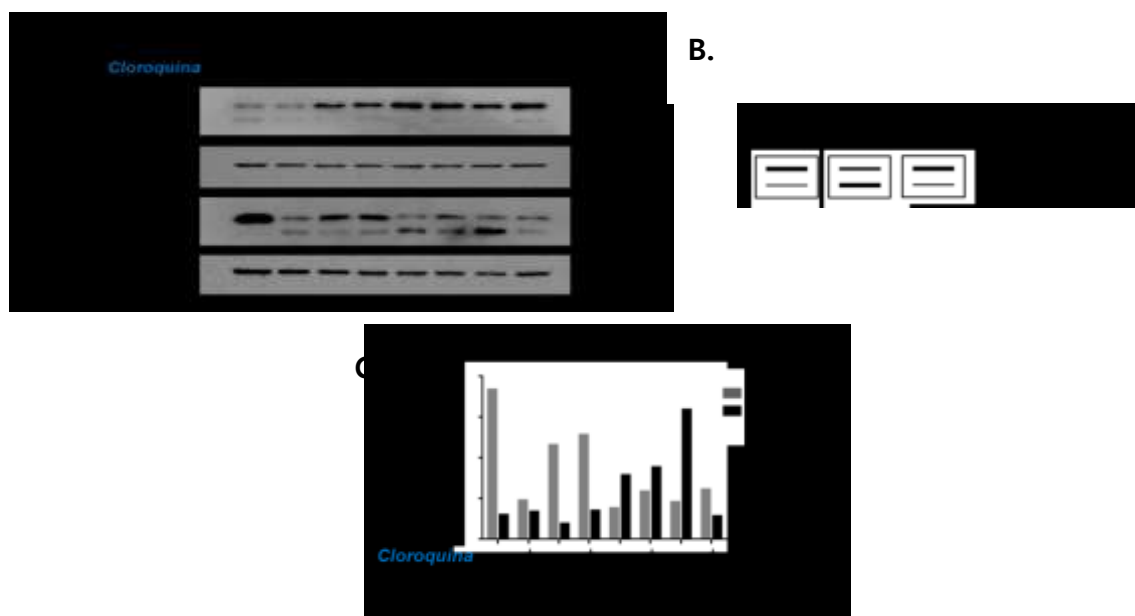
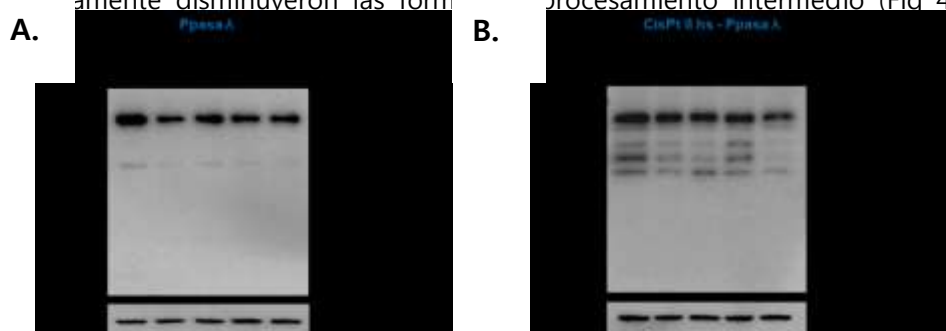


Figura 39: Las formas cortas de *splicing* del oncogén E6, E6*I y E6*II no favorecen la conjugación de LC3-I. A) C33-A E6*II no muestra un incremento de LC3-II posterior al tratamiento con cloroquina, lo que sugiere que el flujo autofágico podría ser defectuoso. B) Representación gráfica de cómo interpretar un WB de LC3 para autofagia defectuosa. Modificado de Mizushima et al, 2007. C) Densitometría de WB figura A de células con tratamientos de cisplatino v cloroquina. Nótese que en C33A sin cloroquina la barra es **CAPITULO IV: FOSFORILACION DE CASPASA 9 POR AKT**

La caspasa 9 es fosforilada en células C33-A.

Debido a que el fragmento correspondiente de la caspasa 9 activa no se evidenció con inhibidores de proteosoma ni de autofagia, se pensó que tal vez la caspasa tenía alguna modificación postraduccional que afectaba el procesamiento o el anticuerpo utilizado no reconocía, por estar modificada. La caspasa 9 es regulada por fosforilación que afecta su procesamiento y actividad. Por lo que los extractos proteicos de las células C33-A estudiadas fueron sometidas a tratamiento con fosfatasa lambda (Ppasa λ) para eliminar cualquier fosforilación en sus residuos de aminoácidos y evaluar si se producían cambios en su detección por el WB (Fig. 40A). En células con tratamiento de cisplatino sólo en C33-A que expresaban E6*II-GFP, únicamente disminuyeron las formas de procesamiento intermedio (Fig 40B). Sin embargo,



la caspasa 9 está fosforilada y quizás diferencialmente, en C33-A E6*II GFP. Es notable un ligero retraso en la migración o aumento en el peso aparente de la procaspasa y sus fragmentos; este hecho merece ser analizado a mayor profundidad.

Figura 40: Caspasa 9 y fosfatasa lambda: A) Células transfectadas con E6 y sus variantes de *splicing*, sin tratamiento con cisplatino, no muestran diferencias significativas entre sí. B) Mismas células bajo tratamiento de cisplatino y fosfatasa lambda. Se observa una disminución de las formas intermedias de procesamiento para C33-A E6*II GFP, sugiriendo que la caspasa 9 está fosforilada y quizás diferencialmente en estas células.

Akt está activa en células C33-A.

La vía del Akt está activa en el cáncer de cérvix. Akt fosforila a la caspasa 9 en serina196 afectando negativamente su procesamiento y actividad. Para que Akt pueda fosforilar a la caspasa 9 antes debe ser activada por PDK1 y mTORC2, que la fosforilan en treonina 308 y serina 473, respectivamente. Mediante WB se detectó, que en células C33-A está activa Akt, como era de esperarse (Figura 41A y 41B). Además, se trataron las células con el inhibidor específico de Akt, evidenciándose una gran disminución en la cantidad de la proteína activa. La fosforilación en la serina196 por Akt ha sido asociada a la quimiorresistencia y a un peor pronóstico en varios cánceres como: mama, próstata y pulmón. Se evaluó esta fosforilación mediante el uso de inhibidor VIII, específico para Akt

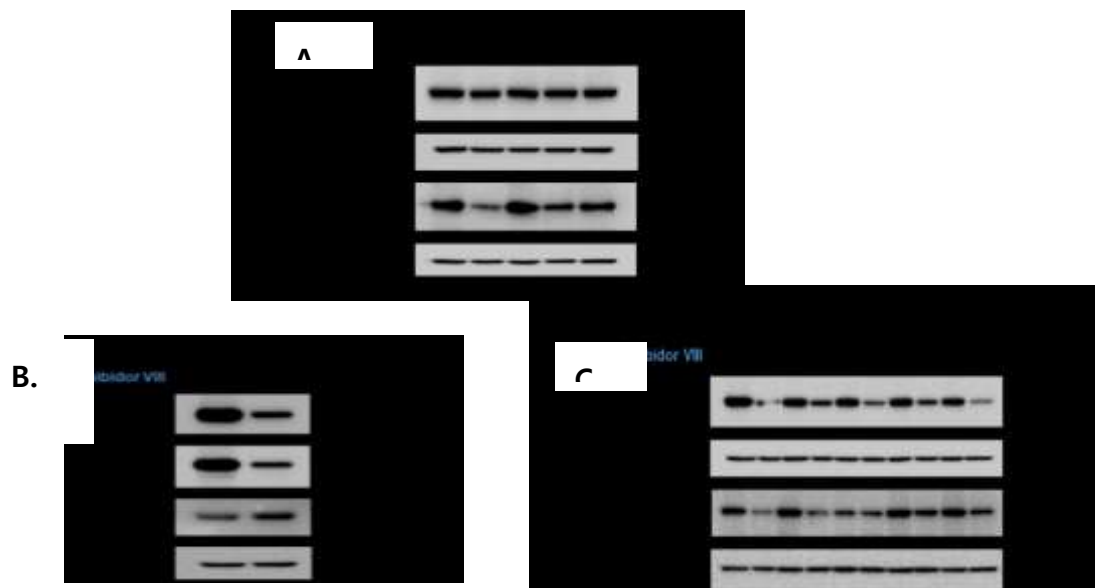


Figura 41: Akt está activa en células C33-A. A) Fosforilaciones en S473 y T308 son marcadores de actividad. A nivel basal está constitutivamente activa Akt y no se aprecian diferencias entre las células. B) Controles de funcionalidad del inhibidor VIII (2,12 μ M), donde se observa el abatimiento de p-Akt S473 y p-Akt T 308 y el aumento de una proteína fosforilada (p-MAPK (Erk 1/2)) no relacionada con la vía del Akt. C) Células C33-A

El inhibidor VIII de Akt no beneficia la apoptosis en células C33-A.

Para dilucidar el efecto de la fosforilación en serina 196 sobre la inhibición de la actividad de la caspasa 9 y finalmente sobre la apoptosis intrínseca, se realizó un ensayo de viabilidad con el inhibidor específico de Akt. Las células fueron tratadas con el inhibidor VIII de Akt previo al tratamiento con cisplatino. Se esperaba que, al inhibir la vía de supervivencia, se favoreciese la apoptosis. Sin embargo, la inhibición de Akt no la favoreció (Fig. 42). Por lo tanto, este resultado sugiere o que la fosforilación en S196 no es la responsable del defecto en el procesamiento o que tal vez otra cinasa esté fosforilando este residuo.

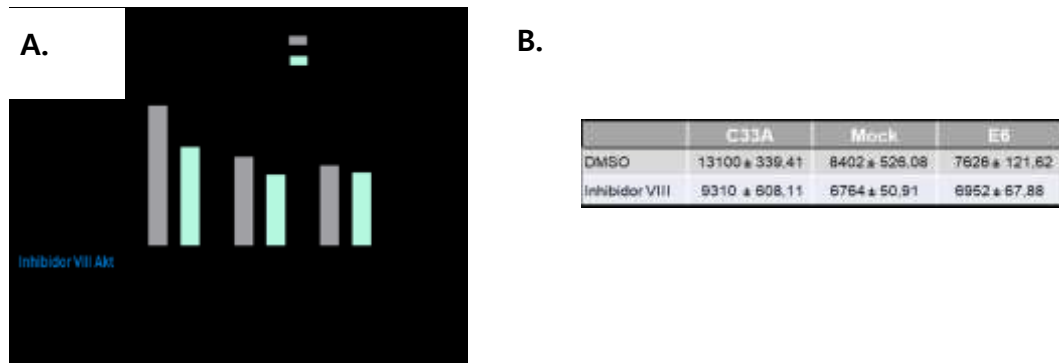


Figura 42: El inhibidor VIII específico de Akt no incrementa la apoptosis disparada con cisplatino. A) Nivel de apoptosis (luego del tratamiento 4 hs con 2.12 μ M de inhibidor VIII previas a 8 hs de 200 μ M de cisplatino) es mostrado como porcentaje de muerte. B) Los niveles de fluorescencia relativa a 2.10^3 células

CAPITULO V: CASPASA 9 ISOFORMA β

La isoforma β de la caspasa 9 está presente en células C33-A constitutivamente al igual que la isoforma α o canónica.

Se cree que la isoforma β de la caspasa 9 contribuye a la resistencia en la apoptosis, al competir con la caspasa α por la unión al apoptosoma. De modo que la caspasa 9 β funciona como un inhibidor apoptótico. En células C33-A y C33-A transfectadas con las variantes de *splicing* de E6, se evidenció mediante WB la isoforma β de la caspasa 9 de 30 kDa, tanto a nivel

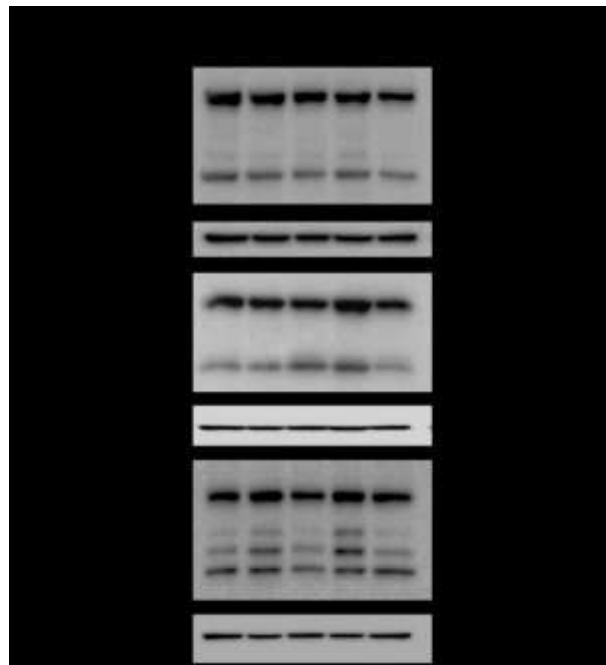


Figura 43: La isoforma β de la caspasa 9 está presente en células C33-A. En la figura se observan las isoformas alfa y beta de la caspasa 9 en células C33-A sin tratamiento de cisplatino y con tratamientos a 4 y 8 horas.

basal y bajo el tratamiento de cisplatino a 4 y 8 hs (Fig. 43). A nivel basal no hay diferencias significativas en la cantidad de la isoforma, pero a 4 hs del tratamiento de cisplatino, se observa un incremento en C33-A E6 GFP y C33-A-E6*I GFP. Esto llama la atención ya que estas células transfectadas son las que presentaron mayor resistencia a la apoptosis por cisplatino, interesantemente esta banda se observa de menor intensidad en las células que expresan E6*II. Sin embargo, este dato deberá confirmarse con la detección de transcrito por RT-PCR. Por otra parte, a las 8 hs postratamiento las diferencias no son tan claras. En resumen, la isoforma β de la caspasa 9 está presente en células C33-A de manera constitutiva, al igual que la isoforma canónica α .

C33-A E6 GFP y C33-A E6*I GFP tienen más factor hnRNP L que C33-A E6*II luego del estímulo apoptótico del cisplatino.

El factor hnRNP L es responsable de favorecer el *splicing* de la isoforma β de caspasa 9, el cual es activado mediante fosforilación por Akt. Se evaluó la expresión del factor mediante Western Blot, en donde sin tratamiento con cisplatino, las células C33-A E6*I GFP y C33-A E6*II GFP mostraron más cantidad que C33-A E6 GFP y el control Mock (pEGFPN1) (Fig. 44). Bajo tratamiento, sin embargo, incrementaron la cantidad de hnRNP L, el Mock notablemente y más sutilmente C33-A E6 GFP. C33-A E6*II GFP disminuyó su cantidad. Sin embargo, sería más acertado evaluar la expresión del factor activado (fosforilado) y así correlacionarlo apropiadamente con la cantidad de la isoforma β de la caspasa 9. No obstante, el factor hnRNP L sufre un cambio de expresión con el tratamiento de cisplatino; donde las células más resistentes a la apoptosis por cisplatino, C33-A E6 y C33-A E6*I presentaron mayor cantidad de hnRNP L que C33-A E6*II.

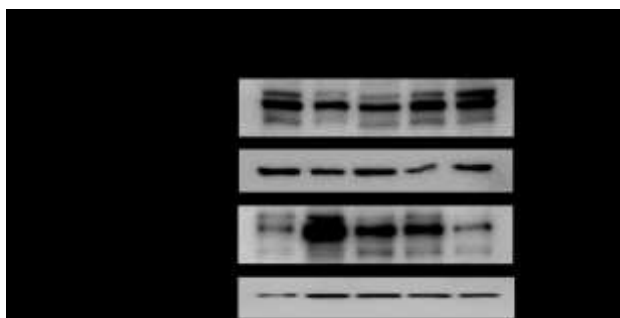


Figura 44: El factor de *splicing* hnRNP L. A) A nivel basal se observa mayor cantidad del factor en C33-A con las formas cortas E6**I*, E6**II*-GFP que en C33-A E6 y el Mock. B) Luego del tratamiento de 8 hs con cisplatino la cantidad del factor aumenta en el Mock y discretamente en C33-A E6.

DISCUSION

Las células cancerígenas son resistentes a la apoptosis por naturaleza, porque son defectuosas en su control lo que juega un papel muy importante en la tumorigénesis. El Papilomavirus (HPV) expresa por lo menos dos proteínas oncogénicas, E6 y E7, que en combinación son las responsables de las alteraciones del microambiente y de la diferenciación celular que llevan a la tumorigénesis. Además, se requieren alteraciones genéticas adicionales que

afectan directa o indirectamente la expresión de genes que controlan la expresión de proteínas antiapoptóticas y la inactivación de proteínas proapoptóticas. Por otro lado, los oncogenes E6/E7 de HPV-16 producen por *splicing* 5 proteínas (E6, E6*I, E6*II, E6^E7, E7), complicando el esquema de su efecto tumorigénico. Poco se sabe del rol y de la contribución de cada una de estas formas cortas de *splicing* a la tumorigénesis, por lo que en este trabajo se analizó el efecto particularmente de E6, E6*I y E6*II en la apoptosis inducida por cisplatino. El cDNA de E6 silvestre fue mutado en el sitio donador de *splicing* de modo que sólo codificó la proteína E6 completa. Por otra parte, el cisplatino es la droga de primera línea en la terapia del CCU, aunque paulatinamente las células cancerosas van adquiriendo resistencia, afectando la adherencia al tratamiento y finalmente la sobrevida de las pacientes.

En este trabajo se usaron como modelo, células C33A (negativas para HPV) transfectadas establemente con monocistrones que codifican para cada una de las variantes de *splicing* de E6. Las células C33-A tienen mutaciones en p53 (en el codón 273), Rb (delección en los exones 13-20), en la subunidad catalítica de PI3K y además PTEN no es detectado ¹³⁰. Debido a las modificaciones en estos genes, las células C33-A son un excelente modelo de cáncer cervical, y para el estudio de la apoptosis durante la expresión ectópica de E6 y sus variantes de *splicing*.

Los efectos del oncogén E6 del HPV están bien documentados. Sin embargo, no se ha estudiado a profundidad la función de sus variantes de *splicing* o formas cortas E6*I, E6*II. E6* I es la variante más abundante de todos los transcritos de E6¹³¹ comparte las mismas funciones que E6, pero no promueve la degradación de p53 ¹³² ni de caspasa 8 ¹³³ como lo hace E6. E6*II a su vez, degrada p53 ¹⁸. Es de destacar que hay diferencias en el perfil de *splicing* entre las líneas celulares de cáncer cervical CaSki y SiHa que tienen integrado el HPV16. CaSki que es la línea de cáncer cervical más resistente a la apoptosis, tiene mayor cantidad de E6*I respecto a SiHa. Además, el nivel de la procaspasa 8 es significativamente más alto en CaSki que en SiHa, como

el nivel del FADD. Estas diferencias de expresión son consistentes con su resistencia diferencial al cisplatino. Además, presentan la baja sensibilidad al TNF y al α -Fas¹³⁴.

De manera muy interesante, las células C33A transfectadas con la variante E6*II, fueron las más sensibles al cisplatino, (inclusive mayor que el control Mock), mientras que E6 o E6*I, favorecieron la resistencia. El efecto diferencial en la resistencia a la apoptosis correlacionó muy bien con la actividad elevada de las caspasas 9 y 3, además de la elevada despolarización de la membrana mitocondrial externa de las células que expresan E6*II, respecto a células que expresan E6 o E6*I y al control. La activación de las caspasas 8 y 10 no correlacionó con este efecto diferencial. El nivel de actividad de las caspasas 9 y 3 fue mayor en las células C33-A E6*II que en las C33-A E6*I o en las C33-AE6. Interesantemente, E6*II ha sido asociada a lesiones de bajo riesgo²¹, en cambio las lesiones de alto riesgo han sido relacionadas con E6*I^{22,24}. Aunque hay trabajos que sugieren totalmente lo contrario^{23,25}. Es de destacar que E6*I y E6*II sólo difieren en 5 aminoácidos en el extremo carboxi terminal, los cuales probablemente son los que participan en los mecanismos de la respuesta al cisplatino. Consistente con nuestros resultados, la introducción de E6*I en células SiHa y C33-A resulta en tumores xenógrafos más pequeños comparados con los derivados de la forma completa de E6²⁶.

La caspasa 9 representa un elemento clave en la señalización de la apoptosis inducida por cisplatino, por lo que la modulación de su actividad es finamente regulada, determinando una apropiada homeostasis celular. La resistencia al cisplatino en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello se atribuye a una disminución en la actividad de caspasa 9 y a una baja expresión de Apaf-1¹³⁵. La caspasa 9 en células C33-A sufre un procesamiento parcial o incompleto. Sin embargo, los datos en conjunto sugieren que la transfección de E6 y sus variantes de *splicing* en células C33-A, no alteran el procesamiento total de la caspasa. La subunidad o fragmento largo de la caspasa 9 es pequeño y soluble, por lo que se pensó que probablemente

se estaba degradando por la vía proteosómica. Por esta razón, se utilizó el inhibidor de proteosoma MG132 previo a tratar las células con el cisplatino. Sin embargo, en ninguna de las células se evidenció la banda de 15kDa correspondiente a la caspasa 9 totalmente procesada. Sabemos que las proteínas pequeñas se degradan vía proteosoma y las que están en complejos no. Nuestros resultados mostraron que el MG132 no protegió la degradación de la caspasa 9. Esto sugirió estudiar la otra importante vía de degradación macromolecular celular, la autofagia, para saber si el fragmento de interés estaba siendo parte de un complejo que a su vez estaba siendo degradado vía autofagia. Los resultados tampoco mostraron evidencia de esta posibilidad. Por lo tanto, se investigó si la caspasa tenía alguna modificación postraducciona que afectara su procesamiento ya que, otra posibilidad podría ser que el anticuerpo comercial utilizado, no reconociera el fragmento largo de la caspasa 9. La caspasa 9 es regulada por fosforilaciones que afectan su procesamiento y actividad. Para tener un panorama general de las fosforilaciones, se trataron a las células con fosfatasa lambda y se analizó la expresión de caspasa 9. Ésta se observó en todas las células, aunque en menos cantidad para C33-A E6*II-GFP. Si E6*II estuviera fosforilada inhibitoriamente, no se procesaría ni activaría lo cual es paradójico ya que son las células C33-A transfectadas que presentan mayor sensibilidad al cisplatino y tienen elevada actividad de caspasa 9. Otra posibilidad podría ser que en las células que expresan E6*II, la caspasa 9 puede estar regulada positivamente por fosforilación. Sin embargo, para resolver esta hipótesis, habrá que indagar todos los sitios de fosforilación de la caspasa 9. La única que hasta el momento se conoce como fosforilación activadora, es efectuada por c-Abl sobre la Y 153 de caspasa 9, pero en la actualidad, no contamos con este anticuerpo.

Por otro lado, las fosforilaciones inhibitorias son clave ya que inhiben su activación comprometiendo la capacidad para activar a sus efectores inmediatos, las procasasas 3 y 7. La fosforilación e inactivación de la caspasa 9 puede ser uno de los mecanismos usados por Akt para promover el crecimiento celular. La fosforilación en la S196 por Akt ha sido asociada a la

quimiorresistencia en cánceres de mama, próstata y pulmón con un peor pronóstico. Akt está activa en C33-A, por lo que se esperaba que la caspasa 9 estuviera fosforilada en el residuo 196, lo que se pudo demostrar con un anticuerpo dirigido contra ese residuo (información no mostrada) y con el uso del inhibidor VIII específico de Akt. Pensando que esta modificación al ser inhibitoria de su actividad podría ser responsable de la apoptosis diferencial, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad. Para este ensayo, se quitó la fosforilación mediante la inhibición de Akt. Sin embargo, el uso del inhibidor específico de Akt, no sensibilizó a las células C33-A E6 GFP, a la apoptosis inducida por cisplatino. Este resultado fue inesperado.

Además de fosforilaciones la caspasa 9 es regulada por *splicing* alternativo. La caspasa 9 β se considera que es una "dominante negativa endógena" ya que compite con la caspasa α o canónica por la unión al apoptosoma suprimiendo la cascada apoptótica. Por ejemplo NSCLC tiene un fenotipo antiapoptótico ¹³⁶ debido a que la expresión de la isoforma 9 β prevalece sobre la isoforma 9 α . Sin embargo, en células C33-A aunque se evidenció la expresión de la isoforma β , sino se detectaron diferencias entre las células transfectadas con los monocistrones de E6 y sus variantes de *splicing*, excepto luego de 4 hs post tratamiento con cisplatino donde las células que expresan E6 y E6*I presentaron un incremento en esta forma de *splicing*. El factor de *splicing* hn RNP L es fosforilado por Akt, lo que favorece la variante de *splicing* β . El análisis del factor hn RNPL total mostró que sufre un cambio de expresión con el tratamiento de cisplatino; donde las células más resistentes a la apoptosis por cisplatino, C33-A E6 y C33-A E6*I presentaron mayor cantidad respecto a C33-A E6*II.

La autofagia, es considerada con funciones ambivalentes en el desarrollo y mantenimiento de distintos tipos de cánceres. En la mayoría de ellos es requerida para sostener el crecimiento rápido de las células cancerosas, al estar continuamente aportando sustratos para las reacciones anabólicas. Además, la autofagia ha sido relacionada con la promoción de la muerte celular e involucrada en mecanismos supresores de tumores.

La medida del flujo autofágico depende de la capacidad para distinguir entre la formación del autofagosoma, la fusión del lisosoma y degradación. El incremento de LC3-II durante la inhibición de la degradación lisosomal es el mejor marcador de actividad autofágica. Si el flujo autofágico está ocurriendo el nivel de LC3-II se incrementa en presencia de un inhibidor de la degradación lisosomal, lo que resulta en un bloqueo de la degradación y en la acumulación de los autofagosomas incapaces de fusionarse con los lisosomas. Adicionalmente los niveles del complejo Atg5-Atg12 (50 kDa) son una medida de la eficiencia de la autofagia a nivel temprano, es decir en la formación del autofagosoma.

Es interesante destacar que en LSIL, asociadas con la presencia de la variante E6*I, hay menos cantidad de LC3-II respecto a las HSIL en donde prevalece E6*II; infiriéndose que en HSIL habría más autofagia que en LSIL. Los resultados sugirieron que C33-A E6 por un mecanismo aún desconocido, favorece la conversión o conjugación de LC3-I a LC3-II. Se debe ser cuidadoso con la interpretación de los resultados ya que un aumento de LC3-II puede deberse tanto a un incremento del flujo como a una disminución de su degradación lisosomal, debido a un bloqueo en la vía autofágica, posterior a la conjugación de LC3-I. Por lo que es necesario evaluar otros marcadores como p62 y ensayos de inmunofluorescencia evidenciando la formación de vesículas autofágicas y su fusión con lisosomas para tener un panorama completo de la vía autofágica. Los niveles de p62/Sqstm1 son usados como una medida indirecta de la funcionalidad de la autofagia ya que p62/Sqstm1 se acumula cuando la autofagia es defectuosa. Es importante considerar que p62 es modulada por NFkB y Ras que podrían alterar sus niveles y los cambios observados no ser significativos de una autofagia defectuosa ¹³⁷.

Las células de carcinoma cervical HPV 16 positivas, SiHa y CaSki sobreviven a bajas concentraciones (15 μ M /24 hs) de cisplatino induciendo una autofagia protectora, considerada un mecanismo de resistencia a la quimioterapia. De modo la inhibición de la autofagia puede

potenciar o mejorar la quimioterapia por cisplatino. El bloqueo de la autofagia en estas células con siRNA para Atg5 más Bafilomicina A, sensibilizó más a las células SiHa que a las células CaSki consideradas previamente las más resistentes a la apoptosis por cisplatino. El bloqueo de la autofagia también sensibilizó a las células HeLa (HPV 18+) al tratamiento de cisplatino. Para determinar la influencia de la autofagia sobre la sensibilidad de las células C33-A al cisplatino, habría que examinar la viabilidad luego del tratamiento con un inhibidor de autofagia y el cisplatino y además un inductor de autofagia más cisplatino. Especulando con los resultados obtenidos, células C33-A transfectadas con E6 las cuales mostraron resistencia al cisplatino y en donde E6 favoreció la autofagia, si ésta se inhibe (con cloroquina, por ejemplo) deberían volverse sensibles; y células C33-A transfectadas con E6*II las cuales fueron las más sensibles al cisplatino, deberían volverse resistentes al inducirles autofagia (por ejemplo, con CLi) imitando de esta manera a C33-A E6. Estos datos ameritan un estudio profundo para averiguar por qué el oncogén E6 estaría favoreciendo esta vía de degradación celular; y qué proteínas u organelos estaría enviando a autofagia y por qué; qué funciones tienen esas proteínas y en qué vías de señalización participan

CONCLUSIONES

En conjunto todos estos datos confirmaron que E6 y sus formas alternativas de splicing no alteran el procesamiento de la caspasa 9, pero sí la apoptosis. La transfección estable de las formas de *splicing* de HPV-16 E6 o E6*I en células C33-A confirieron resistencia al cisplatino, mientras que las células transfectadas con E6*II no lo hicieron. Adicionalmente los resultados evidenciaron que ambas formas cortas E6*I o E6*II del HPV-16, mostraron efectos opuestos a la apoptosis inducida por cisplatino. Si bien fueron considerados varios factores que podrían ser

responsables de la resistencia a la apoptosis, contribuyendo cada uno al resultado final, más investigaciones ampliando cada uno de estos aspectos merecen ser llevadas a cabo para tener un entendimiento más profundo de la resistencia a la apoptosis en el cáncer cervicouterino.

PERSPECTIVAS

E6*II:

Investigar la correlación entre los 5 aminoácidos adicionales en E6*II y los efectos encontrados.

AUTOFAGIA

Investigar por qué el oncogén E6 HPV16 favorece la autofagia.

- Caracterización celular y molecular de vesículas autofágicas
- Investigar las proteínas que se estarían enviando a degradación y por qué;
- Qué funciones tienen esas proteínas y en qué vías de señalización participan;
- ¿Son vías de señalización que altera E6 o son nuevos blancos?
- HPV 6, HPV 11 que son de bajo riesgo, también favorecen la autofagia; ¿sí, no, por qué?

BIBLIOGRAFIA

1. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, Muñoz J, Bosch FX, de S. S. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. *HPV Inf. Centre. Summ. Rep.*
2. Kasper Dennis, Fauci Anthony, Hauser Stephen , Longo Dan, Jameson Larry, L. J. *Harrison Principios de Medicina Interna.* (2016).
3. Liverani CA, Ciavattini A, Monti E, Puglia D, Mangano S, DI Giuseppe J, Zizzi A, G. G. High risk HPV DNA subtypes and E6/E7 mRNA expression in a cohort of colposcopy patients from Northern Italy with high-grade histologically verified cervical lesions. *Am J Transl* **4**, 452–457 (2012).
4. Julie, C. Nature Outlook HUMAN PAPILLOMAVIRUS. **488**, S4–S6 (2012).
5. Audisio R. A. , Icardi G., . Isidoric, A. M, Liveranid C. A., Lombardie A., Marianif L., Menninig F.S., Mitchellh D. A., Peracinoi A., Pecorellij S., Rezzak G., Signorellil C., Vitali G., Z. G. V. Public health value of universal HPV vaccination. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 157–167 (2016).
6. <http://www.who.int>.
7. McLaughlin-Drubin, M. E. & Münger, K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res.* **143**, 195–208 (2009).
8. James Mitchell Crow. Human Papillomavirus. *Nat. Outlook* **488**, S2 (2012).
9. Surviladze, Z., Dziduszko, A. & Ozbun, M. a. Essential roles for soluble virion-associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. *PLoS Pathog.* **8**, e1002519 (2012).
10. Moody, C. a & Laimins, L. a. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to

- transformation. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 550–60 (2010).
11. zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 342–50 (2002).
 12. Walboomers, J. M. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **19**, 12–19 (1999).
 13. Tomaic V. , Pim D., B. L. The stability of the human papillomavirus E6 oncoprotein is E6AP dependent. *Virology* **393**, 7–10
 14. Papers, J. B. C., Doi, M., Filippova, M., Parkhurst, L. & Duerksen-hughes, P. J. The Human Papillomavirus 16 E6 Protein Binds to Fas-associated Death Domain and Protects Cells from Fas-triggered Apoptosis *. **279**, 25729–25744 (2004).
 15. Filippova, M., Song, H., Connolly, J. L., Dermody, T. S. & Duerksen-Hughes, P. J. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 21730–21739 (2002).
 16. Underbrink, M. P., Dupuis, C., Wang, J. & Tying, S. K. E6 proteins from low-risk human papillomavirus types 6 and 11 are able to protect keratinocytes from apoptosis via Bak degradation. *J. Gen. Virol.* **97**, 715–724 (2016).
 17. Smotkin D, Prokoph H, W. F. Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *Viol. J.* **63 (3)**, 1441–1447
 18. del Moral-Hernández, O. *et al.* The HPV-16 E7 oncoprotein is expressed mainly from the unspliced E6/E7 transcript in cervical carcinoma C33-A cells. *Arch. Virol.* **155**, 1959–1970 (2010).
 19. Sellors J.W., Schweizer J.G., Lu P.S., Liu B., Weigl B.H., Cui J.F., Peck R.B., Lewis K., Lim J.,

- Howard M., Mahoney C.W., McAllister L., Berard-Bergerey M., Bry C., Labiad Y.A., Li H., Liu L., Silver J., Chen W., Q. Y. L. Association of Elevated E6 Oncoprotein With Grade of Cervical Neoplasia Using PDZ Interaction-Mediated Precipitation of E6. *J. Low. Genit. Tract Dis.* **15**, 169–176 (2011).
20. Cho, C. W. *et al.* HPV E6 antisense induces apoptosis in CaSki cells via suppression of E6 splicing. *Exp. Mol. Med.* **34**, 159–166 (2002).
21. Cricca, M. *et al.* Molecular Analysis of HPV 16 E6I / E6II Spliced mRNAs and Correlation With the Viral Physical State and the Grade of the Cervical Lesion. **1282**, 1276–1282 (2009).
22. Sotlar, K., Selinka, H. C., Menton, M., Kandolf, R. & Bültmann, B. Detection of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogene transcripts in dysplastic and nondysplastic cervical scrapes by nested RT-PCR. *Gynecol. Oncol.* **69**, 114–121 (1998).
23. McNicol, P., Guijon, F., Wayne, S., Hidajat, R. & Paraskevas, M. Expression of human papillomavirus type 16 E6-E7 open reading frame varies quantitatively in biopsy tissue from different grades of cervical intraepithelial neoplasia. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1169–1173 (1995).
24. Kösel, S., Burggraf, S., Engelhardt, W. & Olgemöller, B. Increased levels of HPV16 E6*I transcripts in high-grade cervical cytology and histology (CIN II+) detected by rapid real-time RT-PCR amplification. *Cytopathology* **18**, 290–9 (2007).
25. Pastuszek-Lewandoska D, Bartosińska-Dyc A, Migdalska-Sęk M, Czarnecka KH, Nawrot E, Domańska D, Szyłto K, B. E. HPV16 E6*II gene expression in intraepithelial cervical lesions as an indicator of neoplastic grade: a pilot study. *Med. Oncol.* **31**,
26. Filippova, M. *et al.* The small splice variant of HPV16 E6, E6, reduces tumor formation in cervical carcinoma xenografts. *Virology* **450–451**, 153–64 (2014).

27. Thiede, B., Dimmler, C., Siejak, F. & Rudel, T. Predominant Identification of RNA-binding Proteins in Fas-induced Apoptosis by Proteome Analysis. **276**, 26044–26050 (2001).
28. Muzio, M. *et al.* FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817–827 (1996).
29. M Thome, P Schneider, K Hofmann, H. F. Viral FLICE-inhibitory proteins FLIP. *Nature* **386**, 517–521 (1997).
30. Yeh, W. C. *et al.* Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* **12**, 633–642 (2000).
31. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 49–63 (2014).
32. Li, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1 / Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. **91**, 479–489 (1997).
33. Riedl, S. J. & Salvesen, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 405–13 (2007).
34. Schafer, Z. T. & Kornbluth, S. The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev. Cell* **10**, 549–61 (2006).
35. Pathan N, Marusawa H, Krajewska M, Matsuzawa S, Kim H, Okada K, Torii S, Kitada S, Krajewski S, Welsh K, Pio F, Godzik A, R. J. TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. *J. Biol. Chem.* **276**,
36. Allan, L. a & Clarke, P. R. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J.* **276**, 6063–73 (2009).
37. Seifert A, Allan LA, C. P. DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is

- potently inhibited in human cells by harmine. *FEBS J.* **275**, 6268–80
38. Martin, M. C. *et al.* Protein kinase A regulates caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **280**, 15449–55 (2005).
 39. Cardone, M. H. Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation. *Science (80-.).* **282**, 1318–1321 (1998).
 40. Eriko Fujita, Atsushi Jinbo, Hidenori Matuzakib, Hiroaki Konishib, Ushio Kikkawab, T. M. Akt Phosphorylation Site Found in Human Caspase-9 Is Absent in Mouse Caspase-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 550–555 (1999).
 41. Raina, D. *et al.* c-Abl tyrosine kinase regulates caspase-9 autocleavage in the apoptotic response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **280**, 11147–51 (2005).
 42. Eckelman, B. P., Salvesen, G. S. & Scott, F. L. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep.* **7**, 988–94 (2006).
 43. Shiozaki, E. N. *et al.* Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol. Cell* **11**, 519–27 (2003).
 44. Srinivasula, S. M. *et al.* A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac / DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. **411**, 0–5 (2001).
 45. Hiroyuki Marusawa, Shu-ichi Matsuzawa, Kate Welsh, Hua Zou, Robert Armstrong, Ingo Tamm, and J. C. R. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J.* **22**, 2729–2740
 46. Török, N. J., Higuchi, H., Bronk, S., Caspase, N. & To, N. J. Nitric Oxide Inhibits Apoptosis Downstream of Cytochrome c Release by Nitrosylating Caspase 9 Nitric Oxide Inhibits Apoptosis Downstream of Cytochrome c Release by. 1648–1653 (2002).
 47. Floyd DH, Zhang Y, Dey BK, Kefas B, Breit H, Marks K, Dutta A, Herold-Mende C,

- Synowitz M, Glass R, Abounader R, P. B. Novel anti-apoptotic microRNAs 582-5p and 363 promote human glioblastoma stem cell survival via direct inhibition of caspase 3, caspase 9, and Bim. *PLoS One* **9**,
48. Walker J.C., H. R. M. microRNA-24a is required to repress apoptosis in the developing neural retina. *Genes Dev.* **23**, 1046–1051
49. Shang, J. *et al.* MicroRNA-23a Antisense Enhances 5-Fluorouracil Chemosensitivity Through APAF-1/Caspase-9 Apoptotic Pathway in Colorectal Cancer Cells. *J. Cell. Biochem.* **115**, 772–784
50. Paronetto, M. P., Passacantilli, I. & Sette, C. Alternative splicing and cell survival: from tissue homeostasis to disease. *Cell Death Differ.* **23**, 1919–1929 (2016).
51. Seol DW, B. T. A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**, 2072–6 (1999).
52. Vu NT, Park MA, Shultz JC, Goehe RW, Hoeflerlin LA, Shultz MD, Smith SA, Lynch KW, C. C. hnRNP U enhances caspase-9 splicing and is modulated by AKT-dependent phosphorylation of hnRNP L. *J. Biol. Chem.* **288**, 8575–84 (2013).
53. Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Muñoz MJ, Wengier D, Quadrana L, Sanford JR, Muschietti JP, Kornblihtt AR, Cáceres JF, Coso OA, S. A. Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 1037–44
54. Srinivasula, S. M. *et al.* Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that can regulate apoptosis. *Cancer Res.* **59**, 999–1002 (1999).
55. Waltereit, R., W. M. The role of caspases 9 and 9-short (9S) in death ligand- and drug-induced apoptosis in human astrocytoma cells. *Mol. Brain Res.* **106**, 42–49 (2002).
56. Shultz, J. C. *et al.* SRSF1 regulates the alternative splicing of caspase 9 via a novel

- intronic splicing enhancer affecting the chemotherapeutic sensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Res* **9**, 889–900 (2011).
57. Wu, H. *et al.* Caspases: A molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Int. J. Biol. Sci.* **10**, 1072–1083 (2014).
 58. Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. & White, E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 961–967 (2007).
 59. White, E. & D'Alpaola, R. S. The Double-Edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. **15**, 5308–5317 (2009).
 60. Kurt Degenhardt, Robin Mathew, Brian Beaudoin, Kevin Bray, Diana Anderson, Guanghua Chen, Chandreyee Mukherjee, Yufang Shi, Céline Gélinas, Yongjun Fan, Deirdre A. Nelson, Shengkan Jin, E. W. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**, 51–64
 61. Gozuacik, D. & Kimchi, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* **23**, 2891–2906 (2004).
 62. Martinez-outschoorn, U. E. *et al.* Understanding the metabolic basis of drug resistance. *Cell Cycle* **10**, 2521–2528 (2011).
 63. Lin, W. M. & Li, Z. G. Blockage of cisplatin-induced autophagy sensitizes cervical cancer cells to cisplatin. *Genet. Mol. Res.* **14**, 16905–16912 (2015).
 64. Leisching, G., Loos, B., Botha, M. & Engelbrecht, A.-M. A Nontoxic Concentration of Cisplatin Induces Autophagy in Cervical Cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **25**, 380–388 (2015).
 65. Geng, Q. R. *et al.* Beclin-1 Expression Is a Significant Predictor of Survival in Patients with Lymph Node-Positive Gastric Cancer. *PLoS One* **7**, 5–10 (2012).

66. Sun, Y. *et al.* Modulatory Effects of Beclin 1 on Expression of Angiopoietin and Tie-2 Receptor in Human Cervical Cancer Cells. **12**, 2985–2990 (2011).
67. Surviladze, Z., Sterk, R. T., DeHaro, S. a & Ozbun, M. a. Cellular entry of human papillomavirus type 16 involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway and inhibition of autophagy. *J. Virol.* **87**, 2508–17 (2013).
68. Griffin, L. M., Cicchini, L. & Pyeon, D. Human papillomavirus infection is inhibited by host autophagy in primary human keratinocytes. *Virology* **437**, 12–19 (2013).
69. Young MM, Takahashi Y, Khan O, Park S, Hori T, Yun J, Sharma AK, Amin S, Hu CD, Zhang J, Kester M, W. H. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **287**, 12455–68 (2012).
70. Oral O, Oz-Arslan D, Itah Z, Naghavi A, Deveci R, Karacali S, G. D. Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis* **17**, 810–20 (2012).
71. Han, J. *et al.* A complex between Atg7 and caspase-9: A novel mechanism of cross-regulation between autophagy and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **289**, 6485–6497 (2014).
72. Lamy, L. *et al.* Control of autophagic cell death by caspase-10 in multiple myeloma. *Cancer Cell* **23**, 435–449 (2013).
73. Norman JM, Cohen GM, B. E. The *in vitro* cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy* **6**, 1042–56 (2010).
74. Lassen KG, Kuballa P, Conway KL, Patel KK, Becker CE, Peloquin JM5, Villablanca EJ, Norman JM, Liu TC, Heath RJ, Becker ML, Fagbami L, Horn H, Mercer J, Yilmaz OH, Jaffe JD, Shamji AF, Bhan AK, Carr SA, Daly MJ, Virgin HW, Schreiber SL, Stappenbeck TS, X. R.

- Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 7741–6 (2014).
75. Tiwari M, Sharma LK, Vanegas D, Callaway DA, Bai Y, Lechleiter JD, H. B. A nonapoptotic role for CASP2/caspase 2: modulation of autophagy. *Autophagy* **10**, 1054–70 (2014).
76. Pyronnet, S., Dostie, J. & Sonenberg, N. Suppression of cap-dependent translation in mitosis. 2083–2093 (2001). doi:10.1101/gad.889201.1
77. Andjelkovic, M. *et al.* Role of Translocation in the Activation and Function of Protein Kinase B. *J. Biol. Chem.* **272**, 31515–31524 (1997).
78. Stambolic, V. *et al.* Regulation of PTEN Transcription by p53. **8**, 317–325 (2001).
79. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, H. P. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. **75(3):495-**, 495–505
80. Matheny, R. W. & Adamo, M. L. Current Perspectives on Akt Akt-ivation and Akt-ions. *Exp. Biol. Med.* **234**, 1264–1270 (2009).
81. Romano, G. The Role of the Dysfunctional Akt-Related Pathway in Cancer: Establishment and Maintenance of a Malignant Cell Phenotype, Resistance to Therapy, and Future Strategies for Drug Development. *Scientifica (Cairo)*. **2013**, 317186 (2013).
82. Vadlakonda, L., Dash, A., Pasupuleti, M., Anil Kumar, K. & Reddanna, P. The Paradox of Akt-mTOR Interactions. *Front. Oncol.* **3**, 165 (2013).
83. Pim, D., Massimi, P., Dilworth, S. M. & Banks, L. Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A. *Oncogene* **24**, 7830–8 (2005).
84. Sarbassov, D. D., Guertin, D. a, Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation

- of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098–101 (2005).
85. Guertin, D. a *et al.* Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev. Cell* **11**, 859–71 (2006).
 86. Schroder, W. a *et al.* Human Sin1 contains Ras-binding and pleckstrin homology domains and suppresses Ras signalling. *Cell. Signal.* **19**, 1279–89 (2007).
 87. Rodrik-Outmezguine, V. S. *et al.* mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. *Cancer Discov.* **1**, 248–59 (2011).
 88. Julien, L. & Roux, P. P. mTOR , la cible fonctionnelle de la rapamycine. (2010).
 89. Dibble, C. C. & Manning, B. D. A molecular link between AKT regulation and chemotherapeutic response. *Cancer Cell* **16**, 178–80 (2009).
 90. Petroulakis, E., Mamane, Y., Le Bacquer, O., Shahbazian, D. & Sonenberg, N. mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy. *Br. J. Cancer* **94**, 195–9 (2006).
 91. Zhang, X.-Y., Zhang, H.-Y., Zhang, P.-N., Lu, X. & Sun, H. Elevated phosphatidylinositol 3-kinase activation and its clinicopathological significance in cervical cancer. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **139**, 237–44 (2008).
 92. Wang, S. *et al.* HPV E6 induces eIF4E transcription to promote the proliferation and migration of cervical cancer. *FEBS Lett.* **587**, 690–7 (2013).
 93. Ji WT, L. H. PI3K-Akt signaling and viral infection. *Recent Pat Biotechnol.* **2**, 218–26 (2008).
 94. Jordan, T. X. & Randall, G. Manipulation or capitulation: virus interactions with autophagy. *Microbes Infect.* **14**, 126–39 (2012).
 95. Menges, C. W., Baglia, L. a, Lapoint, R. & McCance, D. J. Human papillomavirus type 16

- E7 up-regulates AKT activity through the retinoblastoma protein. *Cancer Res.* **66**, 5555–9 (2006).
96. Spangle, J. M. & Münger, K. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein activates mTORC1 signaling and increases protein synthesis. *J. Virol.* **84**, 9398–407 (2010).
97. Charette, S. T. & McCance, D. J. The E7 protein from human papillomavirus type 16 enhances keratinocyte migration in an Akt-dependent manner. *Oncogene* **26**, 7386–90 (2007).
98. Gagnon, V., Mathieu, I., Sexton, E., Leblanc, K. & Asselin, E. AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells. *Gynecol. Oncol.* **94**, 785–95 (2004).
99. Dan, H. C. *et al.* Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J. Biol. Chem.* **279**, 5405–12 (2004).
100. Jiang, C., Yi, X.-P., Shen, H. & Li, Y.-X. Targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibits pancreatic cancer cell growth through p-Akt depletion. *World J. Gastroenterol.* **18**, 2956–65 (2012).
101. Asselin, E., Mills, G. B. & Tsang, B. K. XIAP Regulates Akt Activity and Caspase-3-dependent Cleavage during Cisplatin-induced Apoptosis in Human Ovarian Epithelial Cancer Cells. 1862–1868 (2001).
102. Gagnon, V., Van Themsche, C., Turner, S., Leblanc, V. & Asselin, E. Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis* **13**, 259–71 (2008).
103. Wu, H.-H. *et al.* cIAP2 upregulated by E6 oncoprotein via epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway confers resistance to cisplatin in human papillomavirus 16/18-infected lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 5200–10 (2010).

104. Yuan, H. *et al.* Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. *Oncogene* **24**, 5069–78 (2005).
105. James, M. a, Lee, J. H. & Klingelutz, A. J. Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *J. Virol.* **80**, 5301–7 (2006).
106. Hong, S. Y. *et al.* Involvement of two NF-kappa B binding elements in tumor necrosis factor alpha -, CD40-, and epstein-barr virus latent membrane protein 1-mediated induction of the cellular inhibitor of apoptosis protein 2 gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 18022–8 (2000).
107. Bachelder, R. E., Wendt, M. a, Fujita, N., Tsuruo, T. & Mercurio, a M. The cleavage of Akt/protein kinase B by death receptor signaling is an important event in detachment-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 34702–7 (2001).
108. Kurokawa, M. & Kornbluth, S. Caspases and kinases in a death grip. *Cell* **138**, 838–54 (2009).
109. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33–42 (2000).
110. Yang, Q.-H. & Du, C. Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 16963–70 (2004).
111. Vince, J. E. *et al.* IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**, 682–93 (2007).
112. Galluzzi, L. *et al.* Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* **5**, e1257 (2014).

113. Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265–79 (2003).
114. Brenner, C. & Grimm, S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* **25**, 4744–56 (2006).
115. Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, M. U. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* **149**, 1536–1548 (2012).
116. Zhu, H. *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des. Dev. Ther.* **10**, 1885–1895 (2016).
117. Roodhart, J. M. L. *et al.* Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell* **20**, 370–83 (2011).
118. Nakasone ES1, Askautrud HA, Kees T, Park JH, Plaks V, Ewald AJ, Fein M, Rasch MG, Tan YX, Qiu J, Park J, Sinha P, Bissell MJ, Frengen E, Werb Z, E. M. Imaging tumor-stroma interactions during chemotherapy reveals contributions of the microenvironment to resistance. *Cancer Cell* **21**, 488–503
119. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31**, 1869–83 (2012).
120. Ji, J. & Zheng, P.-S. Activation of mTOR signaling pathway contributes to survival of cervical cancer cells. *Gynecol. Oncol.* **117**, 103–8 (2010).
121. Lee, S., Choi, E.-J., Jin, C. & Kim, D.-H. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. *Gynecol. Oncol.* **97**, 26–34 (2005).
122. Wong, S. W. *et al.* Rapamycin synergizes cisplatin sensitivity in basal-like breast cancer

- cells through up-regulation of p73. *Breast Cancer Res. Treat.* **128**, 301–13 (2011).
123. Cho, E.-A., Oh, J.-M., Kim, S.-Y., Kim, Y. & Juhnn, Y.-S. Heterotrimeric stimulatory GTP-binding proteins inhibit cisplatin-induced apoptosis by increasing X-linked inhibitor of apoptosis protein expression in cervical cancer cells. *Cancer Sci.* **102**, 837–44 (2011).
 124. Venkatraman, M., Anto, R. J., Nair, A., Varghese, M. & Karunakaran, D. Biological and chemical inhibitors of NF-kappaB sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis. *Mol. Carcinog.* **44**, 51–9 (2005).
 125. Vaisman, C. E. ANÁLISIS DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR CISPLATINO EN CELULAS C33A TRANSFECTADAS CON PRODUCTOS DE SPLICING DE LOS ONCOGENES E6/E7. (CINVESTAV, 2013).
 126. Aréchaga-Ocampo E , Pereira-Suárez AL , del Moral-Hernández O , Cedillo-Barrón L , Rodríguez-Sastre MA , Castillo-Alvarez A , López-Bayghen E, V.-S. N. HPV+ cervical carcinomas and cell lines display altered expression of caspases. *Gynecol. Oncol.* **108**, 10–18 (2007).
 127. Moreno Campuzano, S. Análisis de la resistencia a apoptosis de las líneas de carcinoma cervical. (CINVESTAV, 2008).
 128. Kuma A, Matsui M, M. N. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy* **3**, 323–328 (2007).
 129. Mizushima, N. & Yoshimori, T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542–545 (2007).
 130. Paramio JM, Navarro M, Segrelles C, Gomez-Casero E, J. J. PTEN tumour suppressor is linked to the cell cycle control through the retinoblastoma protein. *Oncogene* **18**, 7462–

- 7468 (1999).
131. S N Stacey, D Jordan, P J Snijders, M Mackett, J. M. W. and J. R. A. Translation of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from bicistronic mRNA is independent of splicing events within the E6 open reading frame. *J. Virol.* **69**, 7023–7031 (1995).
 132. Thomas, M., Pim, D. & Banks, L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* **18**, 7690–700 (1999).
 133. Filippova, M. *et al.* The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J. Virol.* **81**, 4116–29 (2007).
 134. Filippova, M. *et al.* Complexes of human papillomavirus type 16 E6 proteins form pseudo-death-inducing signaling complex structures during tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *J. Virol.* **83**, 210–27 (2009).
 135. Daisuke, K. *et al.* Inhibition of caspase-9 activity and Apaf-1 expression in cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma cells. *Auris Nasus Larynx* **30**, 85–88 (2003).
 136. Jacqueline C. Shultz, Rachel W. Goehe, D. Shanaka Wijesinghe, Charuta Murudkar, Amy J. Hawkins, Jerry W. Shay, John D. Minna, and C. E. C. Alternative splicing of Caspase 9 is modulated by the PI3K/Akt pathway via phosphorylation of SRp30a. *Cancer Res.* **70**, 9185–9196 (2010).
 137. Moscat Jorge, M. T. D.-M. p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. *Cell* **137**, 1001–1004 (2009).
 138. Bracho-Valdés, I. *et al.* mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. *IUBMB Life* **63**, 896–914 (2011).

