

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**Efecto de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV16 en la actividad de NF κ B en una
línea celular de queratinocitos (HaCaT)**

T E S I S

Que presenta:

M en C Norberto Iván Bautista Gaytán

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias

En la especialidad de:

Biomedicina Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Ciudad de México

Febrero, 2023

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 1 del departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, el autor contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre y muy querido amigo *Víctor Bautista De la Rosa*, quien fue un gran ejemplo de perseverancia y me enseñó que ante toda adversidad con convicción y esfuerzo se puede lograr lo que cada uno se propone. Por tu cariño, tus cuidados, tus consejos, tolerancia y atenciones.
¡Gracias, papá! siempre te tengo presente en mi mente.

A la memoria de mi querida prima *Yadira Bautista*, con quien crecí y nos considerábamos hermanos, nunca olvidaré esa chispa y alegría que transmitías a todos.

A la memoria de mi abuelita *Catalina Nicolás* “mamá Cata” gracias a todo su esfuerzo que en conjunto con el de mis abuelitos; abue Tino, abue Beto y abuelita Lili yo tuve acceso a la educación, sin su apoyo, esfuerzo y consejos, nada de esto hubiera sido posible.

A la memoria de mi querido tío *Orión Bautista De la Rosa*, gran ejemplo de rectitud, por haber sido tan solidario y justo con todos, por sus sabios consejos y sus buenas bromas, siempre lo recordaré.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, por haber dirigido este proyecto de investigación, por su tolerancia y su disposición para compartir su amplio conocimiento.

A los miembros de mi comité, por su asesoría y tiempo dedicado aportando al presente proyecto;

Dra. Leticia Cedillo Barrón,

Dra. Rosaura Hernández Rivas,

Dra. Elena Aréchaga Ocampo,

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Al Biólogo Raúl Bonilla Moreno, por el apoyo brindado en la fase experimental.

A mis compañeros del laboratorio, por su amistad y gran apoyo,

M. en C. Remberto Conde,

Dr. Jesús Israel García Aguiar,

Dr. Macario Martínez Castillo,

Dra. Carolina Vaisman,

Al C. Víctor Manuel Ortiz Santiago, por su apoyo y ayuda técnica en el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Icaua Acoyani Chávez Sandoval, por tu apoyo incondicional, tu amor, tus cuidados, disposición, compromiso y esfuerzo en cada una de las cosas que llevamos a cabo juntos, gracias por el gran equipo que somos y el crecimiento personal que he tenido por tu influencia, por brindar felicidad y tranquilidad a mi vida, ¡Te amo guapa!

A mi mamá Julieta Gaytán Nicolás, por tu constancia, trabajo duro y apoyo, eres el pilar de nuestra formación y de la familia. Gracias a tu fortaleza, ejemplo y la dedicación que pusiste en nosotros es que puedo culminar esta etapa.

A mi hermano y amigo Erwin Francisco Bautista Gaytán y mi cuñada Ilse Magaly Vázquez Padilla, por la alegría que nos comparten, el apoyo que siempre están dispuestos a dar, por estar siempre atentos a nosotros y ser un ejemplo para todos, ¡gracias!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	8
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN	14
CÁNCER CERVICOUTERINO Y HPV	15
CICLO VIRAL DE HPV.....	16
PAPEL DE LAS PROTEÍNAS E6 Y E7 EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER	17
INFLAMACIÓN Y CÁNCER DE CÉRVIX.....	19
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B.....	21
VÍAS CLÁSICA Y ALTERNA DE NF- κ B	22
ANTECEDENTES	24
NF- κ B EN EL EPITELIO	24
NF- κ B Y HPV.....	27
ANTECEDENTES DIRECTOS	28
JUSTIFICACIÓN.....	30
HIPÓTESIS	31
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
METODOLOGÍA	32
CULTIVO CELULAR	32
WESTERN BLOT.....	34
RT-PCR	35
INMUNOFLUORESCENCIA	37
ELISA PARA DETECCIÓN DE TNF-A	38
ENSAYOS DE MUERTE CELULAR.....	39
RESULTADOS.....	40
TRANSFECCIÓN DE E6/E7 EN LA LÍNEA CELULAR DE QUERATINOCITOS HACAT.	40
VALIDACIÓN DEL MODELO DE TRANSFECCIÓN CONSTITUTIVA	43
EXPRESIÓN DEL REPORTERO GFP EN CÉLULAS TRANSFECTADAS	44
EXPRESIÓN DE LOS COMPONENTES DE LAS VÍAS CLÁSICA Y ALTERNA DE NF- κ B EN EL MODELO TRANSFECTADO	45
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MENSAJERO DE GENES REGULADOS POR NF- κ B	47
ENSAYOS DE MUERTE CELULAR EN LÍNEA CELULAR HACAT (NO TRANSFECTADA)	48
DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CIAP 1 Y 2 EN HACAT	49
DETECCIÓN DE TNF-A MEDIANTE ELISA Y WB	50

ACTIVACIÓN DE LA VÍA ALTERNA DE NF-KB POR BNPT Y EXPRESIÓN DE RECEPTORES 1 Y 2 DE TNF-A EN CÉLULAS HACAT.	51
DISCUSIÓN	53
CONCLUSION	60
RESUMEN DE RESULTADOS	60
PERSPECTIVAS	61
REFERENCIAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

FIGURA 1. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS COMPONENTES DE NFKB EN LÍNEAS CELULARES HPV+.....	28
FIGURA 2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN NUCLEAR Y CITOPASMÁTICA DE LOS COMPONENTES DE LA VÍA CLÁSICA Y ALTERNA DE NFKB EN HACAT	29
FIGURA 3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS COMPONENTES RELACIONADOS A LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA CLÁSICA Y ALTERNA DE NFKB EN CONDICIONES BASALES.....	30
FIGURA 4. EXPRESIÓN DEL BICISTRÓN DE E6E7 EN HACAT TRANSFECTADA.....	40
FIGURA 5. EXPRESIÓN DE MENSAJERO DE E7/E7 EN HACAT TRANSFECTADAS CON E6E7	41
FIGURA 6. EXPRESIÓN DE NEOMICINA EN HACAT TRANSFECTADAS ESTABLEMENTE	42
FIGURA 7. EXPRESIÓN DEL MENSAJERO DE E7 EN HACAT TRANSFECTADAS CON EL BICISTRÓN DE E6E7	42
FIGURA 8. DECREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE P53 Y RB EN PSBIGN6/E7, CON RESPECTO A HACAT Y PSBIGN. MODELO VÁLIDO	43
FIGURA 9. EXPRESIÓN DEL TRANSCRITO DE GFP EN CÉLULAS HACAT TRANSFECTADAS CON EL BICISTRÓN DE E6E7.....	44
FIGURA 10. EXPRESIÓN DE GFP EN CÉLULAS HACAT TRANSFECTADAS CON EL BICISTRÓN DE E6E7.....	45
FIGURA 11. EXPRESIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA VÍA CLÁSICA Y ALTERNA DE NF-KB EN CÉLULAS HACAT TRANSFECTADAS CON E6/E7 EN EXTRACTOS TOTALES (PANEL A) Y FRACCIONES N/C (PANEL B)	46
FIGURA 12. EXPRESIÓN DE MENSAJERO DE: CIAP1, 2 Y TNFA EN HACAT Y HACAT TRANSFECTADAS CON E6E7	48
FIGURA 13. ENSAYOS DE MUERTE CELULAR, LÍNEA CELULAR HACAT EN PRESENCIA DE DIFERENTES ESTÍMULOS APOPTÓTICOS. SE OBSERVA EFECTO ÚNICAMENTE EN PRESENCIA DE BAY 30M.....	49
FIGURA 14. DECREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE CIAP 1 Y 2 EN HACAT TRATADAS BNPT (A) PROTEÍNA Y (B) MENSAJERO.....	50
FIGURA 15. SECRECIÓN DE TNF A (SOLUBLE), ÚNICAMENTE EN PRESENCIA DE BAY 30MM	51
FIGURA 16. EXPRESIÓN DE TNFR1, 2 RELB Y NIK EN HACAT TRATADAS CON BNPT	52
FIGURA 17. FRACCIONES NÚCLEO/CITOPLASMA DE HACAT TRATADAS CON BNPT	53

Tablas

TABLA 1. CONDICIONES Y SECUENCIAS USADAS PARA LOS ENSAYOS DE PCR	36
TABLA 2. COMPONENTES DE TRANSFECCIÓN CELULAR	38

ABREVIATURAS

°C.- Grados centígrados

ARD.- Dominio de repetidos de ankirina

BAFFR.- Receptor del factor activador de células B

C terminal.- Carboxilo terminal

Ca.- Calcio

CaCl.- Cloruro de calcio

CaR.- Receptor de calcio

CD40L.- CD40 ligando

CD40R.- Receptor de CD40

cIAP1/2.- Proteína inhibidora de la apoptosis

CTD.- Dominio C terminal

DAG.- Diacilglicerol

DD.- Dominio de muerte

DMEM.- Medio Eagle modificado Dulbecco

FBS.- Suero Fetal Bovino

GAPDH.- Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa

GM-CSF.- Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

HaCaT.- Queratinocitos humanos inmortalizados

hnRNPA1.- Ribonucleoproteína heterogénea A1

ICAM.- Molécula de adhesión intercelular

IKK.- Cinasa de I κ B

IL1.- Interleucina 1

IL1R.- Receptor de Interleucina 1

INF.- Interferón

IP3.- Fosfatidil Inositol

I κ B.- Inhibidor de NF κ B

LT β R.- Receptor de linfotoxina beta

N terminal.- Amino terminal

nm.- nanómetros

NF κ B.- Factor nuclear κ B

NIK.- Cinasa inductora de NF κ B

NLS.- Señal de localización nuclear

NTD.- Dominio N terminal

PAMPs.- Patrones moleculares asociados a patógenos

pb.- pares de bases

PBS.- Buffer de fosfatos

PCR.- Reacción en cadena de la Polimerasa

PFA.- Para formaldehido

PI3K.- Cinasa de fosfatidil 3 inositol

PID.- Dominio inhibitorio de procesamiento

PKC.- Proteína cinasa C

PLC.- Fosfolipasa C

RHR.- Región de homología Rel

RIP.- Proteína que interactúa con receptor

rpm.- Revoluciones por minuto

SILs.- Lesiones intraepiteliales escamosas

TAD.- Dominio de transactivación

TAE.- Tris. Ácido acético, EDTA

TAK.- Cinasa activada de TGF beta

TGF β .- Factor de crecimiento transformante beta

TLR.- Receptor tipo Toll

TNA alfa.- Factor de necrosis tumoral alfa

TNR1/2.- Receptor del factor de necrosis tumoral

TRADD.- Proteína con Dominio de muerte asociada al TNFR1

TRAF.- Factor asociado al TNFR

TRANCE R.- Receptor activador del factor nuclear κ B

VPH.- Papiloma virus humano

μ g.- Microgramos

μ l.- Microlitros

RESUMEN

La infección por HPV 16 es un factor de predisposición al desarrollo del Cáncer Cervicouterino, particularmente la actividad de las oncoproteínas virales E6 y E7 de HPV16 está relacionada con el proceso de transformación celular que lleva a la malignización y desarrollo tumoral. El factor de transcripción NF- κ B, está involucrado en la regulación de diversas moléculas participantes en diferentes procesos celulares, por lo que su actividad puede estar involucrada en el desarrollo de diversas patologías tales como el cáncer de cérvix. La relación entre la actividad de E6 y E7 de HPV16 con la regulación de NF- κ B durante el proceso de infección por Papilomavirus es un campo de investigación poco explorado. El presente proyecto tiene por objetivo entender si la presencia de E6 y E7 afecta la actividad de las vías clásica y alterna de NF- κ B usando como modelo la línea celular de queratinocitos inmortalizados HaCaT transfectado con el bicistrón de E6/E7. Se logró obtener un modelo viable de células HaCaT que expresan E6/E7 de HPV16 constitutivamente y en respuesta a un estímulo, sin embargo, esta expresión de E6 y E7 no parece modificar el patrón de expresión de los componentes de las vías clásica y alterna de NF- κ B con respecto al control. La expresión constitutiva de E6 y E7 produce aumento en la expresión del mensajero de TNF alfa. En condiciones normales de cultivo para células HaCaT, se hicieron ensayos funcionales de apoptosis en presencia de diversos compuestos. Se observó que la línea celular es resistente a muerte por TNF alfa y BNPT (inhibidor de cIAP 1 y cIAP 2) por lo que se deduce que la resistencia a muerte está relacionada a la activación de la vía clásica y alterna de NF- κ B, respectivamente; sin embargo, en presencia de BAY (inhibidor de la Cinasa de I κ B - IKK) las células presentan alto índice de muerte y secreción de TNF alfa soluble, por lo que se sugiere la importancia de la vía clásica de NF- κ B en la supervivencia celular.

ABSTRACT

HPV 16 infection is a predisposing factor for Cervical Cancer development, particularly the activity of viral oncoproteins E6 and E7 of HPV16 is related to cell transformation process that leads to malignancy and tumor formation process. The NFkB transcription factor is involved in the regulation of several molecules involved in different cellular processes, such as inflammation, resistance to apoptosis and differentiation, so NFkB activity may be involved in the development of several pathologies such as cervical cancer. The relationship between the activity of E6 and E7 of HPV16 with the regulation of NFkB during the Papillomavirus infection process is an unexplored field of research, understanding the relationship between the NFkB signaling pathways (classical and alternative) with the activity of E6 and E7 have particular importance in understanding the development of cervical cancer. The main of this project is to understand whether the presence of E6 and E7 affects the activity of the classical and alternative pathways of NFkB using the immortalized keratinocyte cell line HaCaT transfected with the E6/E7 bicistron as a model. We obtain a viable model of HaCaT cells that express HPV16 E6/E7 constitutively and in response to a stimulus, however, E6 and E7 expression does not seem to modify the expression pattern of the components of the classical and alternative pathways relative to control. Constitutive expression of E6 and E7 leads to increased expression TNF alfa messenger. In non-transfected basal conditionals, functional tests of resistance to death were carried out in the presence of various compounds that cause apoptosis, finding that the HaCaT cell line is resistant to death by TNF alfa and BNPT, the resistance is related to the activation of the pathways classical and alternative respectively; however, in the presence of BAY, cells show a high rate of death and secretion of soluble TNF alfa, which suggests the importance of the classic NF-kB pathway in cell survival.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los tumores derivan de células de origen epitelial; un epitelio puede definirse como el tejido que cubre superficies lisas en el cuerpo. Se han descrito diferentes tipos de epitelio, dentro de los cuales se encuentra el epitelio escamoso estratificado; en este, las células están dispuestas una encima de otra a manera de formar estratos. Podemos encontrar este tipo epitelial en cornea, boca, esófago, cérvix y piel (Wright, 1985). En la epidermis, este tipo de epitelio provee de una barrera física y permeable. Los queratinocitos son las células predominantes en la epidermis y continuamente se están regenerando, este proceso es conocido como cornificación (Steven, 1994). Los queratinocitos se mueven de un tipo celular proliferativo en la capa basal y terminan en la formación del estrato cornificado también conocido como *stratum corneum* (la cornificación ocurre en las capas más suprabasales), todo este proceso tiene como resultado la diferenciación de la epidermis (Reichert, 1993). La proliferación, diferenciación y muerte celular ocurren secuencialmente durante la diferenciación del queratinocito; su diferenciación es caracterizada por la expresión de proteínas específicas (loricrina, filagrina, involucrina y citoqueratinas específicas). En un epitelio sano, el rango de proliferación en la capa basal es balanceado con la descamación en la capa cornificada, esta homeostasis constantemente regenera la epidermis (Lippens, 2005).

Los queratinocitos son el blanco celular de infección de papiloma virus humano (HPV), el cual está asociado al desarrollo de cáncer cervical, los subtipos de HPV 16, 18 y 33 están fuertemente implicados como agentes causantes en la etiología del cáncer cervical con sus precursores designados: lesiones intra epiteliales escamosas (SILs); el virus por sí solo, no es suficiente para el desarrollo de cáncer (Chen, 1993).

Cáncer cervicouterino y HPV

El carcinoma cervical es el séptimo cáncer más común y representa el 13% de tipos de cáncer femenino, seguido del cáncer de mama. Más del 85% de casos de carcinoma cervical se presenta en países en desarrollo (Bharat, 2014). La incidencia de esta patología varía dependiendo de regiones, siendo la incidencia más alta en la república de Guinea y Zambia, en África. La prevalencia es mayor en países donde el índice de desarrollo humano es bajo (Ferlay, 2010). Dentro de todos los tipos de HPV categorizados, 12 son denominados de alto riesgo por la organización mundial de la salud, los más relevantes son: 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59; cabe destacar que los subtipos 16 y 18 de HPV son asociados con alta probabilidad de desarrollo de cáncer cervical (Bharat, 2014) y por lo tanto, la infección por HPV de alto riesgo, es un factor para su predisposición. La infección por HPV, es la más común alrededor del mundo en individuos sexualmente activos, se estima que alrededor de 291 millones de mujeres en el mundo están infectadas por el virus, con mayor prevalencia en mujeres menores de 25 años. (de Sanjose, 2007).

Estudios prospectivos han demostrado que la prevalencia de infección por HPV incluye una mezcla de infecciones incidentales y persistentes que se han acumulado en el tiempo (Castle, 2005 y Munoz, 2004), más del 90% de infección por el virus en cualquier edad, remite en 6 a 18 meses. La infección persistente es requisito para la progresión a una neoplasia intraepitelial cervical (CIN). CIN I es un signo histopatológico de lesión temprana por infección por HPV, CIN 2 incluye un grupo heterogéneo de lesiones que tienen diferente potencial de progresar a cáncer de cérvix, finalmente CIN 3 representa clínicamente las lesiones más relevantes previas al cáncer, la probabilidad de erradicar el papiloma virus depende de la duración de la infección (Maucort-Boulch, 2010 y Rodríguez, 2010); es decir, una persistencia larga, reduce la probabilidad de erradicarlo.

Alrededor del mundo, el tipo de HPV más común es el 16 (57%), seguidos del 18 (16%), 58, 33 y 45 (5%) (Crosbie, 2013). Aproximadamente, 610,000 casos han sido atribuidos a la infección por HPV (5% de todos los cánceres), de los cuales, aproximadamente 530,000 casos son cáncer de cérvix y 24,000 de cáncer anal (Machalek, 2012). Otros tipos de cáncer asociados a la infección por HPV incluyen el de pene, vulva y oral faríngeo (de Martel, 2012).

Ciclo viral de HPV

Los papilomavirus son virus pequeños de DNA, que muestran tropismo por epitelios escamosos, e infectan la capa basal de un epitelio escamoso estratificado. Las células basales resultan expuestas debido a micro abrasiones en la superficie epitelial; estas células son las únicas en proliferación en un epitelio normal, la síntesis de viriones ocurre únicamente después de que la célula infectada entra en mitosis y comienza a diferenciarse (Duensing, 2004).

HPV infecta el epitelio mediante la unión de L1 a proteoglicanos tipo heparán sulfato (HPSGs) en la base expuestas por la abrasión, esta unión induce un cambio conformacional en la cápside, revelando el N terminal de L2 y dejándolo disponible para la escisión por furina extracelular. El procesamiento de L2 por furina es un requisito para la internalización del virus por la célula (Doorbar, 2012). La internalización del virus ocurre vía vesículas endosomales mediadas por L1, mientras que L2 es esencial en el acoplamiento al retrómero y forma compleja con el genoma viral a la red Trans-Golgi (Day, 2013). Finalmente, la entrada de L2 en complejo con el genoma viral al núcleo, ocurre al inicio de la mitosis (Pyeon, 2009) y se asocia con cuerpos nucleares denominados ND-10 para iniciar la transcripción viral (Day, 2004). Una vez que el DNA viral es liberado de la cápside y transportado al núcleo de la célula hospedera se encuentra como material genético libre o episomal extra cromosomal, aproximadamente 50 a 100 copias por célula (Crosbie, 2013).

El genoma de HPV es pequeño (aproximadamente 8kb) y no codifica polimerasas y otras enzimas necesarias para la replicación viral, por lo tanto, depende de las proteínas de la célula hospedera para la síntesis de DNA viral. En las infecciones de HPV, las células suprabasales continúan activas en el ciclo celular a medida que se van diferenciando, un subconjunto de células suprabasales vuelven a entrar en fase S del ciclo celular para replicar el genoma viral en un proceso llamado amplificación (Cheng, 1995).

Papel de las proteínas E6 y E7 en el desarrollo del cáncer

Las proteínas virales E6 y E7 en conjunto promueven la proliferación celular, prolongan la progresión del ciclo celular y previenen la apoptosis (Crosbie, 2013). Las proteínas de Retinoblastoma (Rb) consisten en: p105 (RB), p107 y p130, la proteína RB, es un regulador negativo de la transcripción al formar complejos con miembros de la familia del factor de transcripción E2F. Mientras RB se encuentre en estado hipo fosforilado se mantiene unido al dímero E2F-DP (Dimerization Partner), en la fase G0 y G1 del ciclo celular, cuando RB es fosforilado en la fase S mediante el complejo Ciclina D/ CDK4 se libera el hetero dímero E2F-DP, el cual promueve la síntesis de mensajeros de Ciclina D, Ciclina E y Ciclina A. (Kaelin, 1999).

La proteína E7 de HPV se une a los miembros de la familia RB, llevándolos a su degradación (Dyson, 1989), como resultado de esta acción, se libera el factor de transcripción E2F, permitiendo mantener la expresión constitutiva de genes de la fase S. Particularmente las proteínas E7 de los subtipos de alto riesgo de HPV se unen con mayor afinidad a RB (Cage, 1990 y Munger, 1989). Los sitios de unión a E2F se encuentran en promotores de genes involucrados en la progresión del ciclo celular, diferenciación, mitosis y apoptosis (DeGregori, 2006). E7 también se une a deacetilasas de histonas (HDACs), en secuencias distintas a las de unión con RB, llevando a la formación del complejo E7-RB-HDAC que es esencial para mantener el genoma viral episomal y por lo tanto, necesario para la replicación viral productiva en células suprabasales (Longworth, 2004 y 2005).

Los inhibidores de cinasas de Ciclina (CDK), p21 y p27, tienen un papel como reguladores de arresto de crecimiento durante la diferenciación epitelial, e inhiben principalmente a CDK2. Particularmente p21 actúa como supresor de tumores en la carcinogénesis cervical (Shin, 2009). El carboxilo terminal de E7 se une a p21 o p27 neutralizando así sus efectos como inhibidores sobre CDK2 y activa a las Ciclina E y Ciclina A en el ciclo celular, necesarias para activar la fase S del ciclo celular (Jones, 1997 y Zeffass-Thome 1996).

En la mayoría de los cánceres, la proteína supresora de tumores p53 adquiere mutaciones, esta actúa en respuesta al daño en el DNA como factor de transcripción y activa una gran variedad de programas anti proliferativos tales como apoptosis, arresto en el ciclo celular, senescencia y modulación de la autofagia (Zilfou, 2009). Como consecuencia de las acciones de E7, los niveles de p53 aumentan (Demers, 1994) con la finalidad de llevar a apoptosis a las células infectadas, para contrarrestar este efecto, la proteína E6 usa diferentes mecanismos para interferir con las funciones de p53. Mediante el reclutamiento de la proteína asociada de E6 con función de ubiquitina ligasa (E6AP), E6 forma un complejo heterotrimérico E6-E6AP-p53 que promueve la degradación de p53 (Scheffner, 1990 y 1993). E6 de los subtipos de HPV de bajo riesgo, también se asocian con E6AP; sin embargo, no lleva a la degradación de p53 (Li, 1996), por lo que se sugiere que el complejo E6-E6AP tiene otros blancos celulares.

Cabe destacar que a pesar de la reducción de la expresión de p53 descrita anteriormente, esta aún puede activarse en respuesta al daño en DNA y otro tipo de estímulos de estrés. Otro mecanismo por el cual p53 es regulado negativamente por E6, es mediante la unión de esta con acetil transferasas de histonas, tales como; p300, proteína de unión a CREB (CBP) y ADA3, a esta última también E6 la lleva a degradación; todas estas proteínas promueven la acetilación de p53, lo que incrementa su actividad, sin embargo, este mecanismo es afectado por E6 de HPV (Patel 1999; Zimmermann, 1999; Kumar, 2002).

Otra característica adicional de las células transformadas es la activación de la telomerasa, enzima encargada de la replicación de DNA en los extremos de los cromosomas, llamados telómeros (Artandi, 2009). E6 de HPV activa la transcriptasa reversa de la telomerasa (TERT), representando otro mecanismo que puede llevar a la inmortalización celular. El complejo E6-E6AP, interactúa con cMYC e incrementa su actividad y modula la expresión de USF1 y USF2, los represores del promotor de TERT2, promoviendo a los activadores de TERT tales como NFX123 (Wise-Draper 2008 y Katzenellenbogen, 2009). Por otro lado, también hay un reporte que indica la interacción de E7 de HPV18 con cMYC, aumentando su actividad y habilidad para unirse al promotor de hTERT (Wang, 2007). Las proteínas virales E6 y E7 son clave para el mantenimiento del fenotipo transformado, esto debe de ser consistente en un periodo de infección prolongado, para dar paso a la malignización celular. En conjunto, la actividad de las proteínas virales E6 y E7 de HPV de alto riesgo, favorecen la replicación viral productiva y por lo tanto, la inestabilidad genómica, lo que lleva a la transformación celular e inmortalización, siendo ambos cooperadores clave para el desarrollo de cáncer de cérvix.

Inflamación y cáncer de cérvix

La inflamación crónica está involucrada en la progresión de la transformación celular, supervivencia, proliferación, invasión y metástasis. Los procesos de inflamación involucran eventos de remodelación de tejidos, provocados por alteraciones en la función epitelial, vascular e inmune, estos eventos ocurren por la participación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, además por la activación de factores de transcripción tales como el factor nuclear κ B (NF- κ B), STAT3 y HIF-1. (Bharat, 2014).

Se ha descrito un mecanismo en el que E7 lleva al incremento en la producción de Óxido nítrico (NO), lo que produce daño en el DNA y activación de ciclooxigenasa 2 (COX2) e incremento de la inflamación, durante la formación del tumor. COX es la enzima encargada de la producción de

prostaglandinas a partir de ácido araquidónico. Se han reportado 2 isoformas: COX 1 (constitutiva) y COX2 (inducible por citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y oncogenes), estas prostaglandinas pueden promover la angiogénesis e incrementar la proliferación celular (Wang, 2018).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), es una citocina proinflamatoria que puede promover la formación de tumores, angiogénesis y metástasis (Bharat, 2014); es una proteína de 26 kDa que se escinde de la membrana por la actividad de la metaloproteinasa ADAM 17 o enzima convertidora de TNF- α (TACE), liberando una fracción soluble de 17 kDa (Black, 1997). Una vez que este se une a su receptor (TNFR1 Y 2), lleva a la activación de la vía de señalización de NF- κ B transmitiendo la señal intracelularmente, donde proteínas adaptadoras inician la cascada de señalización que lleva a la activación de la cinasa de I κ B (IKK), esta fosforila a I κ B provocando su degradación en el proteosoma y permite así la translocación del dímero de NF- κ B al núcleo (p50/p65) donde promoverá la transcripción de los genes que regula (Napestchnig, 2013), esta vía es considerada canónica o clásica; este mecanismo tiene por finalidad promover la supervivencia celular y señales pro inflamatorias. Por otro lado, la activación de TNFR1 por TNF- α , también puede iniciar la señalización hacia apoptosis, este proceso involucra la unión de la proteína con dominio de muerte (DD) asociada a Fas (FADD) a TRADD con el subsecuente reclutamiento de la caspasa 8 al complejo (TNFR-TRADD). La activación catalítica de caspasa 8 libera su forma activa, lo que inicia la apoptosis, mediante la activación de la pro-caspasa 3 (Bradley, 2008). El reclutamiento y la activación de la pro-caspasa 8 puede ser inhibido por cFLIP y lleva a la activación de NF- κ B lo que previene la señalización a apoptosis (Micheau, 2001). En cáncer cervical, este último mecanismo esta inhibido, por lo que las células son resistentes a la apoptosis mediada por TNF- α .

Cabe señalar que sitios de unión para múltiples factores de transcripción incluidos NF- κ B, la proteína de unión enhancer/CCAAT (C/EBP)

y c-Jun, se han identificado en el promotor proximal del gen de TNF- α (Liu, 2000).

Factor de transcripción NF- κ B

El factor de transcripción NF- κ B se une al elemento enhancer de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina de linfocitos B activados (Baltimore, 1986). Este factor de transcripción regula la expresión de una gran variedad de genes involucrados de distintos procesos tales como inflamación, respuesta inmune y crecimiento celular, es activado en respuesta a varias señales como citocinas, patógenos, daño y otras condiciones de estrés. NF- κ B está compuesto por una familia de 5 proteínas diferentes, Rel A (p65, inicialmente llamado NF- κ B), Rel B, c-Rel, P50 (cuyo precursor es P105, también llamado NF- κ B1) y P52 (cuyo precursor es P100, también llamado NF- κ B2). La actividad de estos factores de transcripción está estrictamente regulada, la inapropiada activación de las vías de señalización de NF- κ B ha sido ligada a varios tipos de cáncer, inflamación crónica y autoinmunidad (Basseres, 2006).

Todos los miembros de la familia NF- κ B contienen un dominio de dimerización y unión a DNA altamente conservado denominado región de homología Rel (RHR) que les permite formar homo o hetero dímeros (Basseres, 2006). Rel A (P65), Rel B y c-Rel contienen el dominio de transactivación (TAD) en el carboxilo terminal que permite la activación de la expresión de genes blanco. El dominio RHR de Rel A, Rel B y c-Rel contiene dos dominios conectados: el dominio N terminal (NTD) y el dominio C terminal (CTD), este contiene la señal de localización nuclear (NLS), los dominios CTD y NTD rodean el DNA blanco promoviendo la interacción con una secuencia específica (Napestchnig, 2013).

Las proteínas 105 y P100 carecen del dominio TAD y se consideran represores de la transcripción. Al ser procesados a P50 y p52, forman dímeros con los factores Rel y mediante la unión a I κ B, se retienen en el citoplasma.

Además, P105 y P100, presentan dominios que contienen repetidos de ankirina en el C terminal, lo que les permite poseer una función I κ B-like. El procesamiento parcial de P105 y P100 mediado por proteosoma, no solo produce los componentes p50 y P52 respectivamente, además resulta en la disrupción de función I κ B-like de estos precursores, es decir, las formas no procesadas retienen a los otros factores de la familia en el citoplasma (Sun, 2008).

La vía de señalización de NF- κ B se divide en 2 vías de acuerdo a su mecanismo de activación: vía canónica (clásica) y no canónica (alterna), en cada una actúan diferentes proteínas efectoras y ambas culminan en la translocación al núcleo de homo- y hetero-dímeros de NF- κ B que se unen a secuencias κ B en DNA.

Vías Clásica y Alterna de NF- κ B

En la vía canónica de NF- κ B, señales proinflamatorias como citocinas (TNF- α , IL1 entre otras) o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) activan la cascada de señalización que lleva a la activación de diversos receptores, por ejemplo, la súper familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y la súper familia de los receptores tipo Toll/receptor de interleucina 1 (TLR/IL-1R). Las cascadas de señalización que inician los receptores de la familia de TNF son diversas y algunos receptores (solo 7 de 28), pueden inducir la vía de NF- κ B o apoptosis, al activar la vía de NF- κ B clásica. Una vez activado TNFR1 por su ligando, trimeriza y los factores asociados al receptor de TNF (TRAFs) son reclutados al trímero del receptor, directamente o por proteínas adaptadoras como la proteína adaptadora TRADD, mediante la interacción con el dominio de muerte (DD) se recluta TRAF2. (Banner, 1993). La región C terminal de TRAF facilita la trimerización y está involucrado en interacciones secuencia específica con el receptor TNF y proteínas adaptadoras. La región N terminal de TRAF contiene un dominio RING que le permite interactuar con las cIAPs y en el caso de TRAF6, el dominio RING tiene función de ubiquitina ligasa (E3) (Bianchi, 2009).

La activación de TNFR por TNF- α , también recluta al complejo TAK (cinasa activada de TGF β) e IKK, en esta vía IKK es un complejo hetero trimérico compuesta de 2 subunidades catalíticas: IKK α e IKK β y una subunidad regulatoria: IKK γ también llamada NEMO (Sun, 2008). El complejo IKK se encarga de mediar la liberación de los componentes de NF- κ B (P50 y P65), de su inhibidor I κ B α , mediante la fosforilación de I κ B α en 2 serinas en su N terminal, promoviendo así su ubiquitinación y degradación en el proteosoma. Consecuentemente, los heterodímeros p50/p65 y p50/c-Rel, que son específicos de la vía clásica, translocan al núcleo donde interactúan con secuencias específicas de DNA denominadas κ B (Sun, 1993).

La vía de señalización alterna de NF- κ B, activa el complejo Rel B/p52, este procesamiento es una señal de inducción y un evento post-traducciona debido al procesamiento de p100 y no se requiere la degradación de I κ B α . Se ha sugerido que esta vía regula importantes funciones biológicas tales como organogénesis linfoides, maduración y sobrevivencia de células B y activación de células dendríticas (Dejardin, 2006). En el epitelio estratificado se conoce poco de su función. El procesamiento de p100 es inducido por la cinasa inductora de NF- κ B (NIK), (Xiao, 2001). La región C terminal de p100 también es llamada dominio de respuesta a NIK y es esencial para regular su procesamiento, esta región contiene 2 residuos de serina: s866 y s870, que son fosforilados por NIK y este evento es asociado con la ubiquitinación y degradación parcial de p100. En su porción C terminal contiene un dominio inhibitorio de procesamiento (PID), el cual cubre la secuencia DD, también presenta un dominio de repetidos en ankirina (ARD) que le confiere una función de supresión del procesamiento de p100 (Xiao, 2001). La función de NIK es mediante la activación de IKK α ; en la vía de señalización alterna, las subunidades IKK β e IKK γ no son esenciales (Claudio, 2002). En contraste a la vía canónica de NF- κ B que responde a señales de diversos receptores, la activación de la vía no canónica solo ocurre por un subconjunto específico de miembros de la familia de TNFR, tales como CD40, factor activador de células

B (BAFFR), receptor β de linfotoxina (LT β R), receptor activador del factor nuclear κ B (RANK), TNFR2 y Fn14 (Sun, 2012). Una característica común de los receptores que estimulan la vía NF- κ B alterna es la posesión de motivos de unión directa a TRAF, estos reclutan particularmente a TRAF2 y TRAF3 al complejo del receptor durante la unión de su ligando, y son importantes para la regulación de la actividad de NIK y el procesamiento de p100 (Bishop, 2007). La región CC del trímero TRAF2 recluta proteínas inhibidoras de apoptosis (cIAP1/2) y los dominios RING de cIAP 1/2 poliubiquitinan proteínas blanco, incluidas RIP1 cinasa y NIK.

TRAF2, TRAF3 y las cIAPs promueven la degradación constitutiva de NIK, por lo que la vía alterna de NF- κ B se mantiene en un estado inactivo (Broemer, 2009). Al reclutarse TRAF2, TRAF 3 y cIAP al receptor, se promueve la degradación de TRAF3, lo que resulta en la acumulación y tetramerización de NIK (Sun, 2010). El tetrámero de NIK fosforila a P100 en la posición s870, promoviendo su procesamiento por el proteosoma y generando P52, posterior a esto, los dímeros p52/Rel B son translocados al núcleo donde activaran la transcripción de sus genes blanco.

ANTECEDENTES

NF- κ B en el epitelio

Todos los componentes para apoptosis están presentes en los queratinocitos, este proceso ocurre principalmente en la capa basal proliferativa, se ha demostrado que Bcl-xL, que esta normalmente localizado en las capas suprabasales y coopera con la vía anti apoptótica PI3K-Akt, para mejorar la supervivencia de queratinocitos posterior a la radiación UV (Umeda, 2003). En los queratinocitos, así como en otros tipos celulares, la expresión de la mayoría de los genes de control de la apoptosis, está regulada a nivel transcripcional por diferentes factores de transcripción, tales como la familia de NF- κ B, entre otros.

En piel de un modelo murino, la subunidad p50 (NF- κ B1) se encuentra en el citoplasma de queratinocitos basales, pero en los queratinocitos suprabasales que comienzan a diferenciarse, la subunidad p50 se expresa en el núcleo, eso sugiere que NF- κ B1 participa en el cambio de proliferación a arresto del crecimiento celular y diferenciación (Seitz, 1998). Mediante el bloqueo con inhibidores de NF- κ B o con la mutante dominante negativa de I κ Ba (inhibidor de la vía clásica), se desarrolla una marcada hiperplasia epidérmica, lo que demuestra un papel para NF- κ B1 en la modulación del fenotipo de queratinocitos epidermales, también se demostró que durante esta desregulación de la vía de NF- κ B1, los queratinocitos son más susceptibles a apoptosis inducida por TNF- α , Fas L o irradiación UV (Seitz, 1998). Los antecedentes sugieren, participación de la vía clásica de NF- κ B en la proliferación del queratinocito; sin embargo, no es suficientemente claro el papel de cada una de las vías (clásica o alterna) de activación de NF- κ B, tanto en la proliferación, supervivencia y diferenciación del queratinocito.

En general, la activación de NF- κ B resulta en protección contra apoptosis por la regulación de genes antiapoptóticos; tales como: miembros de la familia Bcl-2 e inhibidores celulares de apoptosis (cIAPs), por lo tanto, NF- κ B ha sido recientemente relacionado a diferentes tipos de cáncer humano; principalmente por proteger células transformadas de la apoptosis (Greten, 2004). En la epidermis, la expresión de proteínas anti apoptóticas dependientes de NF- κ B tales como cIAP1 y 2, TRAF 1 Y 2 esta incrementada en queratinocitos diferenciados (Chaturvedi, 1999). Todo esto sugiere un importante papel de NF- κ B en la protección de queratinocitos contra la apoptosis, cuando las células están llevando el proceso de diferenciación.

En un modelo murino la deficiencia de IKK α es asociada con defectos en la diferenciación epidermal; sin embargo, la función de IKK α es independiente de la vía clásica de NF- κ B (Hu, 1999). La deficiencia de IKK β en la piel decremento la proliferación de queratinocitos primarios aislados y

afecta la activación de NF- κ B en respuesta a TNF- α o IL-1 β (Pasparakis, 2002).

Los queratinocitos son capaces de expresar una gran variedad de proteínas de superficie celular, esta expresión puede ser regulada por una variedad de citocinas, incluidas INF γ , IL1 β y TNF- α . El receptor de CD40, miembro de la súper familia de TNFR es expresado en varios tipos celulares, incluidos células B, células dendríticas, monocitos, células epiteliales endoteliales, neuronas y queratinocitos, el ligando de CD40 (CD40L) también conocido como CD154 o gp39, es primariamente expresando en células T activadas (Banchereau, 1994). En queratinocitos humanos, CD40 es expresado y tiene un papel funcional en la regulación de la expresión de ICAM1, Bcl-x y la secreción de IL8 (Denfeld, 1996). Se ha demostrado, que CD40L inhibe la proliferación de queratinocitos e induce su diferenciación, sugiriendo un papel predominante de la vía de activación alterna en la diferenciación del queratinocito y en los mecanismos de resistencia a la apoptosis. Además, la vía de señalización inducida por CD40L altera el ciclo celular en queratinocitos mediante un mecanismo independiente a apoptosis (Grousseau, 2000).

En células epiteliales de pulmón de un modelo murino, se ha descrito que de Rel A, p50, Rel B y P52 translocan al núcleo, posterior a un estímulo con lipopolisacárido (LPS); en este mismo estudio, se interfirió la expresión de IKK α , Rel A y Rel B mediante el uso de siRNAs, resultando en decremento de citocinas proinflamatorias inducidas por LPS; sin embargo, se observó incremento en la producción de IL6. Este antecedente sugiere que la activación coordinada de las vías clásica y alterna de NF- κ B regulan la respuesta proinflamatoria en células epiteliales de pulmón de ratón (Tully, 2012).

NF- κ B y HPV

La infección de queratinocitos por HPV tiene influencia en la expresión de citocinas y quimiocinas, se ha demostrado que TNF- α y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), son diferencialmente expresados en queratinocitos positivos a HPV (Mota, 1999), se ha descrito que el mecanismo responsable de esta producción alterada de citocinas en queratinocitos infectados con HPV es debido a interferencias en la vía de señalización de NF- κ B canónica. En queratinocitos normales se expresan los componentes de la vía clásica de NF- κ B, esta expresión es elevada en queratinocitos transfectados con las oncoproteínas E6, E6/E7 de HPV 16 en las fracciones totales y citoplasmáticas; sin embargo, la localización nuclear de los componentes p65-p50, esta disminuida en queratinocitos transfectados con los oncogenes y el mismo efecto se observa en las líneas celulares positivas a HPV16 SiHa y CaSki (Havard, 2002).

En queratinocitos cervicales se examinaron las alteraciones en la expresión de genes blanco de NF- κ B, de respuesta a IFN y regulados por el ciclo celular, causadas por las oncoproteínas E6 y E7 de HPV, la oncoproteína E6 estimula la expresión de genes inducidos por NF- κ B así como la expresión de componentes funcionales de esta vía, tales como: p50, NIK y proteínas que interactúan con TRAF (Nees, 2001). En la línea celular HaCaT la vía de señalización de NF- κ B es disfuncional, se asocia a que presenta alta actividad de la vía PI3K/Akt y alta susceptibilidad a apoptosis inducida por luz UV, sugiriendo que NF- κ B es esencial en la adquisición de un fenotipo resistente a apoptosis en queratinocitos (Qin, 1999).

Estos antecedentes demuestran una posible relación entre las proteínas E6 y E7 de HPV con la activación desregulada de la vía clásica de NF- κ B; sin embargo, falta estudiar la relación con la vía alterna de NF- κ B y la regulación que tienen ambas vías sobre determinados marcadores de importancia en el desarrollo de cáncer, tales como TNF- α , otras citocinas y las

proteínas encargadas de la resistencia a apoptosis como las cIAPs, Bcl2 y Bclx.

Antecedentes Directos

En nuestro grupo de investigación hemos encontrado que NF- κ B se encuentra encendido diferencialmente; en la línea celular tumoral CaSki se encuentra activado de manera similar las 2 vías, clásica y alterna de NF- κ B; además, esta línea celular, contiene un alto número de copias de HPV16, y es muy resistente al tratamiento con cis platino. Por lo contrario, las líneas celulares SiHa (HPV+) y C33A(HPV-) también provenientes de cáncer de cérvix, expresan preferencialmente P52 en núcleo, esto puede indicar la importancia de la vía alterna de NF- κ B en el proceso de malignización.

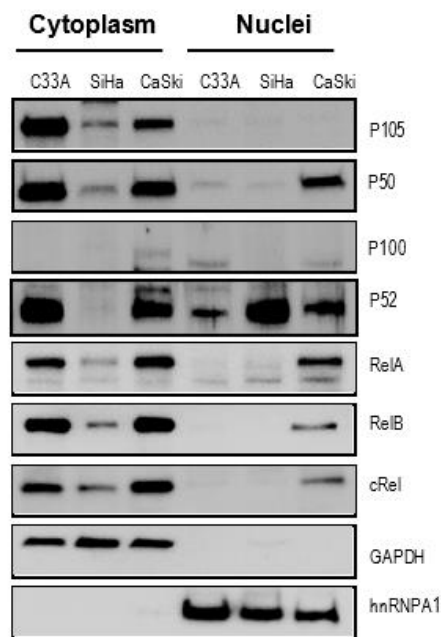


Figura 1. Expresión diferencial de los componentes de NF κ B en líneas celulares HPV+

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis para determinar en la línea celular HaCaT (queratinocitos transformados y no oncogénicos), como se encuentran expresados los factores de NF- κ B de la vía clásica y alterna en condiciones basales o normales de crecimiento en el cultivo (Figura 2.1) y con estímulo de Calcio para mantener las células en un estado similar al no

diferenciado y en proceso de diferenciación, es decir crecidas a mayor concentración de calcio (respectivamente). Los queratinocitos HaCaT y los tratados con niveles bajos en Calcio, similares a los queratinocitos de la capa basal, mantienen activa la vía clásica de NF- κ B (Figura 2.1); sin embargo, una vez que reciben el estímulo de 2.8mM CaCl para promover la diferenciación, también se detectan en el núcleo los componentes de la vía alterna de NF- κ B, sugiriendo su posible participación durante la diferenciación del queratinocito.

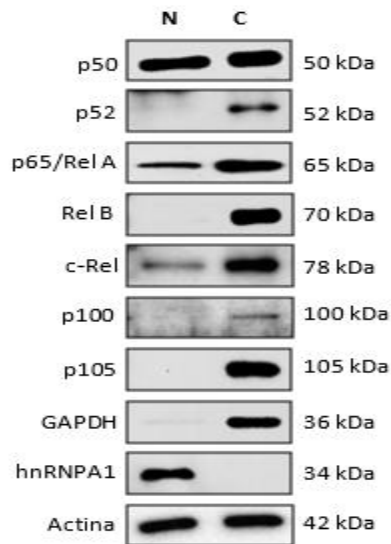


Figura 2. Análisis de la expresión nuclear y citoplasmática de los componentes de la vía clásica y alterna de NF κ B en HaCaT

Posteriormente se llevó a cabo el análisis de los componentes encargados de la activación de las vías clásica y alterna de NF- κ B y en condiciones basales se confirma que la vía clásica de NF- κ B se encuentra activa ya que en presencia de MG132 inhibidor del proteosoma, se detecta la banda correspondiente a I κ B α (Figura 3) y NIK se encuentra degradándose lo cual correlaciona con la falta de expresión nuclear de los componentes de la vía alterna. Por otro lado, cabe destacar que a pesar de que se observa el procesamiento y translocación de P52 y Rel B al núcleo durante la diferenciación, NIK que es la cinasa encargada de la activación de P100, no se detecta ya que se degrada constitutivamente; por ello se sugiere que la

activación de la vía alterna de NF- κ B en el proceso de diferenciación, no es por la unión de un ligando a un receptor, que recluta el complejo TRAF3, 2 cIAPs y posiblemente ocurre por algún otro mecanismo de señalización; es decir, otra cinasa encargada de la fosforilación de IKK α que lleve al procesamiento de P100.

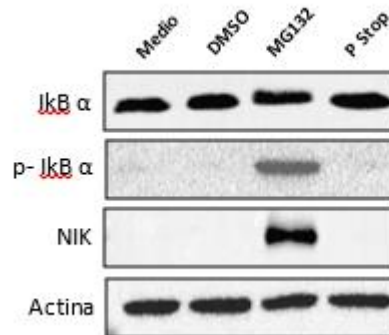


Figura 3. Análisis de la expresión de los componentes relacionados a la activación de la vía clásica y alterna de NF κ B en condiciones basales

JUSTIFICACIÓN

Nuestros datos indican que la vía alterna de NF- κ B esta encendida diferencialmente en las líneas celulares de cáncer cervical (CaSki y SiHa) y además participa en el proceso de diferenciación de queratinocitos, por lo que es importante conocer el papel que desempeñan los componentes virales encargados de la transformación y malignización celular, principalmente las oncoproteínas virales E6 y E7 de HPV16, en la activación de las vías clásica y alterna de NF- κ B y por lo tanto conocer su efecto sobre la expresión de los genes regulados por estas 2 vías y de manera particular, aquellos descritos como importantes para la resistencia apoptosis y proliferación; tales como: TNF- α y las cIAPs. En este trabajo, pretendemos investigar la diferencia de expresión de estos marcadores con respecto a un estado basal del queratinocito y en presencia de los oncogenes E6 y E7 de HPV16.

HIPÓTESIS

Las proteínas E6/E7 de HPV16 alteran la actividad de las vías clásica y alterna de NF- κ B. lo que conlleva a que algunos componentes de la familia de NF- κ B participan en el proceso de malignización celular y por lo tanto en el desarrollo del cáncer.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de E6/E7 de HPV16 en las vías de activación de NF- κ B usando como modelo de estudio la línea celular HaCaT.

OBJETIVOS PARTICULARES

1) Obtener células HaCaT que expresen constitutivamente los oncogenes E6/E7 de HPV 16 así como establecer un cultivo control comparable con respecto al modelo transfectado.

2) Evaluar la expresión de los componentes de la vía clásica y alterna de NF- κ B en extractos totales, así como su localización nuclear y citoplasmática en las células transfectadas y no transfectadas (control)

3) Evaluar la funcionalidad de las células sometidas a diferentes estímulos de apoptosis mediante citometría de flujo tanto en las células transfectadas como en las no transfectadas, modelo que debe estar correctamente caracterizado.

4) Evaluar moléculas reguladas por las vías clásica y alterna de NF- κ B tales como IL6 y TNF- α en los modelos establecidos tanto en presencia como en ausencia del estímulo de apoptosis.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1) Obtención y mantenimiento de la línea celular HaCaT, y mantener un cultivo celular al cual se le pueden manipular las concentraciones de Calcio

obteniendo celular basales y diferenciadas (pertenecientes a los estratos superiores de la dermis)

2) Transfección estable de la línea celular HaCaT mediante el sistema de Transposon/Transposasa "Sleeping beauty" psBiGN (mock), psBiGNE6E7 (expresión constitutiva del bicistrón E6/E7), y psTetE6E7 (expresión del bicistrón E6/E7 dependiente al estímulo de Doxiciclina en el cultivo celular)

3) Extracción de proteína Total, Nuclear y Citoplasmática de los cultivos celular transfectados y no transfectados para ensayos de Western Blot

4) Extracción de RNA de las células transfectadas y no transfectadas para ensayos de RT-PCR

5) Ensayos de Citometría de flujo para evaluar muerte celular a diferentes estímulos (TNF- α , BNPT y BAY 11-7085)

6) Ensayos de ELISA en sobrenadantes de los cultivos transfectados y no transfectados para detección de IL-6 y TNF- α soluble

METODOLOGÍA

Cultivo celular

La línea celular HaCaT crece en medio DMEM alto en glucosa, con L-Glutamina (Life Technologies) adicionado con suero fetal bovino (FBS) al 10%. El método de preparación de medios se describe a continuación: para 880 ml de DMEM se adicionaron 10 ml de L-glutamina 200 mM, 10 ml de antibiótico (penicilina/estreptomicina) 100 ml de FBS, los componentes se mezclan suavemente y se filtraron (Millipore; 0.22 μ m de poro) en una botella estéril de 1L, con la finalidad de remover impurezas y esterilizar; posteriormente se almacenaron a 4°C. Las células transfectadas y no transfectadas usaron el mismo medio y se mantuvieron en cultivo a 37 °C y 5 % de CO₂ sin permitir que rebasen el 80 % de confluencia antes de hacer un pase.

Una vez establecidos el cultivo celular, cuando alcanzaron aproximadamente 80% de confluencia fueron utilizados para la extracción de proteína en extractos solubles totales, citoplasmáticos y nucleares. Brevemente, las células se cosecharon y se hicieron 2 lavados con PBS, subsecuentemente se adicionaron 700 μ l de Proteoject adicionado con Complete 1X (inhibidor de proteasas), se colocaron en agitador orbital (nivel 8) durante 10 min, el contenido de la caja fue recuperado con una espátula y se homogenizó con una pipeta, este se pasó a un tubo Eppendorf para centrifugar la muestra durante 20 min, 4° C a 12500 rpm, el sobrenadante fue recuperado y almacenado a -70°C. La cuantificación de proteína se hizo mediante el método de Bradford, colocando 500 μ l de Bradford y 1 μ l de muestra en una celda, y se determinó la absorbancia a 590 nm en el espectrofotómetro.

Para la extracción de proteína nuclear y citoplásmica se siguieron las instrucciones del protocolo indicado en el kit NE-PER nuclear and *cytoplasmic extraction reagents* (Thermo scientific 7883) para células adherentes. Las células se trataron con tripsina-EDTA, se Re suspenden en 5 ml de PBS y se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min a 4°C, el pellet obtenido se suspendió con PBS, posteriormente, se transfirió 1-10 x10⁶ células a un tubo para micro centrifuga (1.5 ml), la pastilla se obtiene por centrifugación a 2500 rpm, durante 5 min, el sobrenadante obtenido se descarta y se deja secar el pellet, se agrega CER I (1000 μ l) y se procede con la extracción de proteínas nucleares y citoplasmáticas, la muestra debe mezclarse en *vortex* durante 15 s para suspender el pellet, se incuba durante 10 min en hielo, posteriormente se adiciona CER II (55 μ l) y se mezcla en *vortex* durante 5 s, se incuba durante 1 min en hielo, se vuelve a mezclar en *vortex*, para finalmente centrifugar la muestra a 12,000 rpm durante 15 min, inmediatamente el sobrenadante (extracto citoplasmático) es transferido a un tubo limpio, este fue almacenado a -80°C hasta su uso. El pellet obtenido de esta última centrifugación que contiene el extracto nuclear y se suspendió en solución NER (200 μ l), la muestra se agitó en *vortex* durante 15 s y se colocó en hielo, cada 10 min se

agitó en *vortex* por un total de 40 min, posteriormente fue centrifugado a 12,000 rpm durante 15 min, y el sobrenadante obtenido (extracto nuclear) se transfirió a un tubo limpio y se almacenó a -80°C hasta su uso. Se realizó *western blot* utilizando anticuerpos comerciales específicos contra GAPDH y hnRNPA1 para corroborar la pureza de los extractos de citoplasma y núcleo, respectivamente.

Western blot

Una vez obtenidos los extractos solubles totales, nucleares y citoplasmáticos de las células HaCaT, se llevaron a cabo ensayos de *Western blot* para analizar la expresión de los diferentes componentes de la vías canónica y no canónica de NF κ B conforme a la siguiente metodología: se tomaron 50 μ g de proteínas totales o 15 μ g de proteínas citoplasmáticas y nucleares que fueron separadas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 % [4 ml de H₂O des ionizada, 2.5 ml de amortiguador 1.5 M Tris pH 8.8, 100 μ l de 10% SDS, 3.3 ml de mezcla de acrilamida 30% (29.2% de acrilamida y 0.8% de *N, N'*-metileno-bis-acrilamida), 100 μ l de persulfato de amonio al 10 % y 4 μ l de TEMED].

Las proteínas se cargaron con el amortiguador de Laemmli y como marcador se utilizó el *Bench Mark Pre-stained Protein Ladder* (Invitrogen). Las proteínas corrieron en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN II *Electrophoresis Cell* (Bio-Rad) con un amortiguador de corrida, posteriormente fueron transferidas en una membrana de PVDF utilizando un amortiguador de transferencia. Después de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con una solución de TBS1X suplementada con 0.5% Tween-20 y 5 % de leche descremada en polvo durante 1 hora, se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios (anti GAPDH 1:20000, anti hnRNPA1 1:250, anti p65 1:1000, anti p50 1:1000, anti p52 1:1000, anti Rel B 1:1000, anti c-Rel 1:1000, anti I κ B α 1:1000, anti I κ B α fosforilada 1:1000, anti NIK 1:1000, anti K5 1:500 y anti K10 1:10000). Como control de carga, se utilizó anti-actina (1:500) con las condiciones anteriores, posterior a la incubación del anticuerpo primario se

llevaron a cabo 3 lavados durante 5 min cada uno con TBS1X, luego se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa correspondientes durante 1 h y media en TBS1X-Tween-20. Se llevaron a cabo tres lavados durante 5 min con TBS1X-Tween-20 y se reveló por quimioluminiscencia con el substrato SuperSignal West Pico/Femto (Sigma Aldrich) utilizando el equipo ChemiDoc MP Imagen System (Bio-Rad).

RT-PCR

Para el análisis de expresión de mensajeros, se realizó RT-PCR, para ello se llevó al cabo la extracción de RNA mediante el método de Trizol, a partir del cultivo celular con aproximadamente 80 % de confluencia fue adicionado el reactivo y se hizo un raspado de la monocapa, posteriormente fueron agregados 200 μ l de cloroformo, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C; se recuperó el sobrenadante, se adicionaron 500 μ l de isopropanol para precipitar el RNA, se centrifugó y la muestra se lavó con etanol al 70%, finalmente fue centrifugada a 12,000 rpm a 4°C durante 5 min y se resuspendió la muestra en 50 μ l de agua libre de nucleasas para ser almacenada a -70°C hasta su uso.

La integridad de RNA fue verificada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1 % con TBE1X. Para eliminar el DNA genómico remanente se realizó el tratamiento con DNAsa. Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción (RT), se usaron 10 μ g de RNA total de células HaCaT basales, no diferenciadas y diferenciadas, en una mezcla con 4 μ l de oligo dT 10 μ M, se incubaron a 70°C durante 10 min. Posteriormente, se adiciona una mezcla con el amortiguador 5X, 4 μ l de Dithiothreitol 0.1 M, 4 μ l de dNTPs 200 μ M, 2 μ l de la retrotranscriptasa (200 U/ μ l) (SuperScript III, Invitrogen) y agua libre de nucleasas a un volumen final de 40 μ l. Se incubó la mezcla durante 10 min a 22°C y, después a 42°C durante 2 h y finalmente a 70°C durante 15 min para la inactivación.

Se utilizó 1 μ l de cDNA como templado para la amplificación de los genes blanco de NF- κ B y la mezcla de los siguientes reactivos: 5 μ l de

amortiguador 10X, 2 µl de MgCl₂ 50 mM, 4 µl de dNTPs 200 µM, 1 U de Taq DNA polimerasa (Gibco), 1 µl de oligonucleótido sentido y 1 µl de oligonucleótido antisentido, 10 µM, y se llevó a un volumen final de 50 µl con agua libre de nucleasas. La PCR se llevó a cabo con las condiciones descritas en la Tabla 1. La reacción se lleva a cabo en el termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystem). Los productos del PCR se detectaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en TBE1X y fueron visualizados en un trans-iluminador UV.

Tabla 1. Condiciones y secuencias usadas para los ensayos de PCR

Transcrito	Forward	Reverse
GAPDH	5'-gacccttcattgacctaac-3'	5'-gtggcagtgatggcatggact-3'
	92°:20seg. 45°:20seg. 72°:45seg. 25 ciclos	
E6E7	5'- cgctctgaggccatgcacaaaagagaactgca atg-3'	5'- ggcctgacaggccttatggttctgagaa cagattggg-3'
	92°:20seg. 50°:20seg. 72°:60seg. 45 ciclos	
NEO	5'-cggactgtacagatcctggaag-3'	5'-cttcctacctccataaggctt-3'
	92°:20seg. 50°:20seg. 72°:45seg. 30 ciclos	
TNF alfa	5'-caacctctctgccaacaaga-3'	5'-agactcggcaagtcgagatagtc- 3
	92°:20seg. 50°:20seg. 72°:45seg. 50 ciclos	
CIAP1	5'-atgcacaaaactgcctccaagac-3'	5'-ctgttatgctttgaataggactgc- 3'
	92°:20seg. 50°:20seg. 72°:45seg. 30 ciclos	
CIAP2	5'-atgaacatagtagaaaacagcatatt-3'	5'-aggatacaacttttatgctttcag-3'
	92°:20seg. 50°:20seg. 72°:45seg. 30 ciclos	
E7	5'-gtggtcggcttcgcaaacct-3'	5'-cccctccagtcacacatcca-3'
	92°:20seg. 50°:20seg. 72°:45seg. 30 ciclos	

Inmunofluorescencia

En placas de 6 pozos que contienen un portaobjetos por caja se contaron y sembraron 120,000 a 150,000 células por pozo, posterior a 24 h de crecimiento se retiró el medio para adicionar 500ul de PFA al 4% y se incubo por 15 min, una vez finalizado este tiempo, se retiró el buffer y se lavaron 2 veces usando PBS 1x, posteriormente se adiciona 1ml de Tritón al 0.1% durante 15 min, pasado el tiempo establecido se llevan a cabo 2 lavados con PBS 1x para poner la solución de bloqueo (gelatina al 0.05%+FBS al 1.5% en PBS), una vez transcurrido el tiempo se añadió el anticuerpo primario diluido en PBS durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron de nuevo las muestras con PBS1x, se preparó el anticuerpo secundario correspondiente y acoplado a Alexa Fluor o FITC, y se incuban con la muestra durante una hora a temperatura ambiente cubiertos de luz. Finalmente, se incuban las muestras durante 5 min con DAPI diluido (1:1000), todas las muestras fueron lavado con Milli Q y se dejaron secar por completo antes de montarlas en el portaobjetos para posteriormente llevarlas al microscopio de florescencia a ser analizadas.

Transfección celular

En una caja de 6 pozos se sembraron 150,000 células que una vez que alcanzaron el 60% de confluencia se les disminuyó la concentración de FBS al 7% durante una hora, antes de ser adicionada la siguiente mezcla;

Tabla 2. Componentes de Transfección celular

	Control (-)	<i>psbiGN</i> (mock)	<i>psbiGNE6E7</i>	<i>psbiTETE6E7</i>
Plásmido	-----	5ul (10ug)	5ul (10ug)	5ul (10ug)
DNA acarreador	5ul	5ul	5ul	5ul
CaCl 2M	13ul	13ul	13ul	13ul
HEBS 2X	125ul	125ul	125ul	125ul
H2O	107ul	102ul	102ul	102ul
DMEM + SFB7%	500ul	500ul	500ul	500ul

La mezcla control, así como las que contienen los plásmidos utilizados, se agregaron gota a gota a los pozos seleccionados y se dejaron incubar junto con la mezcla durante 5 h, posteriormente se cambió el medio al normalmente utilizado (DMEM suplementado con 10%FBS) y posterior de 24 h de crecimiento se llevó a cabo la selección sometiendo las células a medio suplementado con 1 mg/ ml G418, las células que sobrevivieron a la selección fueron expandidas y posteriormente se les analizo expresión de mensajero, proteína y ensayos de inmunofluorescencia.

ELISA para detección de TNF- α

Se utilizaron placas de 96 pozos para la detección de la citocina TNF- α en sobrenadantes de HaCaT y la línea celular posterior a los tratamientos con 1 y 5 μ M BNPT y 10 mM BAY-11-7085 siguiendo la metodología descrita por el kit BD Biosciences (555212) para detección de sTNF- α humano. Se incubo durante una noche el anticuerpo de captura en los pozos a 4° C, una vez que se cumplió este tiempo, se aspiró el anticuerpo de captura y se realizaron

lavados con PBS1X + 0.05 Tween-20, se utilizó PBS1X+FBS al 10 % como solución de bloqueo durante una hora a Temperatura ambiente, posterior al bloqueo se realizaron las diluciones correspondientes a la curva standard y los sobrenadantes de las diferentes muestras, estas fueron colocadas en los pozos y se incubaron durante 2 h, finalizado este tiempo de incubación se lavaron con PBS 1X+0.05 Tween-20 y se procedió a incorporar a los pozos la solución detectora (Anticuerpo de detección + Strp HRP) y se incubo durante una hora, finalizado el tiempo de incubación se llevaron a cabo 7 lavados con PBS 1X + 0.05 Tween-20 y se incubo durante 30 min la solución detectora para finalmente leer absorbancia a 450 nm, los datos obtenidos fueron graficados y se les realizo análisis estadístico (ANOVA de 2 vías, post hoc Tukey, $p>0.05$).

Ensayos de Muerte celular

Para la detección de muerte celular mediante citometría de flujo se utilizó el protocolo descrito en el Kit eBioscience™ *Annexin V Apoptosis Detection Kits* (88-8005-72), este kit permite detectar apoptosis temprana mediante la unión de Anexina acoplada a FITC a fosfatidilserinas de la membrana extracelular (marcador temprano de apoptosis) y el marcaje con Ioduro de propidio (IP) para células muertas. Las células HaCaT fueron tratadas con 3 diferentes moléculas causantes de apoptosis a diferentes concentraciones como se describe a continuación; 10 ng/ml y 200 ng/ml TNF- α , 30mM BAY 11-7085 y 1mM y 5 mM BNPT, cuando los cultivos contaban con 80% de confluencia se les agrego medio suplementado con las drogas a las concentraciones mencionadas y pasadas 12 h de incubación se llevaron a cabo lavados por PBS 1x estéril, las células fueron despegadas gentilmente para ser Re suspendidas y lavadas con PBS 1X , una vez que el pellet celular se encontraba propiamente libre de medio, se re suspendió en 200 μ l del buffer de unión proporcionado en el kit, posteriormente se incorporaron 5 μ l de Annexin V-FITC a la suspensión celular, se incubo durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se incorporó 10 μ l de Ioduro de propidio (20 μ g/ml), inmediatamente los tubos fueron llevados al citómetro (BD

LSRFortessa™), usando células no tratadas para establecer la población control, se determinó el porcentaje de células muertas y en apoptosis.

RESULTADOS

Transfección de E6/E7 en la línea celular de queratinocitos HaCaT.

La línea celular de queratinocitos HaCaT se utilizó como modelo fundamental del presente proyecto, se sembraron células HaCaT en placas de 6 pozos, una vez que alcanzaron el 60 % de confluencia se procedió a disminuir la concentración de FBS al 7 % y se agregó la mezcla de DMEM que contenía los diferentes plásmidos (mock, expresión constitutiva psbi GNE6/E7 y dependiente a estímulo psbiTet E6E7), después de 24 h el medio celular se cambió y se agregó 1mg/ml G418 para seleccionar las células que integraron los plásmidos para posteriormente mantenerlas en cultivo y realizar distintos ensayos y así comprobar la expresión de los plásmidos transfectados.

El primer ensayo que se llevó al cabo fue RT PCR, posterior a la extracción de RNA mensajero de las células transfectadas, se llevó a cabo la reacción de Retro transcripción para obtener c DNA que fue tratado con RNAsa para llevar a cabo la metodología de PCR usando primers específicos para el bicistrón E6/E7 y sus respectivas formas de splicing E6/E7*I y E6/E7*II y usando la línea celular CaSki que es positiva a HPV16 como Control + obteniéndose los siguientes resultados observados en la Figura 4

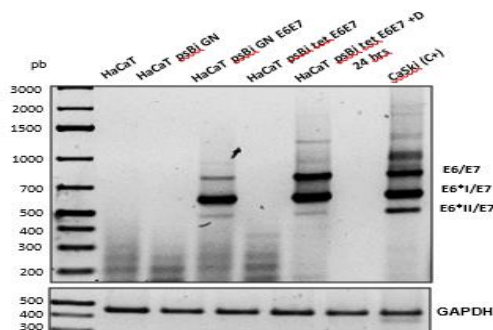


Figura 4. Expresión del bicistrón de E6E7 en HaCaT transfectada

Como se puede observar en la Figura, en la línea celular HaCaT transfectada con el plásmido psBi GN E6/E7 (vector de expresión constitutiva) se detectaron las bandas correspondientes a E6/E7 y sus respectivas formas de *splicing*, pero no en el *mock* (psbiGN) ni en el plásmido psbiTET E6/E7 (vector de expresión inducida por Dox); sin embargo, en las células transfectadas con este último plásmido, posterior al estímulo constante de Doxiciclina por 24 h, se detectaron las bandas correspondientes a E6/E7 y sus respectivas formas de *splicing*, tal como se observó con el plásmido que expresa E6/E7 constitutivamente (independiente de estímulos).

Posteriormente, en el modelo de expresión de E6/E7 dependiente de Doxiciclina para determinar a qué tiempo inicia la expresión del bicistrón E6/E7, se hicieron ensayos de detección del RNA mensajero a diferentes tiempos (12, 24 y 48 h); como se observa en la Figura 5, a partir de las 12 h de estímulo las células expresan E6/E7 y esta expresión se mantiene constante hasta posterior de 48 h de estímulo constante sin aparentes cambios. Este experimento tuvo como finalidad caracterizar el modelo de expresión dependiente de Doxiciclina para que posteriormente sea comparado con el modelo de expresión constitutiva (Figura 5).

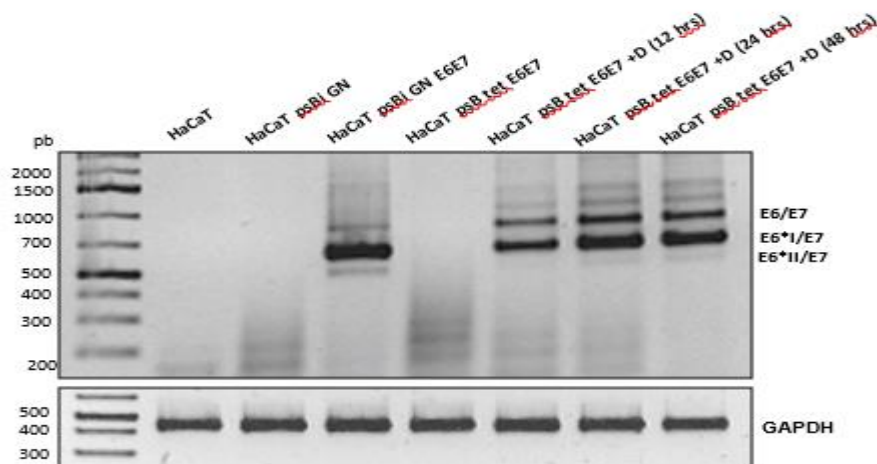


Figura 5. Expresión de mensajero de E7/E7 en HaCaT transfectadas con E6E7

Utilizando la metodología descrita en los experimentos anteriores se llevaron a cabo los mismos experimentos en las células transfectadas y no

transfectadas usando los primer correspondientes a Neomicina (Figura 6) y se observa un decremento de Neo en las células que expresan E6/E7 posterior al estímulo con Doxiciclina, esta aparente perdida del casete de resistencia a Neomicina se tendría que comprobar sometiendo nuevamente a las células con G418; sin embargo, dado que mantienen la expresión de E6/E7, el modelo es viable para los siguientes experimentos que fueron llevados a cabo, se descarta que el plásmido se pierda en el modelo inducible, y se sugiere que la expresión del promotor inducible afecta de alguna manera la expresión del promotor de neomicina.

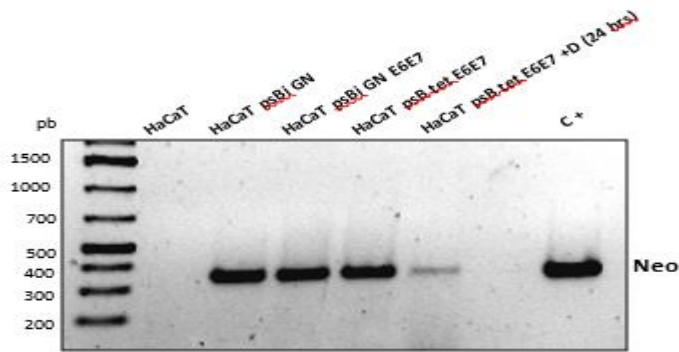


Figura 6. Expresión de Neomicina en HaCaT transfectadas establemente

Finalmente, mediante el uso de *primers* específicos para E7 de HPV16 se observa el mismo patrón de expresión anteriormente detectado con el bicistrón, esto refuerza que la transfección celular fue exitosa y expresan constitutivamente o posterior al estímulo con Doxiciclina E6E7 y E7 independientemente (Figura 7)

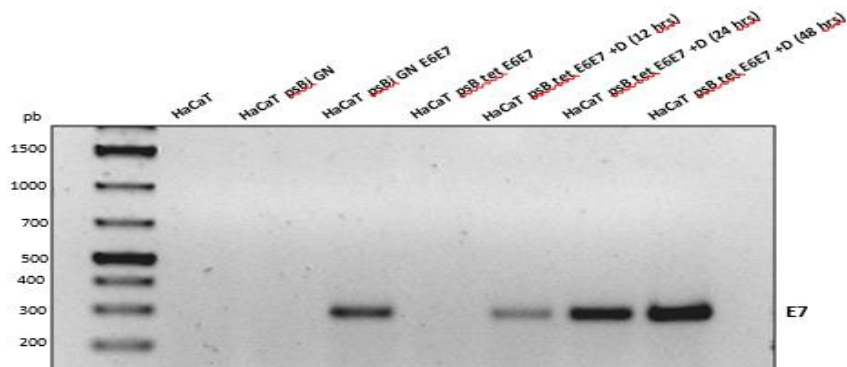


Figura 7. Expresión del mensajero de E7 en HaCaT transfectadas con el bicistrón de E6E7

Validación del modelo de transfección constitutiva

De acuerdo a la literatura, se ha descrito que las moléculas P53 y RB son blancos de E6 y E7 respectivamente las cuales llevan a su degradación llevando a las células a adquirir un fenotipo resistente a apoptosis, es por ello que, mediante ensayos de Western Blot se analizó la expresión de P53 y RB en el modelo de transfección constitutiva (psbiGNE6/E7), se observa en la Figura 7 que en las células que expresan E6/E7 la expresión de RB y P53 decremantan, este resultado esperado confirma que además de la expresión del mensajero de las oncoproteínas virales, se encuentran activas en este modelo, cabe destacar que en el modelo dependiente de estímulo de Doxíciclina no se observa la misma magnitud en el decremento de P53 y RB, esto puede ser debido a que en periodos de expresión cortos del mensajero de E6/E7, no es suficiente para degradar completamente P53 y RB; para comprobar lo mencionado se tendrían que mantener el estímulo constante de Doxíciclina durante tiempos más largos, hasta el punto de observar un nivel de degradación similar al observado el modelo de transfección constitutiva (Figura 8).

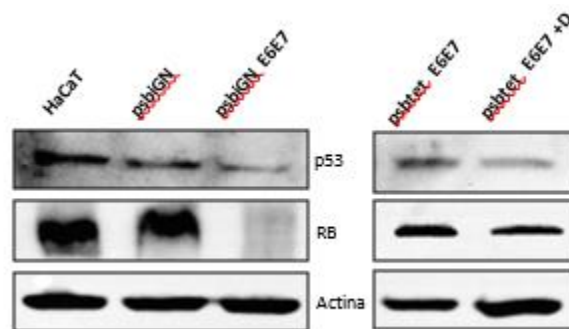


Figura 8. Decremento en la expresión de p53 y RB en psbiGNE6/E7, con respecto a HaCaT y psbiGN. Modelo válido

Expresión del Reportero GFP en células transfectadas

Los plásmidos usados contienen el reportero GFP (el cual se expresa constitutivamente con un promotor independiente del promotor de E6/E7), como parte del proceso de caracterización del modelo celular transfectado, se usaron las células para ensayos de Inmunofluorescencia y Western Blot. En el ensayo de Western Blot se detectaron bandas correspondientes a GFP (27 kDa) únicamente en las células transfectadas, se usó como control negativo HaCaT no transfectado (Figura 9).

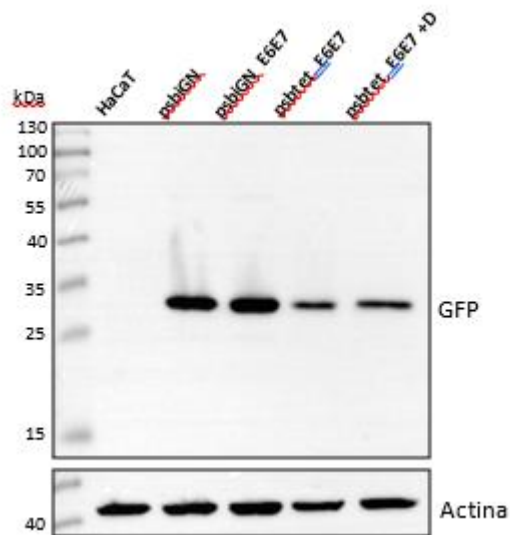


Figura 9. Expresión del transcrito de GFP en células HaCaT transfectadas con el bicistrón de E6E7

Se llevaron a cabo ensayos de Inmunofluorescencia observándose expresión de GFP en citoplasma de las células transfectadas, nuevamente estos ensayos comprueban que la transfección celular es estable y las células son viables para el desarrollo de los diferentes ensayos posteriormente descritos (Figura 10).

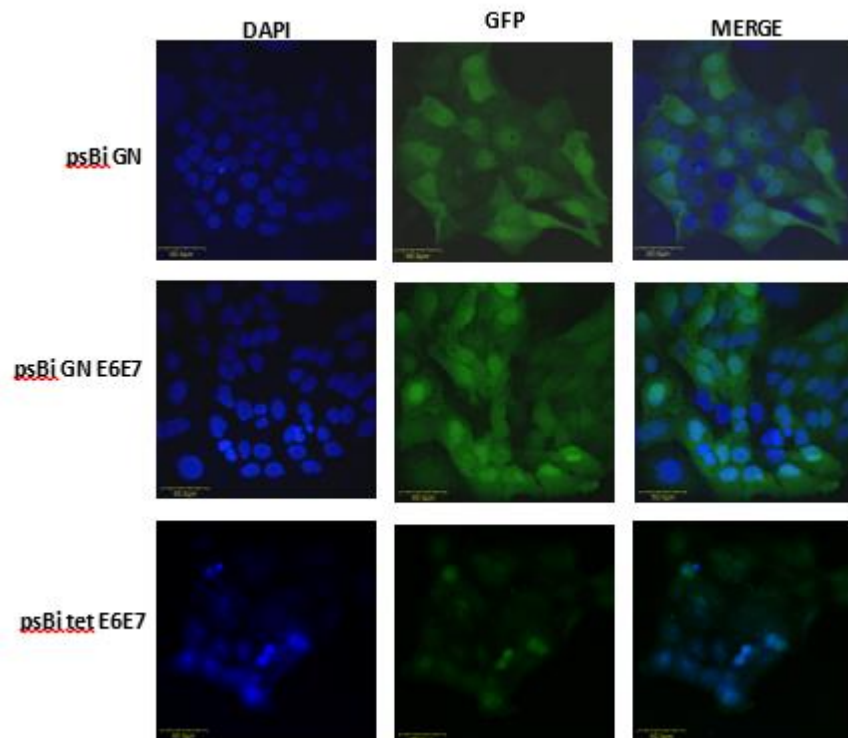


Figura 10. Expresión de GFP en células HaCaT transfectadas con el bicistrón de E6E7

Expresión de los componentes de las vías clásica y alterna de NF- κ B en el modelo transfectado

Una vez obtenido y caracterizado el modelo de línea celular HaCaT transfectado con E6/E7 constitutivamente y dependiente de estímulo, se llevaron a cabo ensayos de Western Blot para determinar la expresión de los diferentes componentes de la vía de señalización de NF- κ B clásica y alterna usando extractos totales y fracciones nucleares y citoplasmáticas. En la Figura 11 se observa que excepto cREL, la expresión de los otros componentes de las vías clásica y alterna de NF- κ B no presentan cambios aparentes, sin embargo, se llevó a cabo el fraccionamiento nuclear y citoplasmático de las células.

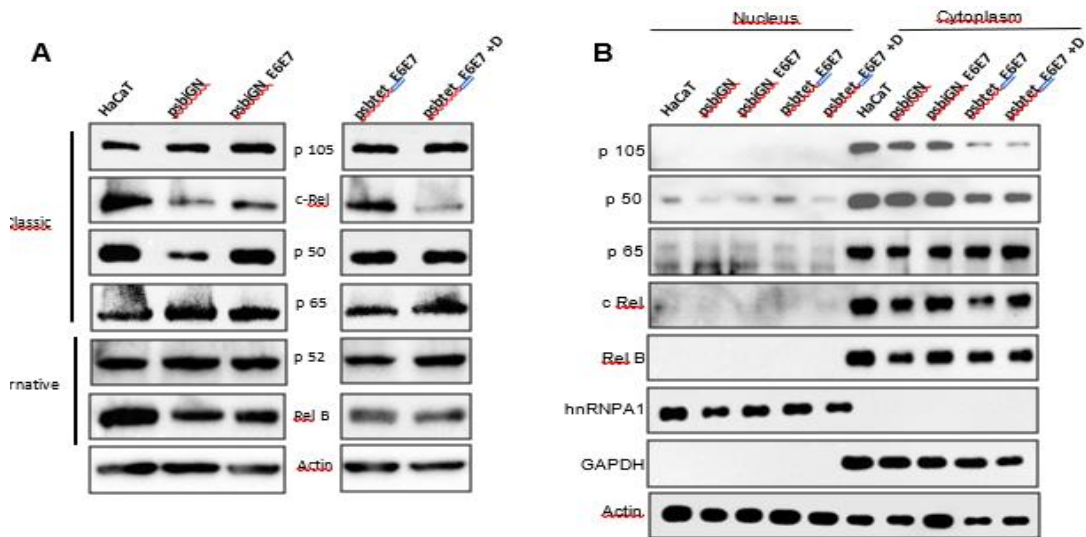


Figura 11. Expresión de los componentes de la vía clásica y alterna de NF-κB en células HaCaT transfectadas con E6/E7 en extractos Totales (Panel A) y fracciones N/C (Panel B)

En los resultados obtenidos del fraccionamiento nuclear y citoplasmático de NF-κB se observa claramente solo la expresión nuclear de P50, P65 y cRel en HaCaT no transfectado (anteriormente reportado), Sin embargo en las fracciones nucleares de las células transfectadas tanto con los controles como con E6/E7 se observa una disminución de la mayoría de los factores NF-κB estos resultados son consistentes con la observación de que las células que contienen los oncogenes de HPV contienen principalmente P50 en el núcleo y disminución nuclear de RELA. Este mismo hallazgo es observado en las líneas celulares positivas para HPV y HaCaT transfectadas por Havard y cols (Havard, 2002). sin embargo, es un resultado que debe analizarse con precaución porque parece deberse más a la presencia del DNA exógeno, que a la actividad de los oncogenes. Se requieren experimentos adicionales, para resolver si el efecto es más pronunciado por la presencia de los oncogenes que por la presencia de DNA exógeno (solo el vector).

Adicionalmente, con la finalidad de comprender mejor la expresión y actividad de los factores NF- κ B, en la biología del queratinocito, se hizo un análisis de los factores en condiciones de diferenciación inducida por Calcio de las células HaCaT. Los queratinocitos HaCaT tratados con niveles bajos en Calcio durante 5d, adquieren fenotipo similar a los queratinocitos de la capa basal, y mantienen activa la vía clásica de NF- κ B, sin embargo, una vez que reciben el estímulo de 2.8mM CaCl para promover la diferenciación durante 1-5 d, los componentes de la vía alterna de NF- κ B (o NF- κ B2), también se detectan en el núcleo sugiriendo su posible participación durante la diferenciación (Bautista Gaytán, 2017)

Posteriormente, se llevó al cabo el análisis de moléculas reguladas por la actividad de NF- κ B, tales como TNF- α , citocina proinflamatoria, cIAP 1 y 2 que además son participantes en la vía de señalación del factor de transcripción NF- κ B.

Análisis de expresión de mensajero de genes regulados por NF- κ B

Mediante ensayos de RT PCR se analizó la expresión del mensajero de TNF- α , cIAP 1 y 2, se observa particularmente en el caso de TNF- α que en las células HaCaT transfectadas con E6/E7 constitutivamente aumento en la expresión del mensajero de la citocina, sugiriendo una posible regulación positiva de esta debida a la presencia y o actividad de las oncoproteínas virales (Figura 12).

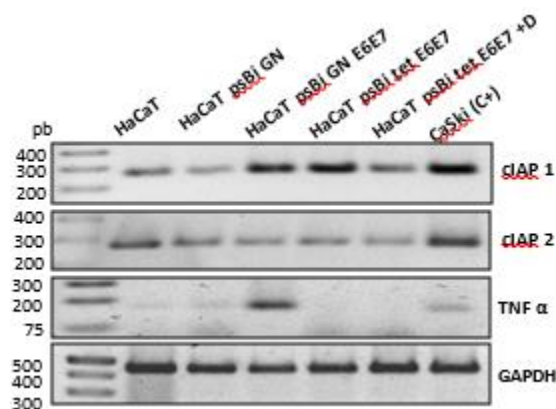


Figura 12. Expresión de mensajero de: cIAP1, 2 y TNF α en HaCaT y HaCaT transfectadas con E6E7

Debido a que de la totalidad de resultados obtenidos de la transfección celular estable de HaCaT con E6/E7 de HPV16 el cambio más evidente fue el aumento en expresión del mensajero de TNF- α , se decidió dirigir el proyecto de investigación en entender el papel que tiene esta citocina primero en el modelo celular control, (células no transfectadas) para posteriormente comparar los resultados con el modelo que expresa las oncoproteínas de HPV, por otro lado, la evaluación de funcionalidad (resistencia a muerte) también se llevó a cabo primero en el modelo control y entender el papel de NF κ B clásica y alterna bajo condiciones de no expresión de E6/E7.

Ensayos de Muerte celular en línea celular HaCaT (no transfectada)

Mediante citometría de flujo se llevaron a cabo ensayos de apoptosis en la línea celular HaCaT sin transfectar para determinar su sensibilidad a diferentes compuestos; TNF alfa (citocina que puede llevar a activación de NF- κ B o muerte celular) BNPT (Inhibidor de cIAP 1 y 2) y BAY 11-7085 (inhibidor de NF- κ B), los resultados obtenidos demuestran que la línea celular HaCaT únicamente es sensible a muerte en presencia de BAY inhibidor de NF- κ B, a pesar de haber usado 2 concentraciones de los otros 2 inhibidores (BNPT y TNF alfa), las células presentan resistencia y su viabilidad no se ve afectada, en la figura 13 se observa que el porcentaje de células muertas y en apoptosis es de aproximadamente el 40 % en presencia de BAY 11-7085, el porcentaje de células vivas disminuye por debajo del 20 % por lo que la viabilidad celular está claramente afectada, la inhibición de NF- κ B provoca muerte celular en HaCaT y esto posiblemente esté relacionado con la producción de TNF- α , como se ha descrito anteriormente la vía clásica de NF- κ B se encuentra constitutivamente activa en HaCaT, esto refuerza la importancia que tiene la vía en la línea celular.

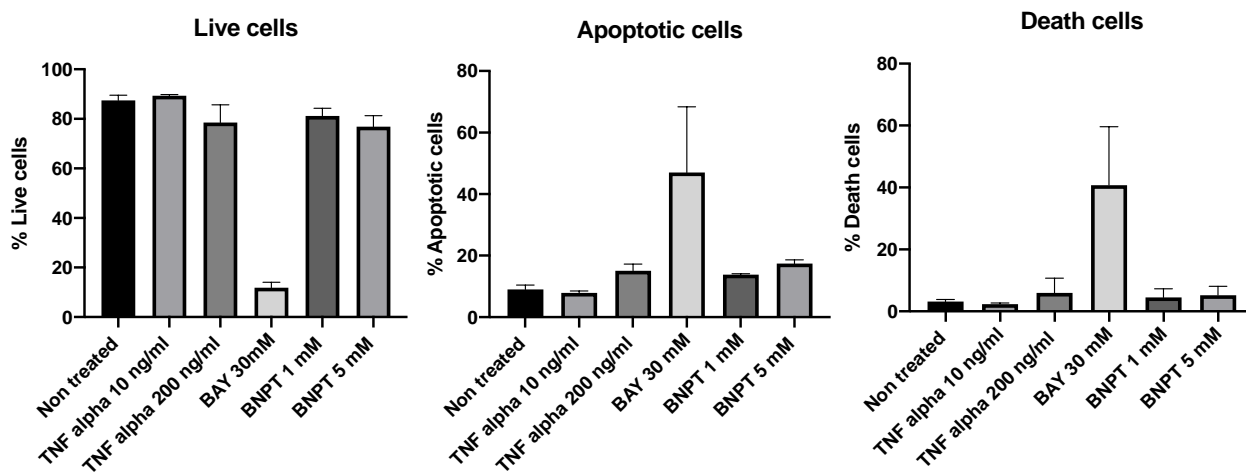


Figura 13. Ensayos de muerte celular, línea celular HaCaT en presencia de diferentes estímulos apoptóticos. Se observa efecto únicamente en presencia de BAY 30mM

Determinación de la expresión de cIAP 1 y 2 en HaCaT

Debido a la ausencia de muerte celular en presencia de BNPT inhibidor de cIAP 1 y 2 se determinó analizar la expresión de estas proteínas mediante Western Blot (Figura 14) y se observa claramente (que estas proteínas son degradadas en presencia de 5 μ M BNPT, por lo que se confirma que la degradación de cIAP 1 y 2 no afecta la viabilidad celular, por otro lado, se analizó la expresión del mensajero de cIAP 1, 2 y TNF- α en presencia de BNPT y se encontró una tendencia de degradación del mensajero en presencia del inhibidor de la IAPs, con respecto al TNF- α se observa que en presencia de 1 μ M BNPT favorece la síntesis de mensajero de TNF- α , pero disminuir a la concentración más alta. Este resultado es consistente con la observación de que TNF- α disminuye después de 24 h de diferenciación o presencia de los componentes de la vía alterna de NF- κ B (dato no mostrado)

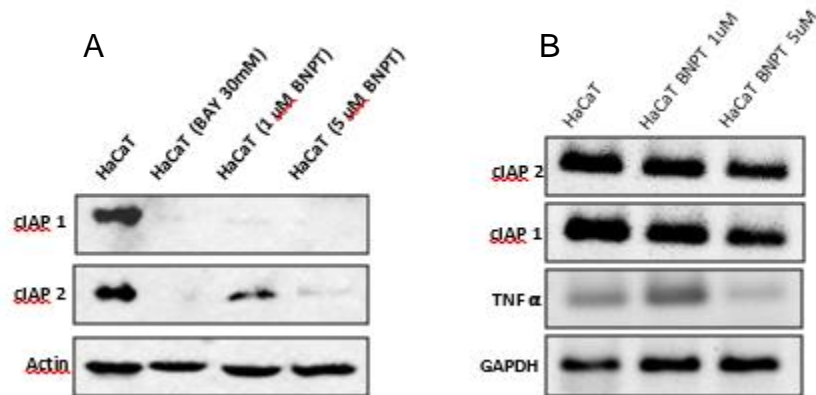


Figura 14. Decremento en la expresión de cIAP 1 y 2 en HaCaT tratadas BNPT (A) proteína y (B) mensajero

Detección de TNF-α mediante ELISA y WB

Una vez que se determinó la resistencia y sensibilidad de HaCaT a diferentes compuestos se llevaron a cabo ensayos de ELISA en sobrenadantes para detectar la producción de TNF-α soluble (sTNF-α) citocina importante en la activación y regulación de NF-κB, se observa en la Figura 15 panel A que las células en presencia de BAY se detectan en el medio aproximadamente 300 pg/mL de TNF-α, y esta producción de TNF podría estar directamente relacionada con el efecto de muerte demostrado, comparado con la condición control y en presencia de BNPT no hay aparente secreción de TNF-α, en estos los niveles de muerte celular son muy bajos; por otro lado, se analizó la expresión proteica de TNF-α membranal (mTNF-α) en extractos totales de las células tratadas con BAY y BNPT y contrario a lo observado para sTNF-α, se detectan bandas de 26 kDa correspondientes a mTNF-α aunque más claramente en las células tratadas con BNPT, esto a pesar de un evidente aumento en la expresión de la Enzima Convertidora de TNF-α (TACE), cabe

destacar que en presencia de BAY no se detecta la forma membranaral de la citocina, ya que los restos de las células en apoptosis, probablemente se pierden en el lavado de las células, durante la preparación de extractos proteicos (Figura 15 Panel B). Se requieren más experimentos para comprender porque hay un aumento aparente de mTNF- α en las células HaCaT tratadas con BNPT.

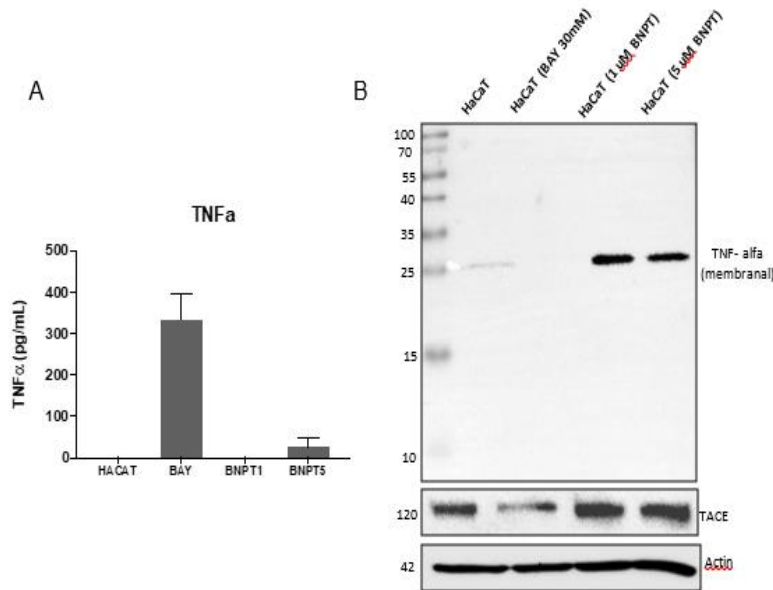


Figura 15. Secreción de TNF a (soluble), únicamente en presencia de BAY 30mM

Activación de la vía alterna de NF- κ B por BNPT y expresión de receptores 1 y 2 de TNF- α en células HaCaT.

Los resultados anteriores llevaron a analizar la expresión de los receptores de TNF alfa TNFR1 y TNFR2 (Figura 16), se encontró que en presencia de BAY únicamente hay expresión de TNFR2 y posiblemente mediante la activación de este mediante TNF α soluble se lleve a cabo la señalización que causante de la muerte celular observada, por otro lado, HaCaT en presencia de BNPT expresa ambos receptores y una posible interacción con TNF- α membranaral lleve a la activación de la vía clásica o alterna de NF- κ B, por lo que se usaron anticuerpos para detectar RELB y NIK, componentes fundamentales de la vía alterna de NF- κ B, se puede observar

en la Figura 16 que la línea celular HaCaT en presencia de BNPT se expresa RELB y se lleva a la acumulación de NIK, sin la necesidad del uso de un inhibidor de proteosoma, debido a que BNPT lleva a la activación de la vía alterna de NF- κ B y esta sea una posible explicación de la resistencia a la muerte encontrada en las células tratadas con BNPT.

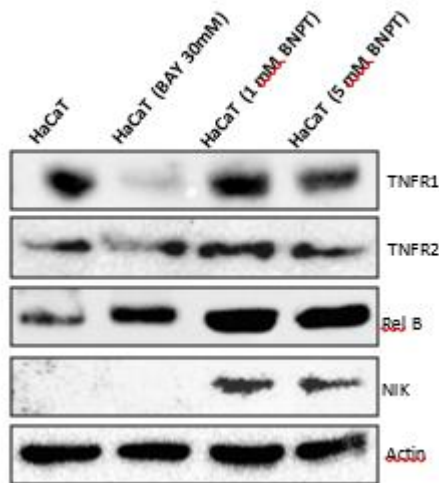


Figura 16. Expresión de TNFR1, 2 RelB y NIK en HaCaT tratadas con BNPT

Debido a que se comprobó la activación de la vía alterna de NF- κ B se llevaron a cabo ensayos de Western Blot en fracciones nucleares y citoplasmáticas para detectar los componentes de la vía alterna de NF- κ B (RelB) y de la vía clásica que anteriormente se ha descrito activa en esta línea celular, en la Figura 17 se puede observar que en núcleo se detectó aumento en la translocación de Rel B componente de la vía alterna de NF κ B por lo que se confirma actividad de la vía alterna de NF κ B en presencia de BNPT.

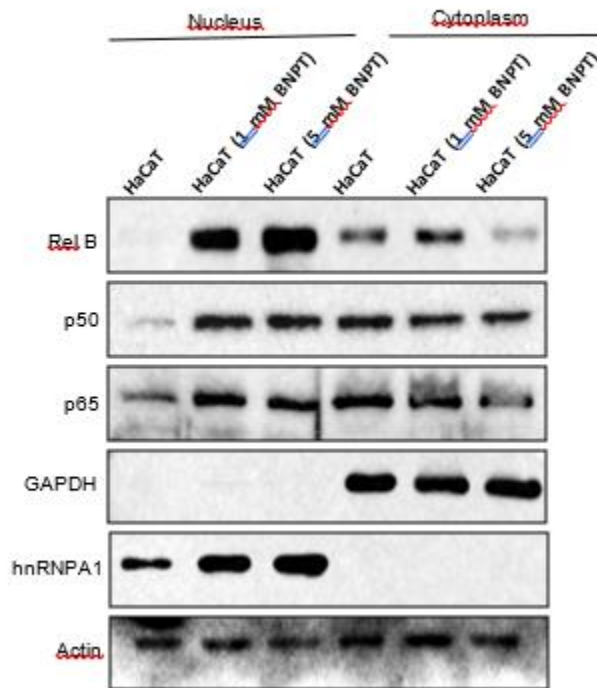


Figura 17. Fracciones Núcleo/Citoplasma de HaCaT tratadas con BNPT

DISCUSIÓN

La actividad de las vías clásica y alterna de NF- κ B regula la transcripción de diversos genes involucrados en diferentes procesos celulares (inflamación, apoptosis, resistencia a muerte, diferenciación, entre otros); debido a la gran cantidad de procesos en los que se encuentra involucrada esta vía de señalización, es de interés particular en el estudio de diversas patologías tales como, el cáncer de cérvix.

El objetivo inicial del presente proyecto de investigación biomédica tiene por particularidad entender la interacción entre las vías de señalización de NF- κ B con las oncoproteínas E6/E7 de HPV16, causantes de la transformación celular, promoviendo su malignización, ya que posiblemente directa o indirectamente, las oncoproteínas virales alteren positiva o negativamente la actividad de NF- κ B.

Se ha reportado que la presencia de E6/E7 de HPV 16 altera la actividad de NF- κ B en células epiteliales cervicales mediante la inhibición de la actividad de NF- κ B en células pertenecientes a la zona de transformación del cérvix (Vandermark, 2012), sugiriendo que esta inhibición de la actividad del factor de transcripción, favorece el proceso de inmortalización, esta relación entre la actividad de NF- κ B con la presencia de las oncoproteínas virales es un antecedente que deja en claro la importancia de alteraciones en la señalización de NF- κ B, durante el desarrollo tumoral en el Cérvix; sin embargo, contrario a lo reportado en los resultados obtenidos en el presente proyecto, la transfección de E6/E7 en la línea celular HaCaT no altera completamente la actividad de NF- κ B, nosotros observamos solo disminución de la expresión de cREL en el modelo de transfectantes que expresan constitutivamente los oncogenes E6/E7, pero no en el modelo de expresión controlada, probablemente este efecto ocurre lentamente y requiere tiempos más largos a los monitoreados en el modelo inducible o probablemente el efecto debe a diferencias en los modelos (por ejemplo diferencias en la fuerza de los promotores o eficiencias de transfección) y estos resultados deben ser estudiado con mayor profundidad. Los queratinocitos de piel de donde proviene la línea celular HaCaT presenta constitutivamente activa la vía clásica de NF- κ B, cumpliendo un papel importante en el proceso de supervivencia, ya que al ser una célula transformada (no oncogénica) tiene un fenotipo inmortal a pesar de tener P53 activa y funcional. Por otro lado, en el antecedente mencionado solo se toma a consideración la actividad de P65, componente de la vía clásica de NF- κ B, por lo que se puede sugerir relación entre E6/E7 de HPV 16 en la actividad de la vía clásica.

La vía alterna de NF- κ B cuyos componente RELB y P52 cumplen diferentes funciones en procesos celulares tales como diferenciación y linfogénesis (Sun 2011), en resultados obtenidos en el laboratorio, se ha descrito la importancia de la vía alterna de NF- κ B durante el proceso de diferenciación estimulado por aumento en la concentración de Calcio en la línea celular HaCaT, por lo que entender la relación de E6/E7 con el factor de

transcripción NF- κ B, tendría que considerar a los componentes de la vía clásica como de la vía alterna.

En el laboratorio se ha analizado esto usando como modelo las líneas celulares provenientes de Cáncer Cervicouterino; SiHa, CaSki y C33-A, observándose una activación diferencial de la vía clásica y alterna de NF- κ B, particularmente se ha observado que en CaSki (línea celular con mayor número de copias virales) la activación de la vía clásica y alterna de NF- κ B es evidenciada mediante la detección nuclear de todos los componentes de NF- κ B; sin embargo, los componentes de la vía alterna son detectada claramente en todas las líneas celulares HPV positivas o negativa, sugiriendo que la vía de señalización alterna de NF- κ B cumple un papel importante en la biología o supervivencia de las células malignas de cérvix, por lo que para analizar esto a profundidad es que se planteó establecer un modelo de transfección celular E6/E7 en la línea celular HaCaT.

En 2015, VanWaes y colaboradores reportaron que la vía alterna de NF- κ B tiene un papel de importancia en el desarrollo del cáncer de cabeza y cuello, ya que observaron que estos tumores tienen una elevada expresión de p52 y RelB componentes de la vía alterna de NF- κ B, esta alta actividad de la vía alterna de NF- κ B es debido a una baja expresión de TRAF3, molécula asociada a la señalización de la vía clásica de NF- κ B, una vez que reestablecen la expresión de TRAF3, las células se vuelven sensibles a muerte por TNF- α y Cisplatino, llevando a un decremento en la actividad de la vía alterna de NF- κ B y evidenciando su importancia en la resistencia a muerte. Este estudio soporta lo observado en los antecedentes del laboratorio cuya particularidad radica en la participación de la vía alterna de NF- κ B en la resistencia a la muerte, por otro lado, en los resultados obtenidos en el presente proyecto, la línea celular HaCaT presenta resistencia a la muerte mediante la inhibición y degradación de IAP 1 y 2, esta resistencia a la muerte se pudo confirmar que es debido a la acumulación de NIK y consiguiente activación de RELB mediante su translocación nuclear teniendo un papel

importante en la resistencia a muerte. Por otro lado, en resultados obtenidos en el laboratorio por el Dr. Aguiar, al tratar las células CaSki con BNPT (inhibidor de las IAPs) usado en el presente estudio, sensibiliza diferencialmente a las líneas celulares SiHa y CaSki a muerte, nuevamente evidenciando el papel importante de la vía alterna de NF- κ B en el establecimiento de un fenotipo tumoral.

Una vez que el HPV logra infectar una célula basal del epitelio cervical, se activan distintos receptores que funcionan como sensores que identifican patrones moléculas asociado a patógenos (PAMPs) llevando a la activación de la vía clásica de NF- κ B que producirá proteínas pro inflamatorias como el TNF- α activando el reclutamiento de células inmunes como los linfocitos T y B combatiendo el proceso de infección viral (Shimada S, 2014), esta activación de la vía clásica de NF- κ B como respuesta al inicio de la infección viral por HPV ha sido descrita por diversos autores; sin embargo, Karim en 2013, reporta que esta activación es detectada 24 h después posteriores a la infección y es suprimida 48 h después de la infección.

El proceso de infección se compone de 3 fases; Amplificación inicial en células basales no diferenciadas donde el número de copias virales es menor a 200 y la respuesta pro inflamatoria debida a la activación de NF- κ B y producción de citocinas también es mediada por la interacción de E1 de HPV con NF- κ B para inactivar la respuesta inmune, esto se mantienen durante la fase de Mantenimiento estable de la infección, donde los queratinocitos basales infectados comienzan a diferenciarse y migrar a través de los diferentes estratos de la epidermis (estrato granuloso y cornificado), una vez que están completamente diferenciados inicia la fase de amplificación productiva donde el número de copias virales aumenta exponencialmente y se propone que E6/E7 cumplen algún papel en la inactivación de los factores de la familia NF- κ B ,que se activan por la infección viral (Kiyono 2016), tomando en consideración lo mencionado en estos antecedentes es importante hacer mención que la actividad que tienen tanto la vía clásica como alterna de NF-

κ B durante el proceso de diferenciación inducida por calcio de los queratinocitos, descrito en este laboratorio. Este proceso podría verse afectado por la presencia de los oncogenes E6/E7 de HPV 16, por lo que es necesario establecer un modelo que considere la actividad de NF- κ B en el contexto de presencia de las oncoproteínas virales durante la diferenciación del queratinocito, ya que, usando células no diferenciadas y transfectadas con los oncogenes virales de HPV y promover su diferenciación, se establecería un modelo similar al proceso de infección viral y se podría entender la participación de los factores de la vía clásica y alterna de NF- κ B durante la infección, mientras las células están activamente diferenciándose, modelo ya establecido en el laboratorio y en proceso de estudio.

Duerksen-Hughes en 2002 reporta que la oncoproteína E6 de HPV 16 tiene la capacidad de unirse al C terminal de TNFR1 evadiendo así la inducción de la apoptosis mediante la inactivación de NF- κ B llevando a que no se produzca TNF- α , molécula encargada de activar la señalización de muerte celular, sin embargo, estos experimentos fueron realizados en fibroblastos de ratón y células de osteosarcoma humano, las células blanco de la infección de HPV son los queratinocitos y como observamos en los resultados del presente estudio, la línea celular HaCaT presenta resistencia a muerte por TNF- α y BNPT, a pesar de haber usado concentraciones altas de TNF- α soluble, la línea celular HaCaT presenta resistencia a la muerte a pesar de expresar TNFR1 y TNFR2; esta resistencia posiblemente sea explicado a que la unión del ligando TNF- α al receptor además de activar la señalización a apoptosis lleva a la activación de NF- κ B alternativa mediante TNFR2 y este le confiera resistencia a la muerte, para definir esto se sugiere llevar al cabo experimentos de apoptosis usando células HaCaT control y transfectadas (E6/E7) y tratadas con TNF- α y concentraciones bajas de BNP que activen al vía alterna, y compararlos con células que solo HaCaT tratadas solo con TNF- α . Las células HaCaT en condiciones de crecimiento tienen activa solo la vía clásica. Además, enriquecer estos ensayos con caracterización celular como la detección de translocación nuclear de los factores de NF- κ B y análisis de

acumulación de NIK, para tener una explicación mejor de la resistencia a muerte observada relacionada al factor de transcripción NF- κ B.

Por otro lado, en los resultados observados en el presente estudio, cuando las células son tratadas con BAY inhibidor de la fosforilación de I κ B, por lo tanto, evita que este sea degradado vía proteosoma regulando negativa y principalmente la activación de la vía clásica de NF- κ B, se detecta un alto índice de muerte celular y una alta concentración de TNF- α en los sobrenadantes de cultivo. Como se ha mencionado, se ha sugerido que la vía clásica de NF- κ B es de importancia en el establecimiento de inmortalización en HaCaT, por lo que este resultado evidencia la adición de los cultivos inmortalizados a la actividad clásica de NF- κ B. Estos datos evidencian nuevamente la importancia del factor de transcripción NF- κ B en la supervivencia celular y quizás en la resistencia a la apoptosis.

Se ha propuesto que la infección a queratinocitos por HPV modifica la expresión de citocinas mediante interferencia en la activación de la vía clásica de NF κ B, Havard en 2001 evalúa la expresión nuclear de P65 y P50 componentes de la vía clásica de NF- κ B y reporta que en presencia de HPV la vía clásica de NF- κ B aparentemente se encuentra inactiva debido a la ausencia de translocación nuclear de P65 y P50 y este mecanismo es propuesto como una posible explicación del decremento en la secreción de citocinas pro inflamatorias tales como TNF- α , llevando a la evasión del sistema inmune; sin embargo, esto difiere con lo reportado por el laboratorio donde observamos clara expresión nuclear de los componentes de la vía clásica y alterna de NF- κ B en CaSki, pero no en células SiHa,; además ambas células expresan temporalmente diferente cantidad de citocinas (como TNF e Il-6) por lo que es de interés entender que papel específicamente regulan las vías del factor de transcripción NF- κ B durante la infección viral y como esto altera la secreción de citocinas en el queratinocito, y también investigar una vez que está establecida la infección, como afecta la infección en los estratos superiores en diferenciación cuando la actividad viral esta activa.

Se ha discutido en diversos estudios que la evasión del sistema inmune durante el proceso de infección viral es fundamental para llegar a una infección productiva que posteriormente dirija a la transformación y malignización celular dando origen al desarrollo de la patología, durante este proceso de infección inicial la regulación negativa por parte del HPV de la vía clásica de NF- κ B parece tener correlación, por otro lado, una vez que se encuentra establecida la infección y el número de copias virales aumenta, la expresión de las oncoproteínas se hace presente en el epitelio cervical, la actividad de NF- κ B nuevamente se ve alterada, tanto en la vía clásica como alterna, tal como lo observamos en la actividad diferencial observada en SiHa, CaSki y C33-A, en este punto la actividad de NF- κ B en las diferentes líneas celulares, puede estar relacionada con las diferencias de actividad en las células epiteliales, al momento de la adquisición de un fenotipo inmortal.

En el presente estudio se logró transfectar el bicistrón E6/E7 de HPV16 en la línea celular de queratinocitos HaCaT, este sistema de transfección estable provee de una herramienta útil para entender el papel específico de las oncoproteínas en diferentes vías de señalización y diferentes procesos celulares ya sea en condiciones de expresión constitutivas donde E6/E7 se encuentran activos o en condiciones dependientes de estímulo donde E6/E7 comienzan a replicarse simulando un estadio diferente a la expresión constitutiva. En otros estudios, tal como en el llevado a cabo por Jave-Suarez en 2019, de igual manera se transfectó HaCaT con E6/E7 de HPV16 para determinar su importancia en la regulación de Interleucina 6, ellos describen que la presencia de E6 lleva a una fuerte sobre expresión del mensajero de IL-6 en las células transfectadas, aunado al aumento en la excreción de IL-6 en células, este efecto se observa de manera discreta en presencia de E7, sin embargo, dado que todos los experimentos fueron dirigidos al análisis de la expresión del mensajero y secreción de las citocina, por lo que aún se debe evaluar si los receptores de IL-6 o TNF se señalizan autocrina y paracrinamente.

El modelo establecido y caracterizado en el laboratorio de HaCaT transfectada con el bicistrón de E6/E7 puede usarse en el análisis de diferentes ligandos y diferentes respuestas a estímulos de proliferación, supervivencia o de muerte celular. Es por ello que el presente proyecto se centró en caracterizar la respuesta a diferentes moléculas causantes de apoptosis en condiciones basales, es decir, en ausencia de E6/E7, desafortunadamente no se pudo continuar por la situación actual de pandemia con su comparación con las células que expresan E6/E7 de manera constitutiva o inducible, lo que deberá analizarse en el futuro.

CONCLUSION

La transfección de células HaCaT con E6/E7, altera la vía NF- κ B, pero aparentemente solo disminuye la expresión de cREL y la localización nuclear de cREL y P65.

RESUMEN DE RESULTADOS

- 1.- Se obtuvo un modelo de transfección estable en células HaCaT que expresan el bicistrón de E6/E7 de HPV16 constitutivamente y dependiente de estímulo.
- 2.- Todos los componentes de NF- κ B de la vía clásica y alterna se expresan en condiciones basales y en células transfectadas con E6/E7, la expresión nuclear de RELA y P50 en todas las condiciones sugieren actividad de la vía clásica de NF- κ B.
- 3.- La expresión constitutiva de E6/E7 lleva a un aumento en la síntesis del mensajero de TNF- α
- 4.- La línea celular HaCaT es resistente a muerte, inducida por TNF- α , esta línea celular expresa los componentes de la vía clásica de NF- κ B en núcleo, por lo que esto puede estar relacionado a su supervivencia celular.

5.- La línea celular HaCaT es resistente a muerte posterior a la inhibición de cIAP 1 y 2 con BNPT, esto debido a la acumulación de NIK y posterior activación de la vía alterna de NF- κ B.

6.- La inhibición de cIAP 1 y 2 lleva las células a expresar TNF- α membranaral y a u incremento en la expresión de TACE

7.- La degradación de I κ B α por BAY afecta la viabilidad celular de HaCaT, con un alto índice de muerte celular, esto confirma la importancia de la vía clásica de NF- κ B en el fenotipo inmortal adquirido por HaCaT.

8.- Como consecuencia de la muerte celular en HaCaT por acción de BAY, se detectan altas concentraciones de TNF- α , citocina proinflamatoria que mediante la activación de TNFR1 puede llevar a apoptosis.

PERSPECTIVAS

1.- Llevar a cabo los ensayos de muerte celular con BNPT, BAY y TNF- α en las células transfectadas con el Bicistrón E6/E7 de HPV16 para determinar su resistencia a la muerte.

2.- Someter al modelo celular transfectado con E6/E7 constitutivo a las condiciones de diferenciación celular establecidas anteriormente en el laboratorio y determinar si la presencia de los oncogenes altera la actividad de NF- κ B alterna activa durante la diferenciación celular.

3.- Una vez que la línea celular HaCaT diferenciada y transfectada se encuentre estable llevar a cabo análisis de muerte celular.

4.- Estudiar otros posibles ligandos o citocinas como el caso de IL6 en el modelo celular transfectado con HPV16 E6E7

5.- Llevar a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina para determinar que genes está regulando la vía clásica y alterna de NF- κ B en todos los modelos establecidos.

REFERENCIAS

1. Artandi SE, and DePinho RA. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31, 9–18.
2. Artaza-Irigaray, Molina-Pineda, Aguilar-Lemarrroy, Ortiz-Lazareno, Limón-Toledo, Pereira-Suárez and Jave-Suárez. (2019) E6/E7 and E6* From HPV16 and HPV18 Upregulate IL-6 Expression Independently of p53 in Keratinocytes. *Front. Immunol.*
3. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, and Saeland S. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol.* 12:881.
4. Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, et al. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kD TNF receptor-human TNF β complex: implications for TNF receptor activation. *Cell.* 73(3): 431-445.
5. Basseres DS, Baldwin AS. Nuclear factor κ B and inhibitor of κ B kinase pathways in oncogenic initiation and progression. (2006). *Oncogene.* 25(51): 6817-6830.
6. Bharat A. Bokyung S. Subash C. Inflammation and cancer. (2014). *Adv in exp Med and Biol.* Springer basel.
7. Bautista Gaytan. 2017. Análisis de los componentes de las vías de NF κ B y algunos genes blancos en la línea celular HaCaT, Tesis de Maestría.
8. Bianchi K, Meier P. A tangled web of ubiquitin chains. *Breaking news in TNFR1 signaling.* (2009). *Mol Cell.* 36(5): 736-742.
9. Bishop GA, Xie P, Multiple roles of TRAF3 signaling in lymphocyte function. (2007). *Immunol Res.* 39: 22-32.
10. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Jhonson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor-alpha from cells. *Nature;* 385(6618):729–733.
11. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 106:761-771.
12. Bradley JR. TNF- mediated inflammatory disease. (2008). *J Pathol.* 214:149-160
13. Broemer M. Meier P. Ubiquitin-mediated regulation of apoptosis. (2009). *Trends Cell Biol.* 19(3): 130-140.
14. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, et al. (2005) A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis;*191: 1808–16.
15. Chaturvedi V, Qin JZ, Denning MF, Choubey D, Diaz MO, and Nickoloff BJ. (1999). Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. *J Biol. Chem,* 274: 23358- 23367.

16. Chen TM, Pecoraro G and Defendi V. (1993). Genetic analysis of in vitro progression of human papillomavirus-transfected human cervical cells. *Cancer Res.* 53, 1167-1171.
17. Cheng, S., Schmidt-Grimminger, D. C., Murant, T., Broker, T. R. and Chow, L. T. (1995). Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev.* 9, 2335–2349.
18. Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. BAFF induced NEMO-independent processing of NF-kappaB2 in maturing B cells. (2002). *Nat immunol.* 17: 525-535.
19. Crosbie E, Einstein M, Franceschi S, Kitchener H. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet Seminar*; 382: 889-899.
20. Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT. (2004). Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 14252–14257.
21. Day PM, Thompson CD, Schowalter RM, Lowy DR, Schiller JT. (2013). Identification of a role for the trans-Golgi network in human papillomavirus 16 pseudovirus infection. *J. Virol.* 87, 3862–3870.
22. De Gregori, J. and Johnson, D. (2006). Distinct and overlapping roles for E2F family members in transcription, proliferation and apoptosis. *Curr. Mol. Med.* 6, 739–748.
23. De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol*; 13: 607–15.
24. De Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, et al. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*; 7: 453–59.
25. Dejardin M. (2006). The alternative NF-kappa B pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol.* 72:1161- 1179.
26. Demers, G. W., Halbert, C. L., Galloway, D. A. (1994). Elevated wild-type p53 protein levels in human epithelial cell lines immortalized by the human papillomavirus type 16 E7 gene. *Virology* 198, 169–174.
27. Denfel R, Hollenbaugh D, Fehrenbach A, Weiss J, Leoprechting A, Mail B, Voith U, Schopf E, Aruffo A. and Simon J. (1996). CD40 is functionally expressed on human keratinocytes. *Eur. J Immunol* 26: 2329-2334.
28. Doorbar, J. Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker T, Stanley M. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 (Suppl. 5), F55–F70.
29. Duensing, S. & Munger, K. (2004). Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int. J. Cancer* 109, 157–162.
30. Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K. and Harlow, E. (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934–937.

31. Ferlay J, Bray J, Forman D, Mathers C, Parkin D. (2010). International Journal of Cancer. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008
32. Filippova, M.; Song, H.; Connolly, J.L.; Dermody, T.S.; Duerksen-Hughes, P.J. (2002) 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.
33. Fusenig NE, Boukamp P. (1998). Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog* 23:144-58.
34. Gage, J. R., Meyers, C. & Wettstein, F. O. (1990) The E7 proteins of the non-oncogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J. Virol.* 64, 723–730.
35. Greten FR and Karin M. (2004). The IKK/NK-kappa B activation pathway- a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett.* 206: 193-199.
36. Grousson J, Ffrench M, Concha M, Schmitt D, Navarro-Peguet J. (2000). CD40 ligation alters the cell cycle of differentiating keratinocytes. *The Journal of investigative Dermatology.* 114 (3): 581-586.
37. Harle-Bachor C, Boukamp P. (1996). Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6476-81.
38. Havard L, Delvenne P, Frare J, Boniver J, Giannini SL. (2002). Differential production of cytokines and activation of NF κ B in HPV-Transformed keratinocytes. *Virology.* 298: 271-285.
39. Hu Y, Baud V, Delhase M, Zhang P, Deerinck T, Ellisman M, Jhonson R and Karin M. (1999). Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK alpha subunit of IkappaB kinase. *Science.* 284: 316-320.
40. Jialing Zhang, Hui Chen, Xinping Yang, Emine Guven, Ruth Nussinov, Zhong Chen and Carter VanWaes. (2015). Defective TRAF3 modulates alternative NF-kB signaling and cytokine expression to promote cancer cell survival in HPV positive head and neck cancer. *J Immunol* May 1, 194 (1 Supplement) 211.30
41. Jones, D. L., Alani, R. M, Munger, K. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 11, 2101–2111.
42. Kaelin W. (1999). Functions of the retinoblastoma protein. *BioEssays.* 21:950–958
43. Katzenellenbogen R, Egelkrout E, Vliet-Gregg P, Gewin L, Gafken P, Galloway D. (2007). NFX1–123 and poly(A) binding proteins synergistically augment activation of telomerase in human papillomavirus type 16 E6-expressing cells. *J. Virol.* 81, 3786–3796.
44. Karim R, Tummers B, Meyers C et al. (2013). Human papillomavirus (HPV) upregulates the cellular deubiquitinase UCHL1 to suppress the keratinocyte's innate immune response. *PLoS Pathog.* 9(5),

45. Kawamura T, Ogawa Y, Aoki R, Shimada S. (2014). Innate and intrinsic antiviral immunity in skin. *J. Dermatol. Sci.* 75(3), 159–166 Crossref, Medline, CAS, Google Scholar
46. Kumar A, Zhao Y, Meng G, Zeng M, Srinivasan S, Delmolino L, Gao Q, Dimri G, Weber G, Wazer D, Band H and Band V. (2002). Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5801–5812.
47. Lehmann TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, Metcalf RA, Stampfer MR, Fusenig NE, Rogan EM, Harriss CC. (1993): p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 14:833-839.
48. Li, X. and Coffino, P. (1996). High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J. Virol.* 70, 4509–4516.
49. Lippens S, Denecker G, Ovaere P, Vandenebeebe P, Declercq W. (2005). Death penalty for keratinocytes; apoptosis versus cornification. *Cell death and differentiation.* 12, 1497-1508.
50. Liu H, Sidiropoulos P, Song G, Pagliari L, Birrer M, Stein B, Anrather J and Pope R. (2000). TNF α gene expression in macrophages: Regulation by NF κ B in independent of cJun or C/EBP β . *J Immunol*; 164:4277-4285.
51. Longworth, M. S, Wilson, R, Laimins, L. A. (2005). HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J.* 24, 1821–1830.
52. Longworth, M. S. and Laimins, L. A. (2004). The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc fingerlike motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 78, 3533–3541.
53. Machalek DA, Poynten M, Jin F, (2012). Anal human papillomavirus infection and associated neoplastic lesions in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*; 13: 487–500.
54. Maucort-Boulch D, Plummer M, Castle PE. (2010). Predictors of human papillomavirus persistence among women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Int J Cancer*; 126: 684–91.
55. Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. (2001). NF κ B signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol.* 21: 2599-5305.
56. Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. (2001) NF- κ B signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol*; 21:5299–5305.
57. Mota F, Rayment N, Chong S, Singer A, and Chain B. (1999). The antigen presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol.* 116, 33-40.
58. Munger, K. Werness B, Dyson N, Phelps W, Harlow E, Howley P. (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8, 4099–4105.

59. Munoz N, Mendez F, Posso H, et al. (2004) Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis*; 190: 2077–87.
60. Napestchnig J, Wu H. Molecular basis of NF κ B signaling. (2013) *Annu Rev Biophys*. 42: 443- 468.
61. Nees M, Geoghegan J, Tehila H, Frank S, Miller L, Woodworth C. (2001). Papillomavirus Type 16 oncogenes downregulate expresión of interferón- responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF κ B responsive genes in cervical keratinocytes. *Journal of Virology*. 9: 4283-4296.
62. Pasparakis M, Courtois G, Hafner M, Schmidt- Supprian M, Nenci A, Toksoy A, Krampert M, Goebeler M, Gilitzer R, Israel A, Krieg T, Rajewsky K and Haase I. (2002). TNF mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature*. 417: 861-866.
63. Patel D, Huang SM, Baglia LA. and McCance, D. J. (1999). The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J*. 18, 5061–5072.
64. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. (2009). Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLOS Pathog*. 5, e1000318.
65. Quin JZ, Chaturvedi V, Denning M, Choubey D, Diaz M, Nickoloff B. (1999). Role of NF κ B in the apoptotic resistant phenotype of keratinocytes. *Journal Biological Chemistry*. 274:53: 37957-37964.
66. Reichert U, Michel S, Schmidt R. (1993). The cornified envelope: a key structure of terminally differentiating keratinocytes. (Eds Darmon M, and Blumenberg M) Academic Press.London.
67. Rodriguez AC, Schiff man M, Herrero R, et al. (2010). Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection. *J Natl Cancer Inst*; 102: 315–24.
68. Scheffner, M, Huibregtse, J. M, Vierstra, R. D. and Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495–505.
69. Scheffner, M, Werness, B, Huibregtse, J, Levine J, Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129–1136.
70. Seitz CS, Lin Q, Deng H, Khavari PA. (1998). Alteration in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. *Proc Natl Acad*. 3;95 (5): 2307-2312.
71. Sen Baltimore D. (1998). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 46: 705-716.
72. Shao-Cong Sun. (2010). Non-canonical NF- κ B signaling pathway *Cell Res*. 2011 Jan; 21(1): 71–85.

73. Shin, M, Balsitis, S., Brake, T, Lambert, P. (2009). Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21Cip1 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res.* 69, 5656–5663.
74. Steven AC and Steinert PM. (1994). Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J Cell Sci.* 107, 693-700.
75. Sun SC, Ganchi PA, Beraud C. Ballard, DW, Greene WC. (1993). NFκB controls the expression of inhibitor IκBa: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science.* 259: 1912-1915.
76. Sun SC, Ley SC. (2008). New insights into NF-kappa B regulation and function. *Trends immunology.* 29: 469-478.
77. Sun SC. (2010). Controlling the fate of NIK: a central stage in non-canonical NF-kappa B signaling. *Sci signal.* 3: 18.
78. Sun SC. (2011). Non canonical NFκB signaling pathway. *Cell research.* 21; 71-85.
79. Tomomi Nakahara, Tohru Kiyono (2016) Interplay between NF-κB/interferon signaling and the genome replication of HPV. *Future Virology.*
80. Tully J, Nolin J, Guala A, Hoffman S, Roberson K, Lahue K, Velden J, Anathy V, Blackwell T and Janssen Heining M. (2012). Cooperation between classical and alternative NFκB pathways regulates proinflammatory responses in epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 47: 497-508.
81. Umeda J, Sano S, Kogawa K, Motoyama N, Yoshikawa K, Itami S, Kondoh G, Watanabe T and Takeda J. (2003). In vivo cooperation between Bcl-xL and phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling pathway for the protection of epidermal keratinocytes from apoptosis. *FASEB J.* 17:610-620.
82. Wang YW, Chang HS, Li CC, Yu CY, (2007), HPV-18 E7 conjugates to cMyc and mediates its transcriptional activity. *The Jour of Biochem and Cell Biol.* 39: 402-412.
83. Wang YX, Zhang ZY, Wang JQ, Qian XL, Cui J. (2018). *Onco Lett.* HPV16 E7 increases COX-2 expression and promotes the proliferation of breast cancer. 16(1): 317–325.
84. Wise-Draper TM and Wells S. (2008). Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. *Front. Biosci.* 13, 1003–1017.
85. Wright N, Alison m. 1985. *The biology of epithelial cell population.* Oxford. Vol1.
86. Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. (2001). NF-Kappa-B-inducing kinase regulates the processing of NF-KappaB2 p100. *Mol Cell.* 7:401-409.
87. Zerfass-Thome, K. Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JM, Jansen-Durr P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 13, 2323–2330.
88. Zilfou J, Lowe S. (2009). Tumor suppressive function of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Nov; 1(5)
89. Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard H. U. and O'Connor, M. J. (1999). The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J. Virol.* 73, 6209–6219.