

**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

“Análisis del efecto de la proteína E2 de VPH16 sobre la progresión del ciclo celular de células  
HaCaT”

Tesis que presenta

Q.F.B Raúl Edgardo Cruz Cadena

para obtener el Grado de

**Maestría en Ciencias**

en la Especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

Director de la Tesis:

Dr. J. Efraín Garrido Guerrero

México, D.F. agosto 2015

Este trabajo se desarrollo en el laboratorio de investigación en Biología Molecular y Celular del Cáncer (Lab. No 1) del Departamento de Genética y Biología Molecular de CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. José Efraín Garrido Guerrero y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante los fondos del proyecto 105174.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios:

Primeramente por permitirme seguir vivo, por haberme dado la oportunidad y el tiempo para desarrollarme como persona, y así poder alcanzar una meta más en mi vida. Por darme y enseñarme tantas cosas. Gracias.

A mis Padres:

Por traerme a este mundo, por darme amor, cariño y todo su esfuerzo en esta lucha día a día para darme esta oportunidad en la vida, por sus sacrificios, por ser mis maestros en todo momento de la vida y enseñarme con sus sabios consejos tantas cosas, por darme la libertad de tomar mis propias decisiones con su apoyo incondicional, confiando siempre en que realizaría la mejor elección. Mis estudios son la mejor herencia y herramienta que me pudieron dar para seguir este gran camino que llamamos vida. Muchas Gracias.

A toda mi Familia:

Por todo el apoyo y la ayuda brindada siempre, aunque no siempre estemos cerca, los llevo en mi corazón. Muchas Gracias

Al Dr. J. Efraín Garrido Guerrero:

Primeramente por otorgarme la confianza de pertenecer a su grupo de trabajo, por regalarme su tiempo, paciencia, liderazgo y conocimientos necesarios e indispensables para que la realización de esta tesis pudiera ser posible. Además de su amistad. Muchas Gracias.

A mis asesores de tesis:

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega del CINVESTAV y al Dr. Federico Centeno Cruz del IMEGEN, por ayudar a que esta tesis se llevara a cabo, por aclarar todas mis dudas, regalarme su conocimiento y amistad.

A Janeth Sánchez Ramos:

Por enseñarme todo lo que sé de trabajar en un laboratorio de biología molecular, por sus buenos consejos, por todo su tiempo invertido, y sobre todo por su amistad. Siempre la llevaré presente en mi vida. Muchas Gracias.

A los señores Pedro y Víctor:

Por brindarme su gran asistencia técnica en todo momento, por ayudar a que esta tesis se llevara a cabo, por aclarar todas mis dudas, regalarme su conocimiento tiempo y amistad. Muchas Gracias.

A todos los integrantes y hermanos de Laboratorio No. 1 de Genética:

A Víctor, Diana, Rocio, Janeth, Alberto, Alice, Alejandra, Katherine y Gloria por su compañerismo y buena amistad, la cual nunca olvidaré, que además espero perdure al paso de los años. Gracias por darme sus consejos, por brindarme su apoyo incondicional y por compartir conmigo tan buenos momentos. Muchas Gracias.

A mis Amigos del CINVESTAV:

A todos mis amigos que hice en esta gran institución, por darme sus consejos, por brindarme su apoyo incondicional, por estar conmigo y brindarme tan buenos momentos.

A mis Maestros del CINVESTAV:

Por regalarme su tiempo, sus conocimientos, su experiencia y su amistad todos estos años, por resolver todas mis dudas y apoyarme siempre.

Al CINVESTAV

Por haberme dado tantas cosas, por haber sido mi segunda casa todo este tiempo y enseñarme tanto. Siempre te representaré con orgullo y te llevaré en el corazón.

## RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) es un problema de salud en todo el mundo, siendo el segundo tipo de cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial. Su principal agente etiológico es el virus del papiloma humano (VPH), el cual al igual que otros virus contiene proteínas capaces de regular la progresión del ciclo celular para favorecer la replicación viral exitosa. Se conocen muy bien las actividades que las oncoproteínas virales E6 y E7 tienen sobre el ciclo celular, sin embargo no se conoce a detalle la manera en que otras proteínas del virus pudieran afectarlo. Se sabe que la proteína E2 de VPH16 tiene la capacidad de regular la expresión génica, tanto viral como celular. Entre los genes regulados transcripcionalmente por esta proteína se encuentran la ciclina A y la ciclina D que son importantes para la progresión del ciclo celular, por lo que el estudio del efecto de la proteína E2 de VPH16 sobre el ciclo celular permite tener más elementos para elucidar un mecanismo más amplio mediante el cual el VPH de alto riesgo es capaz de controlar la progresión del ciclo celular para favorecer una replicación viral exitosa.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si la proteína E2 de VPH16 modifica el tránsito por las fases G1 y S del ciclo celular de la línea celular epitelial VPH negativa HaCaT, y analizar el mecanismo mediante el cual lo hace. Para ello, se expresó a la proteína E2-16 mediante un sistema lentiviral.

Una vez verificada la exitosa expresión de la proteína E2-16 en células HaCaT; mediante ensayos de citometría de flujo se evaluó el ciclo celular encontrándose que E2-16 no provoca cambios importantes sobre el perfil asincrónico global del ciclo celular. Por lo que se procedió a la evaluación de la transición de las fases G1-S y la progresión de la fase S, encontrándose un retardamiento en la transición G1-S del ciclo celular provocada por la presencia de E2-16 con respecto a las células control.

Este efecto de retardamiento observado por la presencia de E2-16, se explicó al evaluar los niveles de la ciclina A mediante inmunodetección en fase sólida, encontrándose una drástica disminución en los niveles de esta proteína. Los niveles de ciclina A modulan la tasa de transición de la fase G1 hacia la S, por lo que se concluyó que la proteína E2-16 provoca el retardamiento en la transición de las fases G1-S disminuyendo los niveles de ciclina A.

## ABSTRACT

Cervical cancer is a health problem worldwide, been the second most common cancer in women worldwide. The main causative agent is the human papillomavirus (HPV), which as many other viruses contains proteins capable of regulate the cell cycle progression favouring a successful viral replication. The activities that the viral oncoproteins E6 and E7 have on the cell cycle are well known, however, it is not known in detail how the other virus proteins could affect it. It is known that E2 protein of HPV16 has the ability to regulate both viral and cellular gene expression. Among the genes transcriptionally regulated by this protein, are cyclin A and cyclin D that are very important components in cell cycle progression. For these reasons, the study of the effects on the cell cycle induced by HPV16 E2 protein will give more elements to elucidate a wider mechanism by which the high-risk HPV is capable to control the cell cycle progression in order to favor a successful viral replication.

The aim of this study was to evaluate whether the HPV16 E2 protein modify the transit through the G1 and S phases of the cell cycle, in the HPV negative epithelial cell line HaCaT, and analyze the mechanism by which it does. To do this, the protein E2-16 was expressed by a lentiviral system.

After verify the successful expression of the protein in HaCaT cells E2-16, using flow cytometric assays, we found that E2-16 protein expression is not able to induce significant changes on the overall asynchronous cell cycle profile. We proceeded to the evaluation of the transition G1-S phases and the S phase progression, finding a delay at the transition G1-S of the cell cycle caused by the presence of E2-16, regarding control cells.

This delayed effect observed by the presence of E2-16 was explained by the evaluation of the cyclin A levels of by western blot analysis. We observed a drastic decrease in the levels of Cyclin A protein, which is well known modulates the transition rate from G1 to S phase. Our results indicate that the protein E2-16 causes a delay in the transition from the G1-S phase by decreasing the levels of cyclin A.



## Índice

1.- INTRODUCCIÓN .....	10
1.1 Cáncer cérvico-uterino.....	10
1.2 Etiología del CaCU .....	12
1.4 Clasificación del VPH.....	14
1.5 Genoma del VPH y expresión de génica.....	15
1.6 Ciclo de vida del VPH .....	18
1.7 Proteína E2 .....	20
1.8 Ciclo celular.....	25
2. ANTECEDENTES.....	30
3. JUSTIFICACIÓN.....	36
4. HIPÓTESIS.....	36
5. OBJETIVOS.....	37
5.1 Objetivo General.....	37
5.2 Objetivos Específicos .....	37
6.Estrategia Experimental.....	38
7. MATERIALES Y METODOS .....	39
7.1 Cultivo celular .....	39
7.2 Titulación de lentivirus .....	39
7.3 Tinción con colorante cristal violeta.....	41
7.4 Infección de células HaCaT con los lentivirus E2-16 y LacZ.....	41
7.5 Extracción de proteínas totales.....	42
7.6 Inmunodetección en fase sólida (Western Blot).....	42
7.7 Fijación de células .....	43
7.8 Tinción de yoduro de propidio para Ciclo celular .....	44
7.9 Tinción de DAPI para ciclo celular .....	44
7.10 Sincronización de células en la fase G1 .....	45
7.11 Ensayo de transición de la fase G1-S y progresión de la fase S.....	45
8. RESULTADOS .....	46
8.1 Expresión de E2 mediante un sistema lentiviral .....	46
8.2 Evaluación de ciclo celular en células HaCaT en ausencia y presencia de E2 .....	47
8.2.1 Ciclo celular asincrónico .....	47
8.2.2 Ciclo celular sincrónico en G1.....	49
8.2.3 Transición de las fases G1-S y progresión de la fase S en presencia y ausencia de la proteína E2.....	50
8.3 Expresión de la Ciclina A y MCM4 en la transición de las fases G1-S y progresión de la fase S en presencia y ausencia de la proteína E2.....	57
9. DISCUSIÓN .....	60
10. CONCLUSIONES.....	65
11. PERSPECTIVAS.....	66
12. BIBLIOGRAFÍA .....	67

# 1.- INTRODUCCIÓN

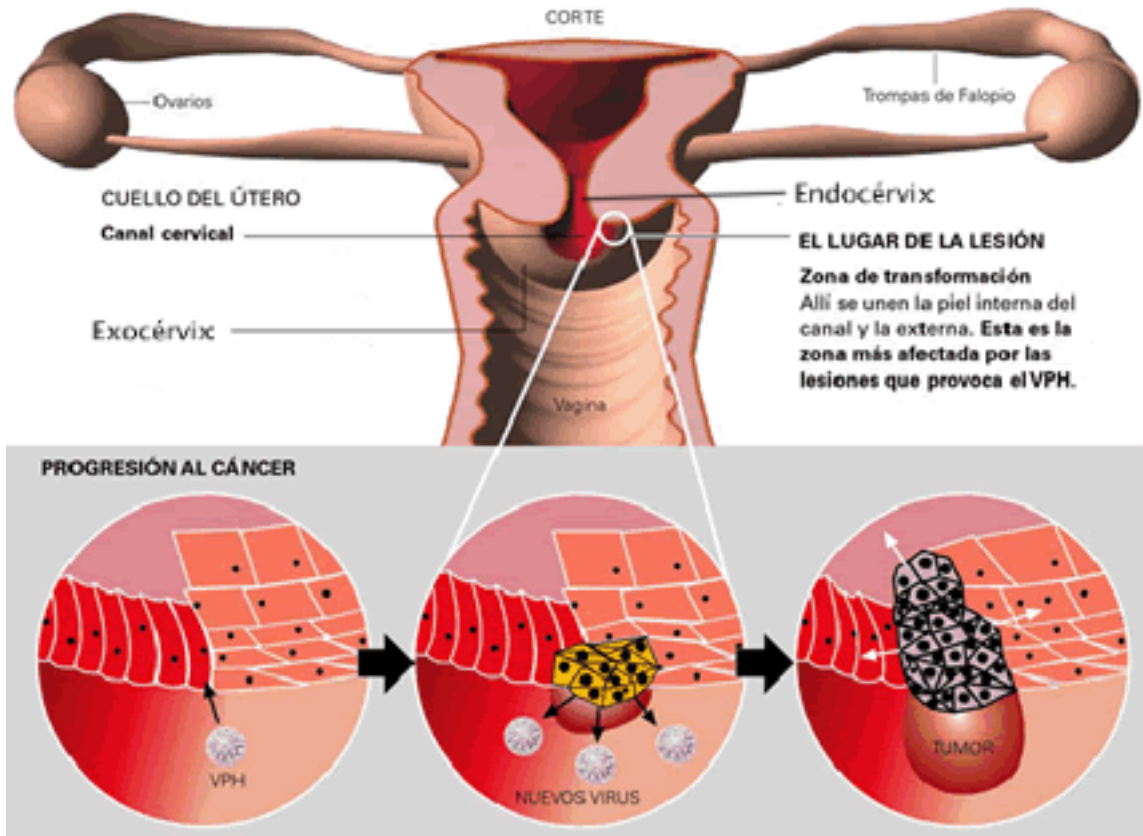
## 1.1 Cáncer cérvico-uterino

El cáncer cérvico-uterino ó cáncer del cuello uterino (CaCU) es un problema de salud en todo el mundo. Es el segundo cáncer mas frecuente en mujeres a nivel mundial (Baseman & Koutsky 2005). Cada año 500,000 casos nuevos son diagnosticados en todo el mundo. En México es la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres y es la segunda causa de morbilidad hospitalaria entre las mujeres, ubicándose la tasa mas alta en el grupo de 65 a 74 años (53 casos de cada 100 mil mujeres de ese grupo de edad), le siguen las mujeres de 50 a 59 años (51 de cada 100 mil mujeres de este grupo de edad) (Sánchez-Barriga 2012) (Hidalgo 2006). Esto lo convierte en unos de los principales problemas de salud en mujeres mexicanas haciendo relevante su investigación.

El cáncer cérvico-uterino se origina en el cuello uterino que es la parte inferior del útero que es también llamado cérvix uterino. El cuerpo del útero (parte superior) es el lugar donde se desarrolla el feto y el cuello uterino conecta el cuerpo del útero con la vagina. La parte del cuello uterino más cercana al cuerpo del útero se llama endocérvix y la parte próxima a la vagina, es el exocérvix o ectocérvix. Los dos tipos principales de células que recubren el cuello del útero son las células escamosas (en el exocérvix) y las células glandulares (en el endocérvix), aunque existe un punto en el que estos dos tipos celulares se encuentran, y es llamado zona de transformación, que es el lugar donde la mayor parte del cáncer cervical se origina (figura 1) (American Cancer Society 2014).

El cáncer de cérvix ocurre en dos formas predominantes: carcinoma escamoso y adenocarcinoma (glandular). El tipo histológico mas comúnmente encontrado en las mujeres es el carcinoma escamoso (80% de los casos) y el adenocarcinoma es el tipo histológico menos común (Reimers et al. 2009). Aunque en varios países desarrollados, la incidencia de carcinoma escamoso de cuello uterino ha ido

descendiendo desde hace un tiempo, el adenocarcinoma de cuello uterino esta en aumento (Woodman et al. 2007).



**Figura 1.** Cuello uterino y cáncer cervical. En esta figura se ubica cada una de las partes del cuello uterino, enfatizando la zona de transición donde se origina la gran mayoría de los cánceres cervicales.(Garza n.d.)

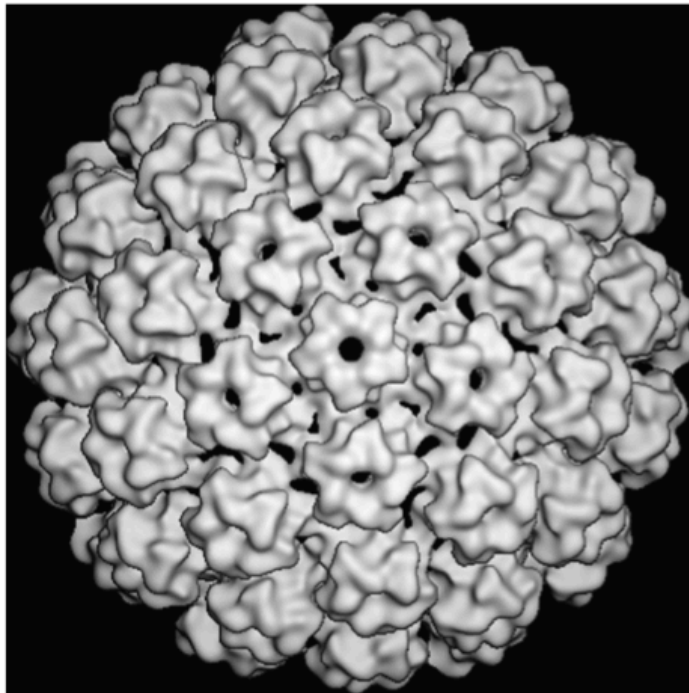
## 1.2 Etiología del CaCU

Existen diversos factores de riesgo que se han asociado con el CaCU, como son: el tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales, la edad y el número de parejas sexuales. Este último factor en particular, está estrechamente relacionado con la infección del virus del papiloma humano (VPH), debido a que este virus se transmite de manera sexual y puede causar verrugas, condilomas y está asociado con lesiones pre-cancerosas que tienen alta probabilidad de desarrollar cáncer invasivo. El VPH está asociado altamente en mujeres con vida sexual activa, debido a que es la principal vía de contagio. Por ello y por su alta prevalencia en los casos de CaCU, actualmente es considerado como el principal agente etiológico del cáncer cérvico-uterino (Baseman & Koutsky 2005). Sin embargo, poco se sabe con respecto a la prevalencia del VPH en mujeres con y sin CaCU en diferentes poblaciones mexicanas (Velázquez-Márquez et al. 2009)

El VPH se presenta en edades tempranas, debido a que las relaciones sexuales en la población de jóvenes y adolescentes son más precoces y riesgosas (Fando & Zelada 2013). Estudios transversales de la historia natural del CaCU han indicado que cerca del 85% de las lesiones cervicales de alto grado presentan DNA de VPH, mientras que más del 97% de los cánceres de cuello uterino contienen el genoma de algún VPH de alto riesgo y expresan los oncogenes virales E6 y E7, proporcionando un enlace directo entre la infección por VPH y la carcinogénesis (Fando & Zelada 2013) (You 2011) (Smith et al. 2007). Por lo general la infección cervical por VPH no es maligna, ya que solo menos del 5% de las mujeres infectadas desarrollan lesiones pre-malignas y la mayoría de las infecciones por VPH son transitorias y no están asociadas a ningún signo o síntoma de infección, debido a que el sistema inmunológico elimina la infección normalmente (Fando & Zelada 2013).

### 1.3 VPH y sus características generales.

El virus del papiloma humano es un virus no envuelto de doble cadena de DNA (Steben & Duarte 2007), que pertenece a la familia Papillomaviridae (Squiquera 2006). Su tamaño es aproximadamente de 52-55 nm de diámetro, con una cápside de simetría icosaédrica compuesta de 72 capsómeros (60 hexaméricos y 12 pentaméricos). Existen dos proteínas de cápside, una principal (codificada por el gen L1) de 55 kDa que representa el 95% de la cápside y una menor (L2) de 74 kDa que representa el 5% de la capsida (figura 2) (Squiquera 2006) (Aldana et al. 2012) (Silva et al. 2013)



**Figura 2.** Estructura del VPH16. Constituido por una cápside icosaédrica, formada por dos proteínas: L1 (95%) y L2 (5%).(Buck et al. 2013)

## 1.4 Clasificación del VPH

Hasta la fecha se han identificado un poco más de 140 tipos de VPH, entre ellos existen más de 40 tipos que infectan al humano en el tracto ano-genital, los cuales dependiendo de su potencial para producir una transformación maligna (CaCU) se han clasificado como de alto (HR) o bajo riesgo (LR) (Baseman & Koutsky 2005) (You 2011).

Los VPH de bajo riesgo se encuentran comúnmente en condilomas acuminados y lesiones pre-neoplásicas intraepitelial cervical de bajo grado de severidad (NIC I) con mínimo riesgo de progresión maligna o bien se asocian con infecciones asintomáticas, siendo los VPH tipos 6 y 11 los asociados como causantes del 90% de estas lesiones. Los VPH de alto riesgo producen lesiones neoplásicas intraepiteliales cervicales de alto grado (NICII, III) que pueden conducir a un carcinoma invasor, que aunque la conversión cancerígena se produce sólo en una minoría de las infecciones, los VPH de alto riesgo de mucosa se asocian con casi todos los cánceres de cuello uterino, y con un 50% anogenital y el 30% de cáncer de cabeza y cuello (Fando & Zelada 2013) (Muller et al. 2012) (Steben & Duarte 2007).

Se ha establecido la clasificación epidemiológica de los diferentes tipos de VPH que colonizan el tracto genital humano, mostrando a los que generalmente se encuentran tanto en personas asintomáticas como en pacientes con cáncer. Encontrándose de forma estadística la presencia de ciertos tipos virales con mas frecuencia en pacientes con CaCU. En base a esto, los tipos 16 y 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 han sido considerados como oncogénicos o tipos de “alto-riesgo” (Tabla 1) (Muñoz et al. 2003). De todos estos, el papilomavirus tipo 16 es el mas prevalente de los VPH oncogénicos, responsable de mas de la mitad de los tumores a nivel mundial, mientras que el papilomavirus tipo 18 esta involucrado en el 20% de los mismos. De ahí la importancia de estudiar a profundidad estos dos tipos de papilomavirus (Doorbar 2006) (Reimers et al. 2009).

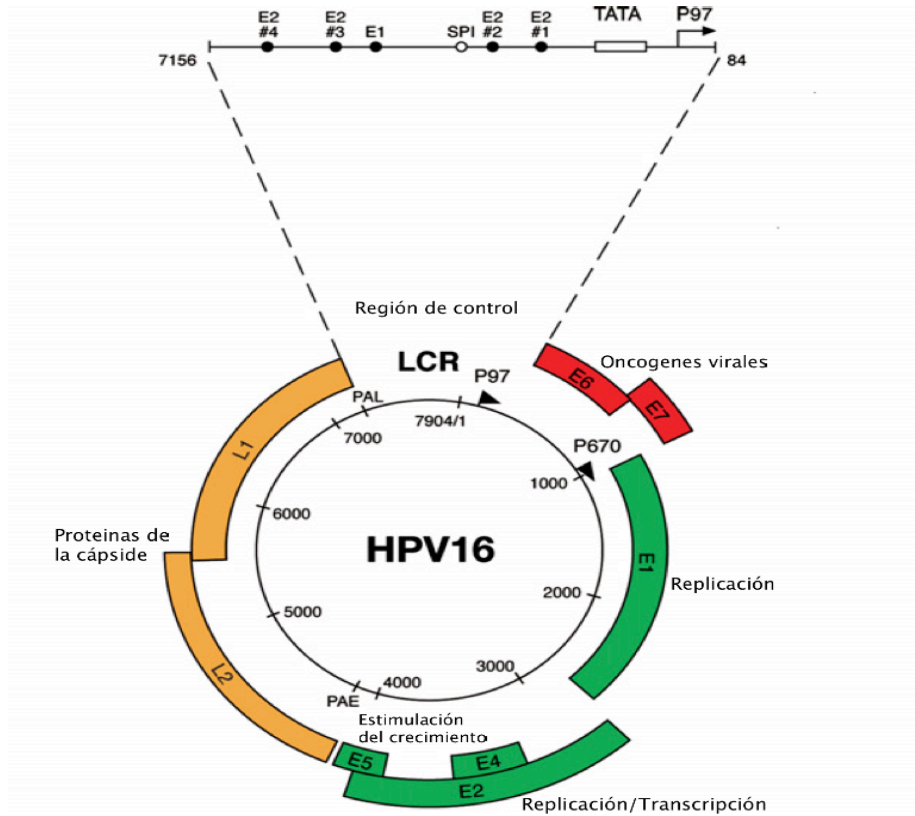
**Tabla 1.** Clasificación del VPH según su riesgo para generar el desarrollo de cáncer (Muñoz et al. 2003).

Clasificación por riesgo	Tipos de VPH
Alto riesgo	16, 18, 31, 33, 35 39, 45, 51, 52, 56 58, 59, 68, 73, 82
Bajo riesgo	6, 11, 40, 42, 43, 44 54, 61, 70, 72, 81, CP6108

### 1.5 Genoma del VPH y expresión de génica

El genoma del VPH esta formado por DNA circular de cadena doble que se asocia con histonas formando una estructura de tipo cromatina, y está constituido por aproximadamente 7200-8000pb, conteniendo en promedio ocho marcos de lectura abierta, del inglés *open reading frame* (ORF) que son expresados a través de ARNm policistrónicos, transcritos a partir de una sola hebra del ADN. De forma general el genoma del virus esta dividido en tres regiones: una región temprana E (Early), la cual codifica para las proteínas virales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), necesarias para la replicación del DNA viral, la regulación de la trascricpción y la transformación e inmortalización celular, una región Tardía L (Late), que codifica para proteínas estructurales (L1 y L2) y una región reguladora conocida como región larga de control LCR (Long Control Region), que contiene las secuencias de ADN que permiten el control de la replicación y de la expresión del genoma viral. La región LCR contiene un promotor llamado p97 (en VPH 16) ó p105 (en VPH 18) que permite regular la transcripción de los ORF's. Esta región contiene la

mayor variación génica entre un tipo viral y otro (figura 3) (tabla 2) (McMurray et al. 2001) (Silva et al. 2013).



**Figura 3.** Genoma del VPH. Se muestra la localización y función de los genes tempranos (E) y genes tardíos (L) (Doorbar 2006).



**Tabla 2. FUNCIONES DE LAS PROTEINAS DE HPV (Squiquera 2006)**

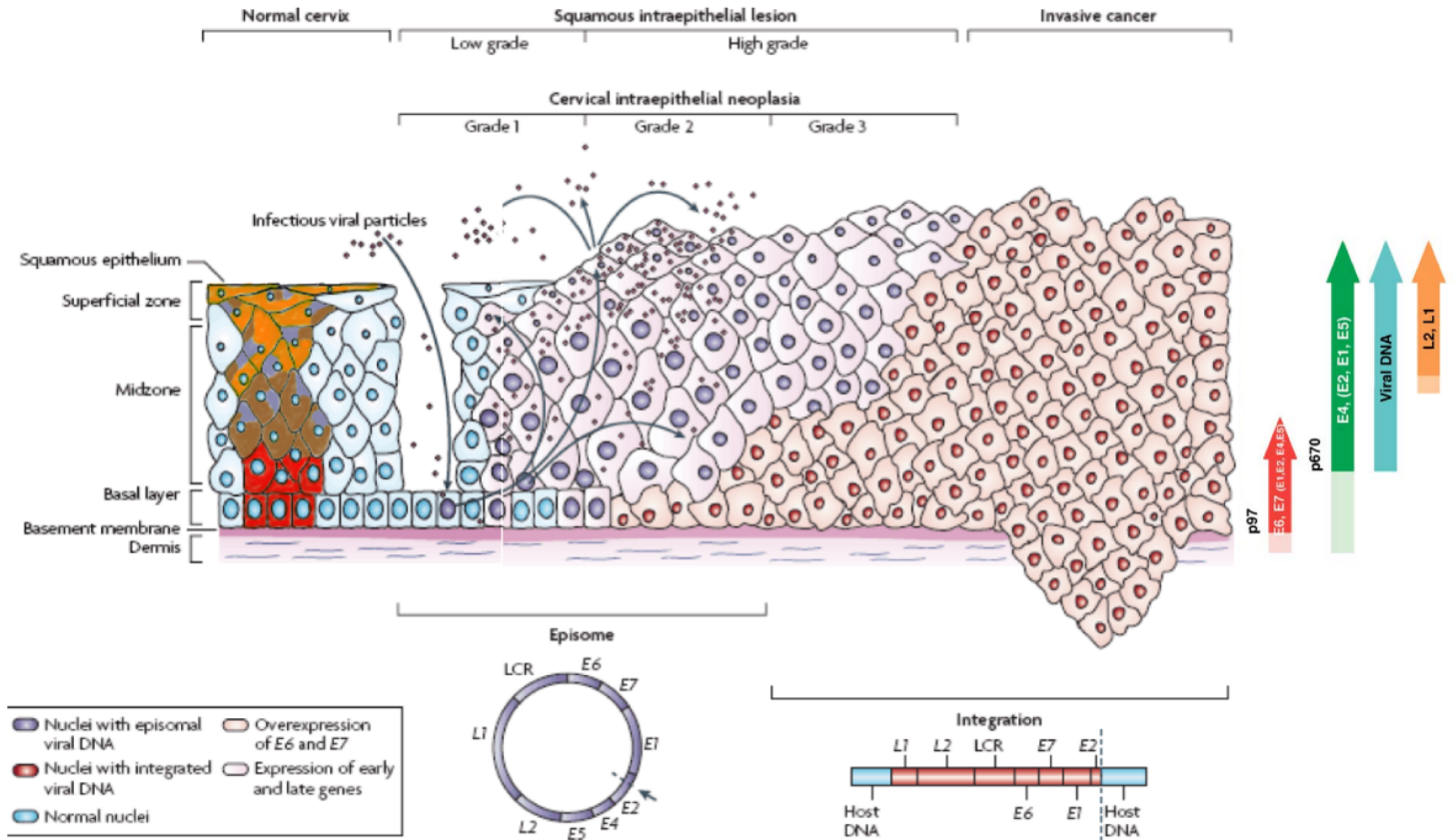
Proteína	Función
. E1	Proteína de 68–76 kD esencial para la replicación plasmídica del DNA con actividad ATPasa y helicasa que se une al origen de replicación (ori) en el LCR unida a la proteína E2 completa incrementando la afinidad de E1 por el ori e incrementando la replicación viral.
. E2	proteína de 40-58 kD, la cual regula la transcripción y replicación del DNA viral; además regula la transcripción de algunos genes celulares. En VPH-16 y VPH-18 la proteína E2 suprime los promotores a partir de los cuales se transcriben las proteínas transformantes E6 y E7. Cuando el VPH16 se integra en los cromosomas de las células huésped, la integridad de los orf's E1 y E2 son alterados, por lo que la represión normal de E6 y E7 se pierde, con la consecuente sobre-expresión de estas proteínas transformantes.
. E4	El orf de E4 está completamente contenido dentro del orf E2. Generalmente no tiene codón de iniciación, se expresa a partir de transcritos cortos y se sintetiza como una proteína mixta E1-E4. Los productos del gen E4 se encuentran primariamente en el citoplasma de queratinocitos superficiales, donde son extremadamente abundantes. El gen E4 se expresa desde el promotor tardío. Forma complejos hexaméricos, capaces de unirse a la red de citoqueratina de la célula, a través de su región N-terminal produciendo su desestabilización. También produce alteración en el potencial de membrana mitocondrial.
. E5	Es la proteína transformadora más pequeña que se ha identificado. Localizándose principalmente en la membrana plasmática celular, interactuando con las rutas de activación de algunos factores como el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor p 185-neu y el factor estimulante de colonias; de este modo podría estimular la acción de estos diferentes factores vinculados a la proliferación celular.
. E6	Es una proteína con 150 aminoácidos de 16–19 kD. contiene cuatro motivos Cys–X–X–Cys, indicando una potencial unión de zinc; también puede actuar como proteína de unión a ácidos nucleicos. Forma un complejo con p53 y la enzima ubiquitina ligasa, produciendo su degradación y previniendo la inducción a apoptosis.
. E7	Proteína con 100 aminoácidos de 10–14 kD la cual experimenta fosforilación, permitiéndole unirse a través de su extremo N-terminal (aminoácidos 20 a 30), a la proteína del retinoblastoma (pRB), alterando su función. ligadora de zinc, y que además se une a pRB, p107 y p130.
. L1	Proteína mayor de cápside de 55 kD. Está relativamente bien conservada entre todos los papilomavirus
. L2	Codifica la proteína menor de cápside de 72 kD.

## 1.6 Ciclo de vida del VPH

El ciclo de vida del VPH está estrechamente vinculado a la diferenciación de las células epiteliales del huésped (figura 5) (Pyeon et al. 2009). Los VPH no poseen enzimas para replicar su ADN, por lo que para replicar sus genomas de doble cadena utilizan la maquinaria de la célula huésped (Fando & Zelada 2013). Los virus entran en el epitelio a través de microlesiones o micro-abrasiones e infectan las células epiteliales basales (McMurray et al. 2001). En las células basales del epitelio estratificado se mantiene la replicación del ADN viral en un número de copias bajo ( $50 \pm 100$  copias por célula infectada), en forma circular extracromosómica, llamados episomas (Replicación plasmídica) que se estructuran en base a histonas y material genético. Se postula que durante esta etapa se aseguraría que el ADN viral se distribuya difusamente por las células basales proliferantes y que al mantener un número reducido de copias se impediría la activación de la respuesta inmune. Las células basales proliferantes migran a los estratos parabasal y espinoso, amplificándose la expresión de genes virales tempranos a través de la LCR, los cuales permiten producir ADN a cientos de copias por célula y ocurre la encapsidación de las mismas; ésta etapa en el ciclo viral es conocida como la fase o replicación vegetativa, proliferante o productiva. Los virus luego son desprendidos de las células epiteliales cuando éstas se descaman siendo capaces de volver a infectar el epitelio y se transmiten por contacto (Larraín 2006) (Squiquera 2006) (Pyeon et al. 2009).

La replicación vegetativa del VPH tiene lugar en los queratinocitos diferenciados, que normalmente no se dividen y no replican su ADN (Fando & Zelada 2013), el hecho de que una célula hija comience a diferenciarse es un problema para el virus, ya que necesita la maquinaria replicativa de la célula para la síntesis de ADN viral y una célula terminalmente diferenciada contendrá poco o nada de enzimas replicativas. Por lo tanto el virus necesita estimular la progresión de la fase G1 a la fase S en la célula programada para diferenciarse terminalmente, y así producir el ambiente correcto para la replicación del ADN. Esta función es lograda gracias a la proteína viral E7. La cual no sólo es importante para la

regulación del ciclo celular, sino también es una de las oncoproteínas virales que participa en la transformación de la célula huésped (McMurray et al. 2001) (Fando & Zelada 2013).

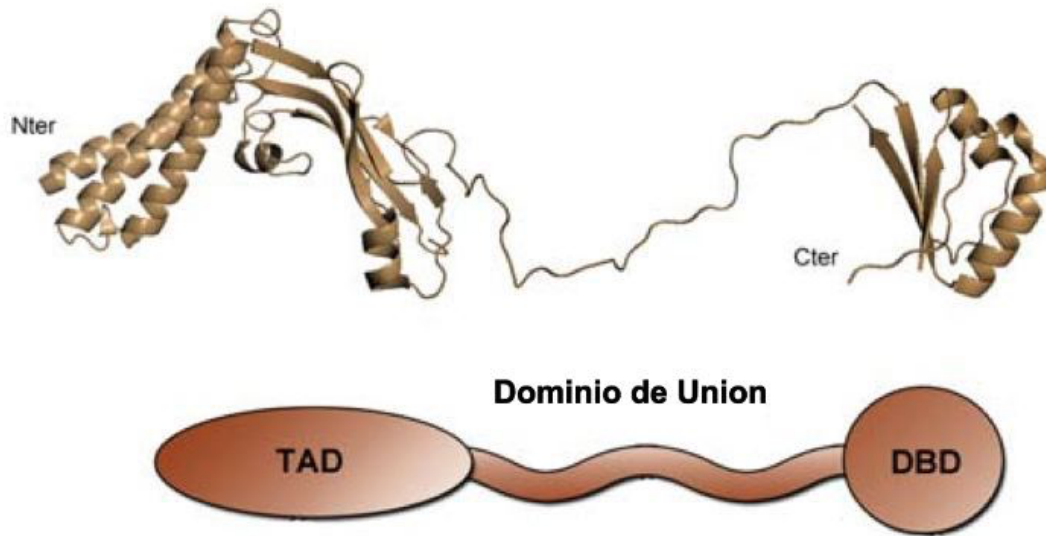


**Figura 5. Participación de VPH en CaCU.** El VPH accede a las células basales a través de las micro-abrasiones en el epitelio cervical; seguida de la infección se expresan los genes de expresión temprana (E1, E2, E4, E5, E6 Y E7), y el DNA viral se replica de forma episomal (nucleos purpuras); en las capas mas superficiales el genoma viral es replicado mas fuertemente y los genes tardíos (L1 y L2) son expresados, aunque E4 se expresa también en esta parte. L1 y L2 encapsidan el genoma viral para formar la progenie de viriones. Lesiones intraepiteliales de bajo grado soportan la replicación viral productiva. Un número indeterminado de las infecciones por VPH de alto riesgo progresan a alto grado de neoplasia intraepitelial cervical (NICII,III). La progresión de las lesiones sin tratar hacia cáncer invasivo y microinvasivos se asocia con la integración del genoma del VPH en los cromosomas del huésped (núcleos rojos), con la pérdida asociada o la interrupción de E2, y la subsiguiente regulación por incremento de la expresión de los oncogenes E6 y E7 (Woodman et al. 2007).

Un evento central para la transformación de las células infectadas es la integración del genoma viral al de la célula huésped, proceso que ocurre en el estrato espinoso, y en el que destaca por su importancia, el ADN de los VPH de alto riesgo oncogénico. Esto produce una desregulación en la relación virus-huésped. Durante la integración del genoma viral se altera el marco de lectura abierta E2, perdiéndose el efecto inhibitorio sobre el promotor P97, que mantenía bloqueada la expresión de las proteínas E6 y E7, las que son ahora sintetizadas sin restricción vía factores de transcripción. Este proceso de larga duración culmina con la aparición de células totalmente transformadas dependientes de manera crítica de las propiedades de inmortalización de las proteínas HR-VPH E6 y E7 para impulsar la proliferación celular continua. Por lo que es importante que la expresión de la proteína E2 no se pierda para evitar la progresión a CaCU, radicando ahí parte de la importancia de su estudio (Larraín 2006) (Muller et al. 2012).

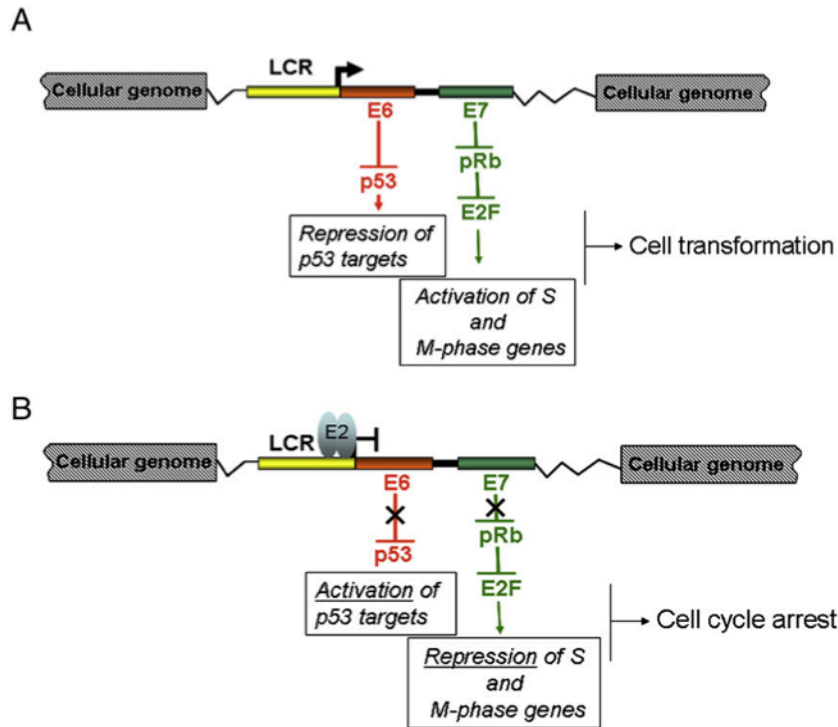
### **1.7 Proteína E2**

La proteína E2 de los VPH's es una proteína nuclear dimérica de 42 kDa y contiene entre 350 y 500 aminoácidos, dependiendo del tipo viral, que contiene tres dominios funcionales que están relativamente conservadas entre todos los papilomavirus, que consta de un dominio de trans-activación amino-terminal (TAD), una región bisagra rica en prolina y un dominio de unión a ADN de dimerización carboxi-terminal (DBD) (Sunthamala et al. 2014). Sus tipos de dominios le brindan la facultad de modulación de diversas proteínas tanto virales como celulares, por medio de dos mecanismos principales: su interacción con promotores a través de su dominio DBD y la interacción directa con proteínas a través de su dominio TAD principalmente (figura 6) (Bellanger et al. 2011).



**Figura 6.** Estructura de E2. Se muestran los dominios presentes en la proteína E2 (Muller & Demeret 2012).

Por medio del dominio DBD la proteína E2 tiene la capacidad de unirse en forma de dímero a secuencias específicas de ADN palindrómicas ACCGN<sub>4</sub>CGGT designados sitios de unión a E2 (E2BS). Por lo menos cuatro de estos E2BS se encuentran dentro de la región reguladora LCR de todos los genomas de VPH, y son muy importantes para la regulación de la expresión de las proteínas virales (Muller & Demeret 2012), ya que la proteína E2 al unirse a los sitios próximos a la caja TATA en el promotor P97 (VPH 16), reprime su actividad transcripcional. De tal forma que cuando los niveles de E2 son bajos, se une a los sitios de unión distales a la caja TATA en ese promotor de una manera cooperativa, resultando en la activación transcripcional, mientras que cuando los niveles son altos su unión a los sitios cercanos a la caja TATA provoca la represión de la transcripción de los oncogenes E6 y E7 (figura 7) (Larraín 2006).



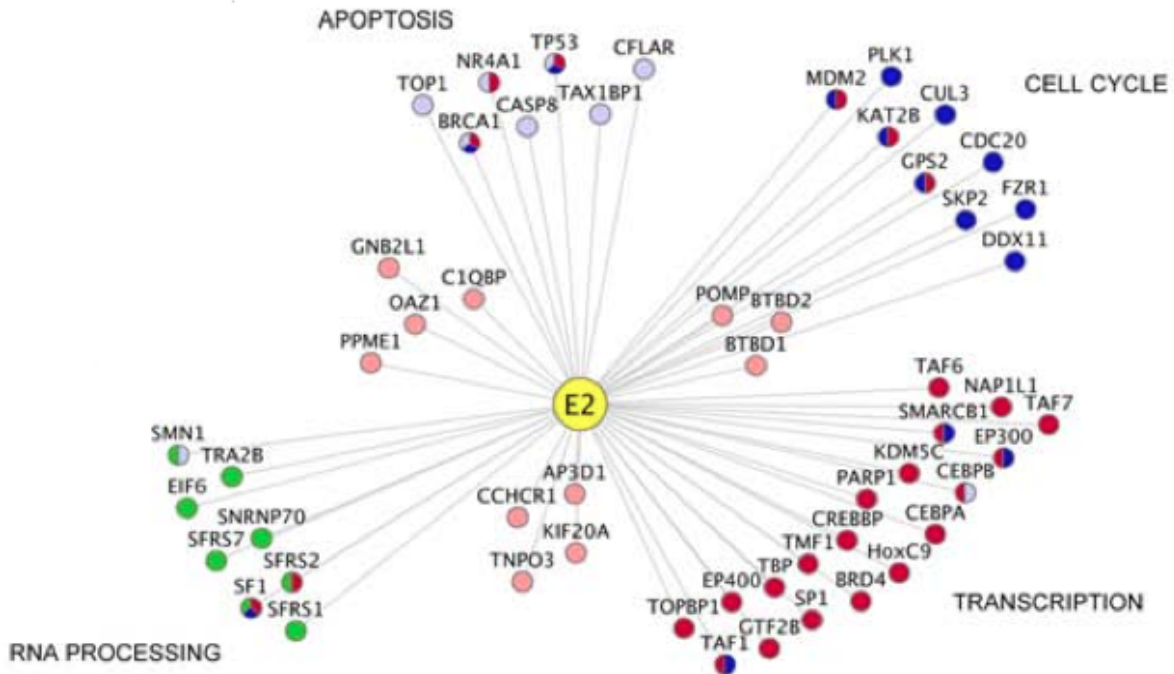
**Figura 7.** Inhibición de la transcripción de las oncoproteínas E6 y E7 generada por E2. A) sin presencia de la proteína E2. B) con presencia de la proteína E2 (Thierry 2009).

Además de que la proteína E2 proporciona el control de la transcripción del ADN viral, también controla la replicación y la segregación mitótica a través de su unión al genoma viral específico (Muller et al. 2012). En la replicación E2 dimérico por medio de su dominio TAD forma un complejo proteico con E1 antes mencionado; para lo cual E2 es fosforilado por cinasas en los residuos aminoácidos de serina 298 y 301, regulando su unión con E1 y fortaleciendo el inicio de la replicación viral al aumentar la afinidad de E1 por el ori (Larraín 2006). En la segregación mitótica E2 forma un complejo con Brd4 por medio de su dominio TAD el cual ha demostrado estar implicado en anclaje de episomas virales a los cromosomas durante la mitosis celular (Bellanger et al. 2011).

Como ya se explicó anteriormente, la proteína E2 puede interactuar con una gran variedad de proteínas celulares, tanto por su dominio TAD como el DBD (figura 8). Un ejemplo de esto es que la proteína que E2 se ha visto implicada en el control de la maquinaria transcripcional celular, interactuando con diversos

factores de transcripción importantes, entre ellos el TAF1 (Centeno-Cruz Federico 2008), el cual es conocido también como TAFII250 y es el mayor de los factores asociados a TBP (TAFs) que junto con otras proteínas forman al factor de transcripción general TFIID. La unión de TFIID a un promotor en un sitio de inicio de la transcripción, da lugar al reclutamiento del complejo de preinicio de la transcripción (PIC), necesario para que la transcripción se lleve a cabo. El papel principal de TAF1 es el reclutamiento de TBP para reconocer la secuencia TATA, sin embargo, en promotores que no contienen caja TATA TAF1 es capaz de reconocer directamente la secuencia INR para que la transcripción se lleve a cabo, lo que hace a este tipo de promotores dependientes de TAF1 (Carrillo et al. 2004). TAF1 además de formar parte de TFIID, tiene una función acetiltransferasa la cual es muy importante para que se pueda dar la expresión de una gran variedad de genes, entre ellos se encuentran las ciclinas, como la A y la D; las cuales son importantes para la progresión del ciclo celular. Además de esto se conoce que la falta de TAF1 provoca un arresto en la fase G1, lo cual puede revertirse con la adición de factores que promueven la transición G1/S, como la ciclina D. Esto indica que muy posiblemente el efecto generado se deba a la represión específica de los genes de transición en esas fases del ciclo celular y no al abatimiento general de la transcripción de la célula. En apoyo a esto, se comprobó que la región amino terminal de TAF1 (AT) es indispensable para la salida de G0 (Centeno-Cruz Federico 2008, tesis de Doctorado).

Aparte de la interacción con TAF1, también se ha demostrado que E2 activa directamente la síntesis de la proteína p53 lo que produciría finalmente la detención del ciclo celular en G1 y apoptosis. Todas estas proteínas reguladas por E2 a su vez son capaces de regular la progresión del ciclo celular, haciendo que de manera indirecta E2 este regulando el ciclo celular (You 2011).



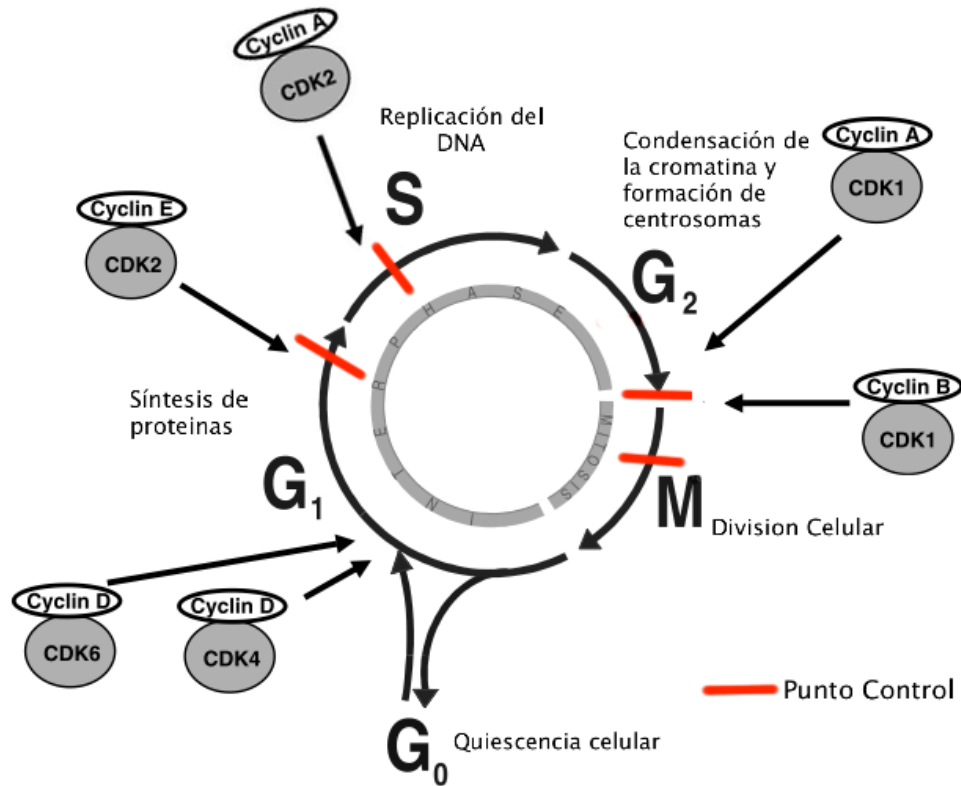
**Figura 8.** Interactoma de la proteína E2 de VPH16. Se muestran los principales procesos celulares en los que se ha visto implicada a la proteína E2 (Muller & Demeret 2012).

Muy pocos estudios han demostrado que las funciones de E2 pueden diferir entre los VPH oncogénicos de alto riesgo (HR) y los de bajo riesgo (LR-VPH), que siempre están asociados con la hiperplasia benigna. Algunas actividades son específicas de las proteínas E2 de los HR-VPH, tales como la inducción de la apoptosis ó de una detención del ciclo celular en G2/M. Estos últimos efectos se han observado en células que expresan todas las proteínas de VPH16, por lo que la relación de la expresión de la proteína E2 y cambios en la progresión celular en ausencia de otros genes virales no ha sido claramente establecida. (Muller et al. 2012).



## 1.8 Ciclo celular

La proliferación celular se asocia al evento denominado ciclo de división celular o ciclo celular (CC), proceso por el cual una célula crece, replica su ADN y se divide para dar origen a dos células hijas. Este proceso se divide en cuatro fases secuenciales denominadas G1, S, G2 y M. En la fase G1 (“Gap” en inglés) la célula sintetiza proteínas necesarias para la síntesis de ADN, S es la fase de síntesis o replicación del ADN, G2 es la fase de condensación de la cromatina y estructuración de la cromatina para la preparación para la mitosis y M es la fase de división celular o mitosis. Existe una quinta fase conocida como G0, de reposo ó de quiescencia en la cual la célula se mantiene reversiblemente por fuera del CC. En estas fases existen puntos de control en los cuales la célula monitorea el ambiente celular y determina si hay condiciones apropiadas para progresar a través del ciclo celular. Los puntos de control son clave para el funcionamiento correcto del CC y los fallos en su funcionamiento pueden dar lugar a que las células se dividan sin control (Figura 9) (Aldana et al. 2012) (Vermeulen et al. 2003).



**Figura 9.** Ciclo celular. Fases del ciclo celular las cuales son reguladas por complejos formados por ciclinas y cinasas (CDKs) que intervienen en la progresión de cada fase: la ciclina D forma complejos con CDK6 y CDK4 los cuales actúan en la transición G<sub>1</sub>-S; la ciclina E forma complejo con CDK2 actuando en la transición G<sub>1</sub>-S; la ciclina A forma complejos con CDK2 y CDK1, actuando sobre la progresión de la fase S (ciclina A-CDK2), como también en la transición G<sub>2</sub>-M (ciclina A-CDK1); y la ciclina B forma complejo con CDK1 actuando en la progresión de la fase M (Vermeulen et al. 2003).

El control del ciclo celular es llevado a cabo por componentes fundamentales que lo regulan positivamente o negativamente, como las CDKs ó cinasas dependientes de ciclina (cdk2, cdk4, cdk6, cdc2/cdk1), las ciclinas (ciclinas A, B, D y E), inhibidores de CDKs (CDKI), junto con proteínas supresoras de tumores como p53 y la familia pRB. Dentro de los reguladores positivos del CC se encuentran las CDKs y su respectiva ciclina. Cada una de las ciclinas forma complejos con su respectiva CDKs, dándoles la actividad cinasa en puntos específicos del ciclo celular, normalmente para pasar de una fase a otra (Aldana et al. 2012). Hasta la fecha nueve CDK se han identificado y de éstas, cinco son activas durante el ciclo

celular, es decir, durante las fases G1 (CDK4, CDK6 y CDK2), S (CDK2), G2 y M (CDK1). Los niveles de proteína CDK se mantienen estables durante el ciclo celular, en contraste con sus proteínas activadoras, las ciclinas. Los niveles de ciclina suben y bajan durante el ciclo celular y de esta manera activan periódicamente a las CDK (Vermeulen et al. 2003).

Dentro de los reguladores negativos del ciclo celular se encuentran RB y p53. pRb es un regulador negativo del ciclo celular cuya forma hipofosforilada bloquea a los factores de transcripción E2F1, E2F2 y E2F3a, esenciales para la expresión de genes que le dan continuidad al ciclo celular en el punto de transición G0/G1 y G1/s, mientras que la fosforilación parcial de Rb (pRb) por los complejos CDK-ciclina deja en libertad a estos factores de transcripción y por consiguiente la continuidad de la progresión del CC (Doorbar 2005) (Aldana et al. 2012). La proteína p53 actúa evitando que la célula pase a la fase S ante daño del ADN, deteniendo el ciclo celular en fase G1, efecto mediado por la proteína p21<sup>(Cip1/WAF1)</sup>, que inhibe a las cinasas dependientes de ciclinas y que puede activar el mecanismo de apoptosis. Si el daño es producido luego de la replicación del ADN (fase S), la célula se detiene en la fase G2. Cuando el daño del ADN es irreparable, p53 lleva a la muerte celular por apoptosis. Estas proteínas supresoras de tumores permiten un control preciso del ciclo celular y bloquean eventos carcinogénicos (Aldana et al. 2012) (Larraín 2006).

Como ya se explicó anteriormente las fluctuaciones en los niveles de ciclina durante el ciclo celular son muy importantes para la progresión de este. Una de estas ciclinas es la ciclina A, la cual es muy importante para la progresión en la fase S. Esta proteína es sintetizada y localizada dentro del núcleo a comienzos de la fase S. Existen dos tipos de ciclinas A: la ciclina A1 y la ciclina A2. La ciclina A1 tiene una participación principal durante el desarrollo embrionario, mientras que la A2 se expresa en células somáticas normalmente (Yam et al. 2002). En cultivos de células, ciclina A se sintetiza y se destruye después de la ciclina E, pero un poco antes de la ciclina B durante la fase G2. La ciclina A es especialmente interesante entre las ciclinas porque se asocia tanto con CDC2 (también llamado CDK1) y

CDK2, y tienen funciones tanto en la fase S (CDK2) como en la mitosis (CDK1) (Yam et al. 2002). Las concentraciones de ciclina A alcanzan su nivel máximo en G2/M, siendo aproximadamente 30 veces menor que el de CDC2 y cerca de 8 veces menor que el de CDK2. La activación de CDC2 y CDK2 requiere de su unión a una subunidad de la ciclina y la fosforilación en un residuo de treonina en una estructura de bucle (bucle T) situado cerca de la boca del sitio activo (Thr161 y Thr160 en CDC2 y CDK2, respectivamente) por la cinasa activadora de CDK's (CAK) (Yam et al. 2002).

La ciclina A está implicada en el control de la replicación del ADN debido a que su expresión ectópica en células de mamífero acelera la entrada de las células a la fase S (Yam et al. 2002). En la fase S, se cree que la fosforilación de los componentes de la maquinaria de replicación de ADN, tales como CDC6 y MCM4 por el complejo ciclina A-CDK debe ser importante para el inicio de la replicación del ADN y para restringir que esto suceda sólo una vez por ciclo celular. En la mitosis, el papel preciso de la ciclina A es todavía incierto, pero puede contribuir al control de la estabilidad de la ciclina B (Yam et al. 2002).

Varias proteínas, incluyendo el complejo de reconocimiento del origen (ORC), CDC6, y el complejo de proteínas MCM, necesitan ser montados sobre la cromatina antes de la iniciación de la replicación del ADN. El complejo ciclina A-CDK se une a CDC6 a través de la región N-terminal por su motivo ZRXL y la fosforila; esta fosforilación relocaliza a CDC6 del núcleo al citoplasma en donde es destruido. Una posibilidad es que la fosforilación por la ciclina A-CDK2 resulte en la destrucción de CDC6 libre que de esta forma no permita el ensamblaje de los complejos de replicación, y evita la re-replicación de ADN después de G1. El complejo Ciclina A-CDK2 también puede fosforilar MCM4 en el complejo helicasa-MCM4 MCM6-MCM7 ADN, lo que resulta en la inactivación de su actividad ADN helicasa, pudiendo también ayudar a prevenir la re-replicación del DNA (Yam et al. 2002).

La regulación de la transcripción de ciclina A se debe a la proteína E2F. La proteína E2F se inhibe mediante su unión a proteínas de la familia pRb hipofosforiladas durante la fase G1, pero su fosforilación por complejos de ciclina D/E-CDK libera a E2F, que es entonces capaz de activar la transcripción de genes implicados en la progresión de la fase S (incluyendo la de ciclina A). El promotor de la ciclina A se reprime durante la transición G0/G1 y se activa en la entrada de la fase S. Por lo anterior se sabe que las ciclinas sintetizadas en G1 pueden estimular la transcripción de la ciclina A en la fase S. Además de E2F, también se conocen otros factores de transcripción que pueden regular la transcripción de ciclina A. TAFII250 o TAF1, puede estimular la transcripción de ciclina A a través del elemento potenciador TSRE, y MDM2 puede unirse a TAFII250 y potenciar la transcripción de ciclina A (Yam et al. 2002).

## 2. ANTECEDENTES

Los virus normalmente aprovechan la maquinaria del ciclo celular para su propio beneficio, ya que requieren un ambiente óptimo para su replicación, y esto involucra la manipulación del ciclo celular de la célula huésped (Mo et al. 2012).

Existen evidencias de que diferentes virus pueden reducir los niveles de ciclina A, bloqueando la síntesis de DNA celular aumentando la duración de la fase S; y la sobre-expresión de ciclina A puede inhibir la replicación viral. Así también algunos virus son capaces de producir arresto en la transición G1/S del ciclo celular. Algunos de los mecanismos por los que ocurre esto es a través de la inhibición de Rb y la activación de factores de transcripción de la familia E2F, modulación del complejo promotor de anafase (APC), supresión del complejo de mantenimiento mini-cromosoma (MCM), y la alteración de la actividad ciclina/CDK. Todo esto para poder usar los recursos celulares para la replicación del DNA viral (Caffarelli et al. 2013). También se ha observado que algunos virus tienen la capacidad de aumentar la duración de la fase S del CC a través de la manipulación de la maquinaria de la respuesta al daño del DNA (Luo et al. 2013).

Sin embargo, el arresto en G1/S y el aumento en la duración de la fase S no son las únicas modificaciones provocadas por los virus, también se han reportado de manera frecuente el arresto en G2/M; este arresto se ha visto relacionado con el incremento de número de copias del genoma viral (Davy & Doorbar 2007). El arresto en G2/M se ha llamado también estado pseudo fase S, que al igual que el aumento en la duración de la fase S del ciclo celular, ayudan a los virus brindándoles el tiempo necesario para poder usar los sustratos y la maquinaria de replicación celular, y así aumentar el número de copias del genoma viral significativamente en ambos puntos del ciclo celular (Davy & Doorbar 2007) (Reinson et al. 2015).

Existe evidencia que indica que el VPH también es capaz de regular la progresión del CC. Lo más conocido al respecto es que las oncoproteínas virales E6 y E7 del

VPH son capaces de modificar la progresión del ciclo celular, ya que promueven la proliferación celular e inhiben la apoptosis al interactuar con p53 y Rb (Larraín 2006). En nuestro grupo de trabajo se han obtenido evidencias que indican que la proteína E2 de VPH16 también podría ser un factor de regulación en la progresión del ciclo celular (García-Venzor 2013). Se ha demostrado que en líneas celulares VPH positivas, E2 detiene la progresión del ciclo celular debido a su capacidad de reprimir la transcripción del promotor que dirige la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, induciendo así una inhibición del crecimiento (arresto en la fase G1) y apoptosis (Larraín 2006).

Diferentes grupos de investigación han reportado que E2 de los VPH de alto riesgo también afecta el ciclo celular en células que no poseen el genoma de VPH, por mecanismos dependientes e independientes de p53 (Parish et al. 2006), sin embargo estos efectos parecen depender también de otros factores, ya que algunos grupos de trabajo también han demostrado claramente que la sola expresión de la proteína E2 de VPH16 no modifica de manera sustancial el ciclo celular (Centeno-Cruz Federico 2008) (Johansson et al. 2009).

Otros estudios de nuestro grupo de trabajo han demostrado que la expresión de E2 de VPH16 mediante un sistema de adenovirus recombinante, en células VPH negativas (C-33A), modifica de manera importante el patrón global de expresión de genes celulares, regulando positivamente 581 genes, pero de manera interesante, regulando a la baja 1048 (Ramírez-Salazar et al. 2011).

El análisis detallado de estos datos permitió identificar que un grupo de genes cuya expresión se vio afectada por la presencia de E2 corresponde a genes cuya expresión es dependiente de TAF-1 (Ramírez-Salazar et al. 2011), y la interacción existente entre E2 con TAF1 ya ha sido reportada en nuestro grupo de trabajo (Centeno-Cruz Federico 2008), por tanto algunos de estos genes pueden haber sido afectados transcripcionalmente mediante la interacción entre E2 y TAF-1 (Ramírez-Salazar et al. 2011). Se seleccionaron aquellos genes que fueran dependientes de TAF1 y cuya expresión se modificara en presencia de E2,

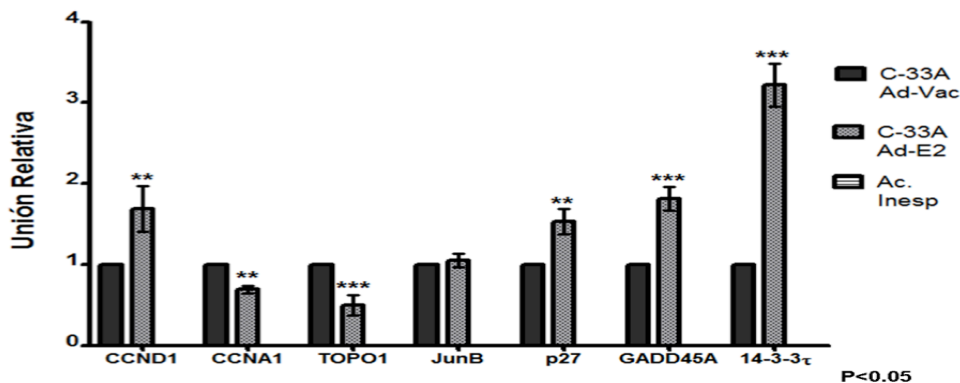
eligiéndose a 52 genes y añadiendo a esta lista tres genes (CCND1, HLA-A y Src) que en diversos reportes se ha mostrado son dependientes de TAF1. Utilizando los criterios de la coincidencia de un fuerte impacto en la actividad transcripcional generada por la ausencia ó mutación de TAF1 y los cambios generados por la presencia de E2, así como la ausencia de caja TATA en esos genes (TATA less) se refinó la selección. Se analizó la estructura del núcleo del promotor y se seleccionaron 14 genes cuyos promotores carecen de caja TATA y presentan uno o más elementos iniciadores. Este grupo de genes incluye los genes CCND1, HLA-A y Src (Tabla 3). De los 14 genes seleccionados, 10 actúan en la regulación de la proliferación y crecimiento celular, mientras que el resto actúa en diversos procesos celulares como traducción, citocinesis, motilidad y apoptosis (Garcia-Venzor 2013). Dentro de los genes de ciclo celular que fueron seleccionados se encuentra el de la ciclina D1 (CCND1) que es necesaria para la entrada de las células en el ciclo celular (transición G0/G1), la ciclina A1 (CCNA1) que actúa durante la fase S del ciclo y la topoisomerasa 1 (TOPO1) que participa en la replicación del DNA (Garcia-Venzor 2013).



Proteína	GEN	O'Brien y Tjian (2000)	Ramírez-Salazar et al. (2011)	TATA Box	Inr
Factor de inicio de la traducción 5A2	EIF5A2	-4	-5	TATAless	Inr
Proteína homóloga a Ras (RhoA)	RhoA	-10	-5	TATAless	Inr less
Canal de aniones dependiente de voltaje 3	VDAC3	-3	-4	TATAless	Inr
Ciclina A1	CCNA1	-2	2.9	TATAless	Inr
Harvey Rat Sarcoma Oncogén	H-Ras	-2	-0.2	TATAless	Inr
14-3-3 Tau	14-3-3 Tau	+2	0	TATAless	Inr
Inhibidor 1B de cinasas dependientes de ciclina	P27	-	+1.39	TATAless	Inr
Topoisomerasa 1	TOP	-2	-0.8	TATAless	Inr
Proteína de arresto en el crecimiento y de respuesta al daño al DNA	GADD45A	10	-2.25	TATAless	Inr less
JunB Protoncogen	JunB	+2	+0.38	TATA less	Inr

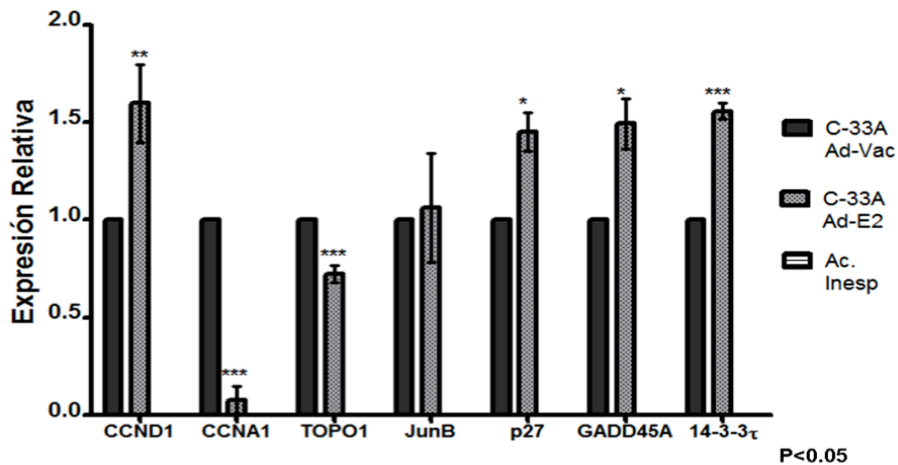
**Tabla 3.** Genes en los que estudios separados indican que tanto la mutación en TAF1 como la expresión de E2 modifican fuertemente su transcripción (García-Venzor 2013).

En un estudio por inmunoprecipitación de cromatina de estos promotores, utilizando anticuerpos contra TAF1, se detectaron cambios en los niveles de TAF1 asociado a estos promotores cuando E2 está presente (figura 10). De esta forma se encontró que en los genes CCNA1 y TOPO1, E2 indujo una disminución de un 30 y 50% en la unión de TAF1 a sus promotores, mientras que en el gen CCND1, el cuál a pesar de ser un activador de la progresión del ciclo celular, E2 condujo a un aumento de un 50% en la unión de TAF1 al promotor (García-Venzor 2013).



**Figura 10.** Análisis por qPCR de los ChIP con anti-TAF1 de genes de ciclo celular en células C-33A infectadas con los virus Ad-E2 y Ad-vacío. La evaluación del cambio en la unión de TAF1 a los promotores. Resultado de 3 ensayos independientes,  $p < 0.005$  (Garcia-Venzor 2013).

Una vez determinado el efecto de E2 sobre la unión de TAF1 a los promotores de genes de ciclo celular, se realizó el análisis del impacto de E2 sobre los niveles de expresión de dichos genes. Este análisis se llevó a cabo por qRT-PCR (figura 11). Los niveles de expresión de los genes de ciclo celular mostró un comportamiento semejante a los resultados obtenidos por Inmunoprecipitación de la cromatina. En el caso del gen CCNA1 se observó una supresión importante de la expresión ya que los niveles de expresión fueron 10 veces menores cuando se expresó la proteína E2, siendo éste el gen en el que el cambio en la unión de TAF1 provocó un impacto mayor en sus niveles de expresión (Garcia-Venzor 2013), lo que concuerda con estudios anteriores donde en células ts13 transfectadas con E2 se midieron los niveles de ciclina A y D por RT-PCR, encontrándose interesantemente que solo los niveles de ciclina A se encontraron disminuidos. A pesar de ello, en estas células la alteración de los niveles de ciclina A aparentemente no afecta el ciclo celular (Centeno-Cruz Federico 2008). Por último en el caso del gen CCND1, se observó que el incremento en la unión de TAF1 al promotor provocó una elevación en los niveles de expresión del gen (Garcia-Venzor 2013).



**Figura 11.** Análisis de la expresión de los genes de ciclo celular por qRT-PCR en células C-33A infectadas con Ad-E2 y Ad-vacío. En la figura se muestra el cambio en los niveles de expresión de los mensajeros de 4 genes implicados en diversas vías de señalización. Resultado de 3 ensayos independientes,  $p < 0.005$  (Garcia-Venzor 2013).

Todo esto indica que E2 podría inducir con ayuda de TAF1 un salto del punto de transición G0/G1 y un freno en la progresión de la fase S o bien un aumento en la duración de la misma, debido a la disminución en la expresión de genes que generan la progresión de la fase S (ciclina A) y un aumento en la expresión de reguladores negativos de estas fases del ciclo celular. Este podría ser un mecanismo mediante el cuál E2 podría generar una acumulación y activación de factores necesarios para la replicación del genoma viral, permitiendo que la duración de la fase S se prolongue, asegurando el tiempo necesario para que se lleve a cabo una replicación del ADN viral exitosa.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La regulación del ciclo celular en la célula huésped es una parte importante para una replicación viral exitosa, aunque se sabe poco de esta actividad en VPH de alto riesgo, y solo se conoce el rol de los oncogenes E6 y E7. Actualmente se ha descubierto que la proteína E2 de VPH16 es capaz de regular la expresión de genes tanto virales como celulares, y que dentro de estos genes blanco se encuentran la ciclina A y la ciclina D que son importantes para la progresión del ciclo celular. Por estas razones, el estudio del efecto de la proteína E2 de VPH16 sobre el ciclo celular es importante para elucidar un mecanismo mas amplio mediante el cual el VPH de alto riesgo es capaz de controlar la progresión del ciclo celular para favorecer una replicación viral exitosa.

### **4. HIPÓTESIS**

La expresión de la proteína E2 de VPH16 modifica la progresión del ciclo celular de líneas celulares epiteliales VPH negativas.

## **5. OBJETIVOS**

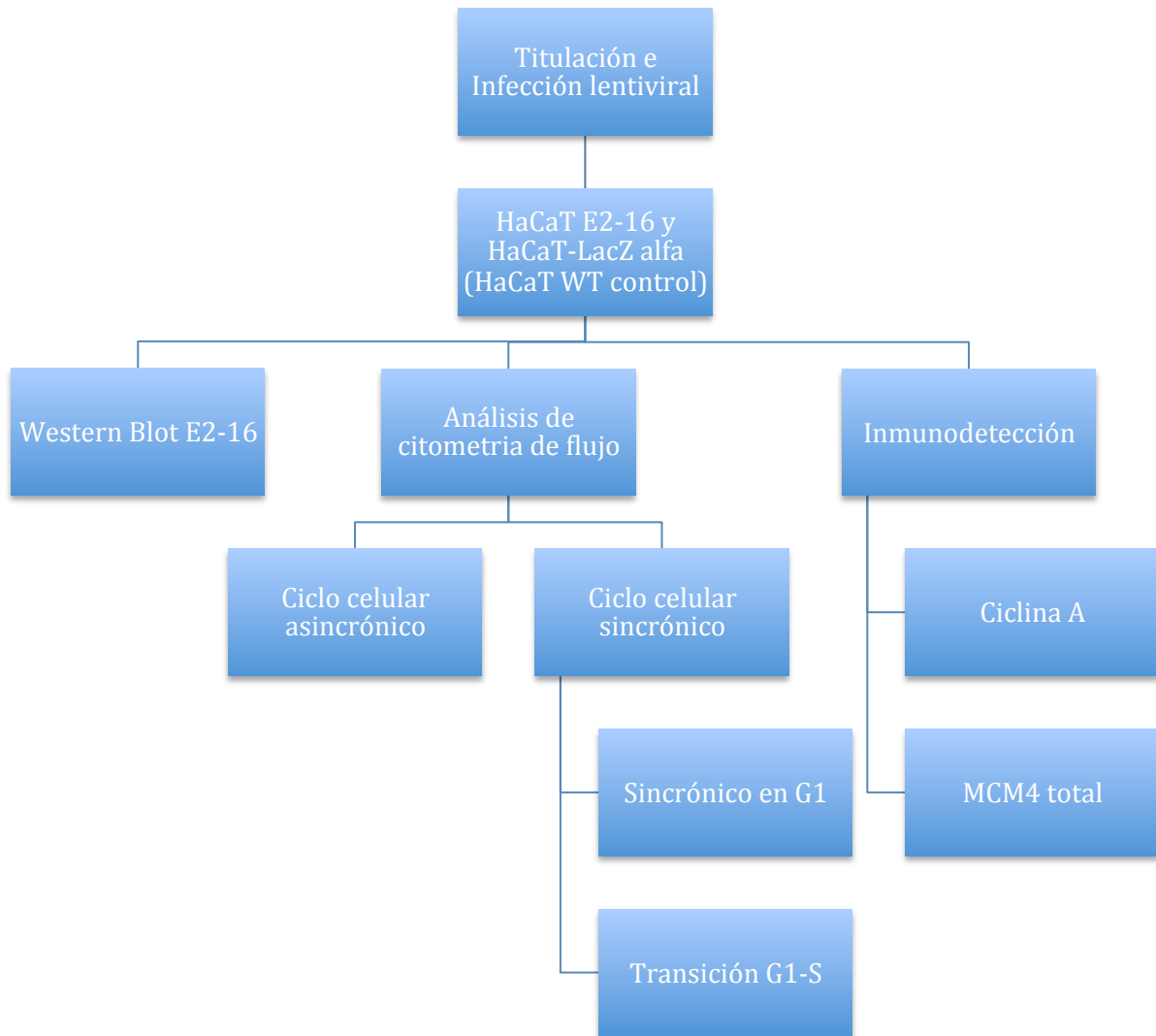
### **5.1 Objetivo General**

Analizar el mecanismo mediante el cual la proteína E2 de VPH16 modifica el tránsito por las fases G1 y S del ciclo celular.

### **5.2 Objetivos Específicos**

- 1.- Expresar el gen E2 de VPH16 mediante un sistema lentiviral en la línea celular HaCaT y evaluar la expresión de E2.
- 2.- Analizar la progresión del ciclo celular en células HaCaT y HaCaT-E2 HPV16, en cultivo asincrónico y sincrónico en la fase G1.
- 3.- Evaluar el efecto de la expresión de E2 de VPH16 sobre los niveles proteicos de Ciclina A y la actividad cinasa del complejo ciclina A-CDK-2 sobre blancos implicados en el control de la fase S del ciclo celular

## 6.Estrategia Experimental



## **7. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 Cultivo celular**

Para la realización de este trabajo se utilizó la línea celular llamada HaCaT. La línea celular HaCaT proviene de queratinocitos de humano, fue inmortalizada por mutación espontánea y no es tumorigénica; su cultivo celular se realizó en DMEM (Gibco) suplementado con 2mM L-glutamina, 1mM piruvato de sodio, 50 U/mL penicilina, 50 ug/mL de estreptomina + 10% SFB (suero fetal bovino). Este cultivo celular se mantuvo en un ambiente de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Esta línea celular fue elegida para este trabajo porque no expresa ninguna proteína viral, por lo que pueden evaluarse efectos de cualquier tratamiento sin la intervención adicional de estas.

### **7.2 Titulación de lentivirus**

Para la realización de este trabajo se usó un sistema lentiviral previamente construido en nuestro grupo de investigación, con la finalidad de expresar la proteína E2 de VPH16 de manera estable en la línea celular HaCaT. Se utilizaron dos lentivirus: uno que permitió la expresión del transgen E2-16, y otro que expreso un fragmento del gen LacZ alfa, el cual se uso como transgen control, para observar que el solo sistema lentiviral no afectara el comportamiento normal de las células HaCaT.

Los vectores lentivirales son una herramienta útil para la integración de DNA en las células de interés gracias a que durante su ciclo replicativo requieren la integración al genoma celular, y que al poseer un promotor para un factor de la traducción la expresión del transgen sucede por largos períodos de tiempo, independientemente de la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula blanco, permitiendo la transducción de células aún en estado quiescente. El gen de interés (transgen) es integrado en el genoma del hospedero y después expresado establemente en la células transducidas. Estos lentivirus contienen el

promotor del factor de traducción humano EF-1a el cual es un promotor de genes constitutivos que no es silenciado por metilación y su actividad es constante, lo cual permite una expresión constitutiva por largos períodos de tiempo del gen de interés. La actividad del sistema lentiviral puede ser monitoreada por una secuencia IRES (por su nombre en inglés, Internal Ribosomal Entry Sequence) que permite la traducción independiente de 5' cap inmediatamente después del transgen de interés, expresando un marcador de resistencia a un antibiótico, lo que permite su selección, en nuestro caso se utilizó la selección por puromicina.

Una vez que fueron obtenidos y purificados los lentivirus recombinantes que llevan como transgen la región codificante de la proteína E2 (lentivirus-E2), o el fragmento del gen LacZ alfa, se procedió a la titulación de los virus por el método de dilución limitante; para lo cual se realizó una infección en células HaCaT. Sembrándose un día antes 12 000 células por  $\text{cm}^2$  (57 600 cel/pozo de placa de 6 pozos). Se hicieron 5 diluciones (900 $\mu\text{l}$ /cu) del virus con DMEM suplementado + 10% SFB, desde  $1 \times 10^{-2}$  hasta  $1 \times 10^{-6}$  (cada dilución conteniendo 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de polybrene para favorecer la infección viral), se lavaron los pozos 2 veces con 1ml de PBS1x (NaCl 135mM, KCl 2.68mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.46mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.3mM PH 7.3), y se colocó cada dilución en cada uno de los pozos correspondientes de células HaCaT. Después de esto las células se incubaron a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ . Al siguiente día se paró la infección viral retirando el medio con partículas virales y lavando 3 veces con 1ml de PBS1x, adicionando después del último lavado 2ml de medio DMEM suplementado + 10% SFB. Se incubaron las células nuevamente por 24hrs bajo las condiciones mencionadas. Después de esto se procedió a realizar la selección con puromicina (0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de puromicina) por 7 días o hasta que las células sin infectar (control) mueran, cambiando el medio con puromicina cada 48 hrs. Terminada la selección se realizó una tinción con colorante cristal violeta. Al día siguiente se contaron las colonias que mostraran más de 4 células teñidas con cristal violeta en cada dilución con ayuda del microscopio óptico, calculándose el título viral por la siguiente fórmula:



$$\text{numero de partículas virales} = \frac{(\text{num. de colonias})}{(\text{factor de dilucion})(\text{vol. de virus (ml)})}$$

### **7.3 Tinción con colorante cristal violeta**

Para la tinción de cristal violeta se preparó una solución de cristal violeta al 1% con etanol al 70%. Una vez preparada la solución, se retiró el medio a las células sembradas en cajas de 6 pozos con vacío y se lavaron 3 veces con 1ml de PBS1x, añadiendo al final del último lavado 1ml de cristal violeta al 1% a cada pozo cubriendo perfectamente las células e incubando 10 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se retiró la solución de cristal violeta con trampa de vacío, se lavaron 3 veces con 1ml de PBS1x y 1 vez con 1ml de H<sub>2</sub>O desionizada.

### **7.4 Infección de células HaCaT con los lentivirus E2-16 y LacZ**

Para la infección de lentivirus (Lenti-E2 y Lenti-LacZ) en células HaCaT, primeramente se sembraron 6 000 células por cm<sup>2</sup> (330 000 cel/p100) y se incubaron por 24hrs bajo las condiciones mencionadas. Pasado este tiempo se procedió a infectar a las células con 0.5 M.O.I de lentivirus (adicionando 8 µg/ml), manteniendo un cultivo celular paralelo sin infectar como control negativo de la infección; las células se volvieron a incubar por 24hrs bajo las condiciones mencionadas. Al día siguiente se retiró la infección lavándose 3 veces con 3ml de PBS1x y adicionando DMEM suplementado + 10% SFB. Las células se incubaron 48hrs bajo las condiciones mencionadas y se comenzó la selección de células con puromicina (0.3 µg/ml de puromicina) por 7 días cambiando el medio con puromicina cada 48hrs. Pasados los 7 días de selección (o en el momento en que las células sin infectar (control) mueran por la puromicina) se retiró la selección de puromicina de las células y se crecieron normalmente con DMEM suplementado + 10% de SFB bajo las condiciones mencionadas.

## **7.5 Extracción de proteínas totales**

Para la extracción de las proteínas de las células de interés, primeramente se retiró el medio de cultivo de las cajas con células y se lavaron 2 veces con 3ml de PBS1x (para el caso de una caja p100). Después de esto las células se cosecharon con 1ml Tripsina y PBS1x con una relación de volumen 1:1, incubándose bajo las condiciones mencionadas por 4 minutos. Las células fueron centrifugadas por 5 min a 2 500 rpm, se eliminó el sobrenadante con trampa de vacío y se resuspendió la pastilla de células en 150µl de buffer RIPA (NaCl 150mM, EDTA 5 mM, Triton 1%, sodio deoxicolato 1%, SDS 0.1%, Tris-HCl 1M PH 7.6) adicionado con inhibidores de proteasas (ROCHE). Las células resuspendidas se pasaron 10 veces por una aguja calibre 21 o 22 y posteriormente por una aguja de insulina (hasta deshacer totalmente los grumos). Se incubaron por 60 min. a 4°C, (a los 30 min. de incubación se agitó vigorosamente con un vortex por aproximadamente 15 segundos). Después de esto se centrifugaron a 13 000 rpm por 10 min. a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se hicieron alícuotas de 50µl (dejando 15µl para realizar la cuantificación de proteínas). Se realizó la cuantificación de proteínas por triplicado usando el Kit *DC* protein assay de BIO-RAD.

## **7.6 Inmunodetección en fase sólida (Western Blot)**

Se utilizaron geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) de poliacrilamida al 10% con un espesor de 1.5mm. 50ug de cada muestra fueron colocadas en tubos y se les añadió un volumen de Buffer de muestra 2x (Glicerol 2ml, SDS10% 2ml, azul de bromofenol 0.25mg, y SGB4x 2.5ml para un volumen final de 10ml) adicionado con β-Mercaptoetanol). Las muestras se colocaron en ebullición por 3min y se cargaron a los geles. Se migraron electroforéticamente en una cámara de electroforesis (BIO-RAD) utilizando un Buffer de corrida RB1x (Tris-Base 0.24M, Glicina 1.91M y SDS 1%), a un amperaje constante de 25 mA. Se equilibraron los

geles con Buffer de transferencia por 30 minutos. Pasado este tiempo se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD), usando una cámara de transferencia (BIO-RAD) con el buffer de transferencia (Tris-Base 24.264mM, Glicina 191.2mM y 20% de metanol) corriendo a un voltaje constante de 90 Volts por 90 minutos. Después de esto se tiñeron las membranas de nitrocelulosa con rojo de Ponceau para verificar la eficiencia de la transferencia y la integridad de las proteínas y se lavaron con PBS1x. Se bloqueó la membrana con PBS1x-Leche al 5% por 1hr y se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente toda la noche a 4oC (anti-ciclina A 1:500 sc-751, anti-MCM4 1:500 sc-22779, anti-actina 1:500 donada por el Dr. Manuel Hernández del departamento de Biología celular del CINVESTAV) . El día siguiente se hicieron 3 lavados de 10min en un agitador de oscilación para quitar el exceso de anticuerpo primario con PBS1x-tween 0.2% y un lavado de PBS1x de 10 min. Se incubó con el anticuerpo secundario (anti-ratón 1:5,000 y anti-conejo 1:15,000 ambos de Jackson Immunology Research) pertinente por 1.5hrs en PBS1x-leche 5%. Pasado esto se volvieron a repetir los lavados de membrana anteriores. El revelado de las proteínas inmunodetectadas por los anticuerpos en las membranas se llevó a cabo con los reactivos de detección SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, expuestos a la membrana por 1 minuto y exponiendo las placas de revelado a diferentes tiempos según el caso del anticuerpo. También se usó solución de revelado sumergiendo la placa por 3 minutos y la solución de fijado sumergiendo la placa 3 minutos.

## **7.7 Fijación de células**

Para la fijación de las células de interés, se retiró el medio de cultivo de las cajas y se lavaron 2 veces con 3ml de PBS1x. Después de esto las células se cosecharon con 1ml de Tripsina y PBS1x con una relación de volumen 1:1, incubándose bajo las condiciones mencionadas por 4 minutos. Una vez hecho esto las células fueron centrifugadas por 5 min a 2 500 rpm, se eliminó el sobrenadante con vacío,

se resuspendió la pastilla de células en 300µl de PBS1x y a esta suspensión se le agregó en agitación 700µl de Etanol absoluto frío (adicionando gota a gota), para obtener 1ml a una concentración final de Etanol al 70%. Hecho esto, las células se guardaron a -20°C por lo menos 12hrs.

### **7.8 Tinción de ioduro de propidio para Ciclo celular**

Primeramente se centrifugaron las células previamente fijadas con Etanol al 70% (las células se mantuvieron a 4°C entre cada paso) a 3,500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante con trampa de vacío y se resuspendió la pastilla en 500µl de PBS1x frío. Después de esto se volvió a centrifugar, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 370µl de PBS1x frío. Se agregaron 20µl de RNAsa y se incubó a 37°C por 10min. Pasado este tiempo se colocaron 10µg de Ioduro de propidio (IP) y se incubó por 1hr a 4°C en oscuridad. Las muestras fueron leídas en el citómetro de flujo Fortessa de Becton Dickinson.

### **7.9 Tinción de DAPI para ciclo celular**

Primeramente se centrifugaron las células previamente fijadas con Etanol al 70% (las células se mantuvieron a 4°C entre cada paso) a 3,500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante con vacío y se resuspendió la pastilla en 500µl de PBS1x frío. Después de esto se volvió a centrifugar, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200µl de DAPI [3 µg/ml] y se incubaron en la oscuridad por 1hr. Pasado este tiempo se llevaron a un volumen de 400µl con PBS1x. Las muestras fueron leídas en el citómetro de flujo Fortessa de Becton Dickinson.

### **7.10 Sincronización de células en la fase G1**

Para la sincronización de las células de interés, se sembraron 450,000 cel con DMEM suplementado + 10% SFB y se cultivaron bajo las condiciones mencionadas por 48hrs o el tiempo necesario para que las células tengan una confluencia mayor o igual al 80%. Una vez obtenida la confluencia necesaria se retiró el medio de cultivo de las cajas y se lavaron 2 veces con 3ml de PBS1x. Después de esto se les añadió medio DMEM suplementado carente de SFB y se incubaron bajo las condiciones mencionadas por 48hrs. Transcurrido el tiempo las células fueron cosechadas y fijadas para su posterior lectura de ciclo celular en el citómetro de flujo Fortessa de Becton Dickinson.

### **7.11 Ensayo de transición de la fase G1-S y progresión de la fase S**

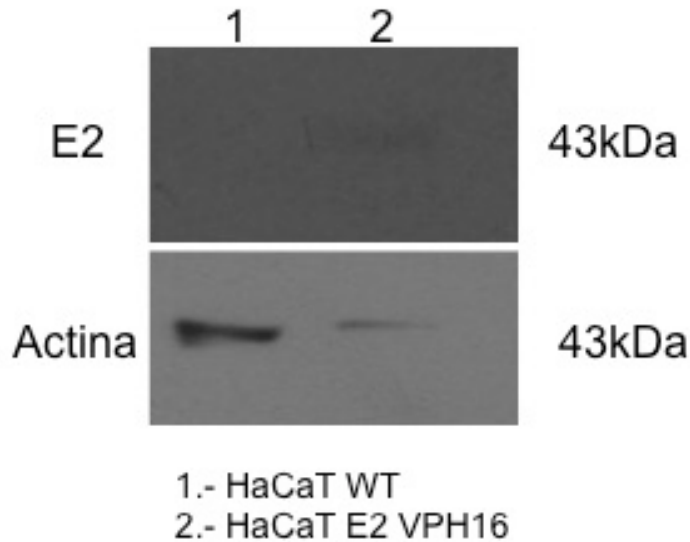
Para este ensayo se sembraron 450,000 cel. con DMEM suplementado + 10% SFB y se cultivaron a bajo las condiciones mencionadas por 48hrs o el tiempo necesario para que las células alcanzaran una confluencia mayor o igual al 80%; en este punto se cosecharon y fijaron un cultivo paralelo para tener células control asincrónicas. Obtenido esto se realizó la sincronización de las células en G1, e igualmente en este punto se cosecharon y fijaron otras células para tener un control de células sincronizadas en G1. Una vez hecho esto se retiró el medio de cultivo de las cajas, lavándose 2 veces con 3ml de PBS1x. Después de esto se procedió a liberar las células añadiendo medio DMEM suplementado + 10% SFB y se incubaron a bajo las condiciones mencionadas. El tiempo de incubación en estas condiciones fue variable dependiendo de los tiempos de liberación estandarizados, siendo estos, 12, 18, 24, 30 y 36hrs. Una vez transcurridos estos tiempos las células fueron cosechadas y divididas; el 70% de las células fueron tomadas para extracción de proteínas; el 30% de las células restantes se fijaron y se tiñeron con IP para la lectura del ciclo celular en el citómetro de flujo Fortessa de Becton Dickinson.

## **8. RESULTADOS**

### **8.1 Expresión de E2 mediante un sistema lentiviral**

Para la realización de este trabajo, como ya se mencionó anteriormente, se usó un sistema lentiviral previamente construido en nuestro grupo de trabajo, con la finalidad de expresar la proteína E2 de VPH16 de manera estable en la línea celular HaCaT, y así poder evaluar si tiene un efecto sobre la progresión del ciclo celular de dicha línea celular.

Se realizó la infección lentiviral con E2-16 y LacZ en células HaCaT, infectando con una M.O.I. de 1.0, lo que quiere decir que se colocó la cantidad de virus necesaria para que una célula se infectada por un solo virus. Pasado esto se realizó la selección con puromicina, y todas las células resistentes expresarían a nuestro transgen de interés, obteniendo líneas celulares de HaCaT E2-16 y HaCaT LacZ alfa. Una vez obtenida nuestra línea celular HaCaT E2-16 (15 días postinfección) las células de un cultivo en caja p100 se cosecharon, se realizó la extracción de proteínas totales y se realizó su migración electroforética en geles de poliacrilamida-SDS, electrotransfiriendo las proteínas separadas a membranas de nitrocelulosa y realizándo la inmunodetección en fase sólida. Esto permitió detectar la presencia de la proteína E2 de VPH16 y así confirmar el exitoso funcionamiento del sistema lentiviral (figura 12).



**figura 12. Western Blot de la proteína E2.** Resultado del Western Blot para la identificación de la proteína E2 de VPH 16, utilizando el anticuerpo monoclonal comercial sc-53326. En el carril 1) se utilizaron lisados de proteínas totales de células HaCaT WT como un control negativo, y en el carril 2) se utilizaron lisados de células HaCaT E2-16, las cuales mostraron la presencia de la proteína E2-16 en el peso molecular esperado.

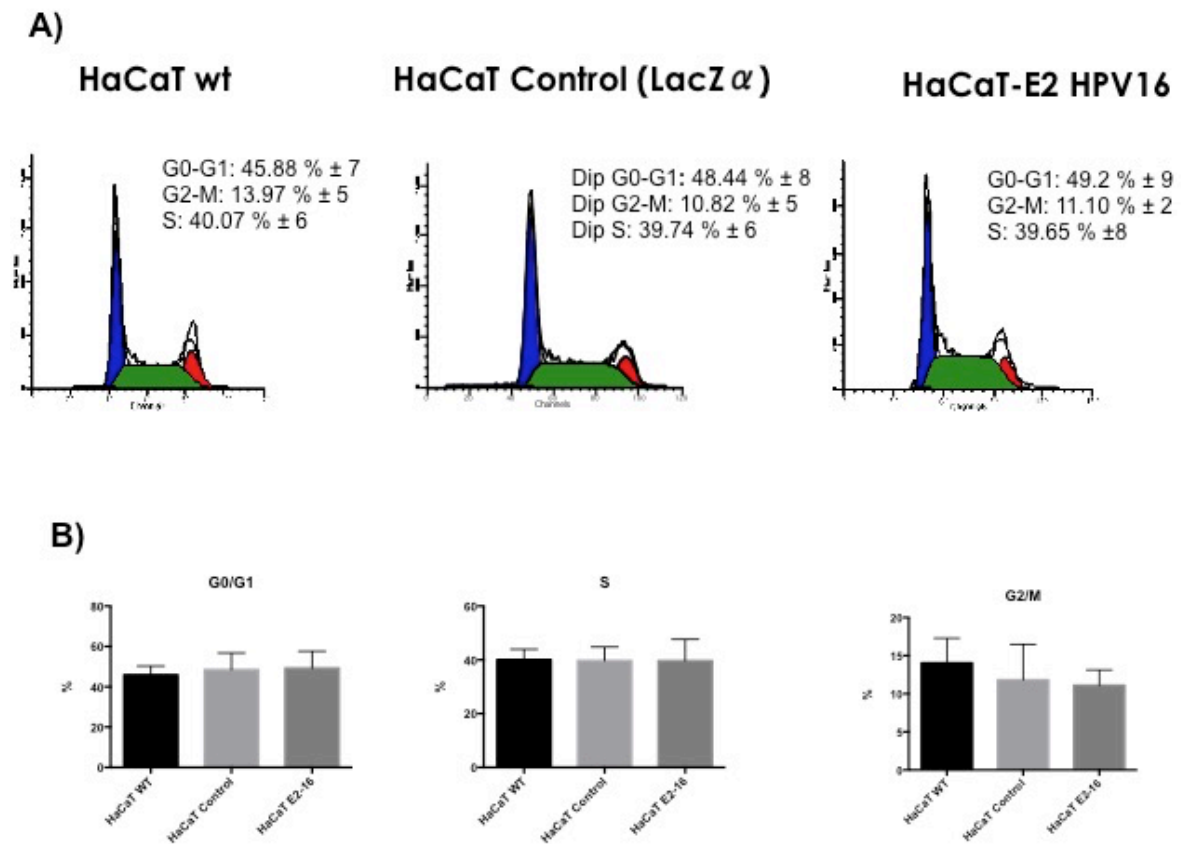
## 8.2 Evaluación de ciclo celular en células HaCaT en ausencia y presencia de E2

Para poder evaluar si la proteína E2 de VPH16 tiene un efecto sobre el ciclo celular, se realizó el análisis del perfil de ciclo celular mediante tinciones de yoduro de propidio (IP). El IP es un intercalante del DNA, y es capaz de mostrarnos indirectamente las fases del ciclo celular de acuerdo a las cantidades de DNA contenidas en las células con ayuda de la citometría de flujo. Por lo que se realizaron ensayos comparando el ciclo celular de células control (HaCaT WT y HaCaT LacZ alfa) contra células que expresan E2 de VPH16 (HaCaT E2-16),

### 8.2.1 Ciclo celular asincrónico

Para evaluar el efecto de E2-16 sobre el ciclo celular, primeramente se realizaron ensayos en células que se encuentran creciendo de manera normal en un cultivo y que se distribuyen en las todas las fases del ciclo celular (G0/G1, S, y G2/M), también llamadas células asincrónicas. El ensayo se realizó comparando células

HaCaT WT, HaCaT LacZ alfa y HaCaT E2-16, analizando mediante el método estadístico de Kruskal-Wallis para comparar los porcentajes de cada una de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular entre cada condición celular, y así poder evaluar de forma mas detallada las diferencias en porcentajes de fases del ciclo celular (figura 13). Estos ensayos mostraron que no existen cambios o diferencias significativas entre ninguna de las fases del ciclo celular entre células HaCaT WT, HaCaT LacZ alfa y HaCaT E2-16. Esto comprobó que la proteína E2 de VPH16 no tiene un efecto sobre el perfil global de ciclo celular en células asincrónicas HaCaT.



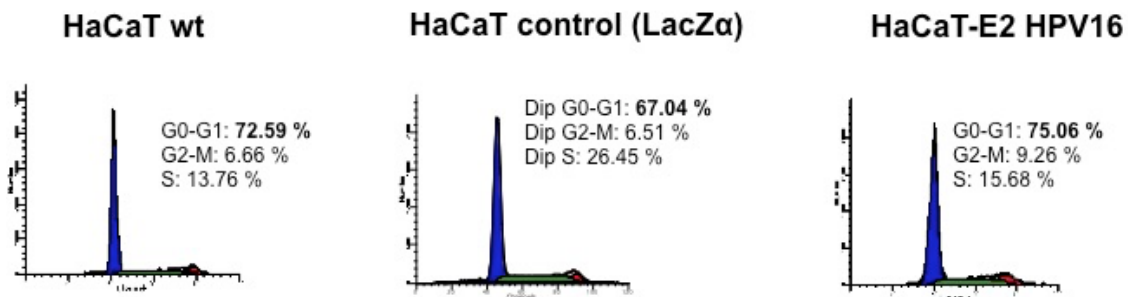
**figura 13. Ciclo celular asincrónico de células HaCaT WT, HaCaT LacZ y HaCaT E2-16.** Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo usando una tinción con IP. En el panel A) se observa el perfil de ciclo de las tres condiciones celulares, mostrando similitud. En el panel B) se realizó el análisis estadístico por el método de Kruskal-Wallis comparando los porcentajes de cada una de las etapas del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) entre las tres condiciones celulares,



mostrando que no existe diferencia significativa entre cada condición celular, por lo que el perfil de ciclo celular es muy parecido entre ellas.

### 8.2.2 Ciclo celular sincrónico en G1

Debido a que no se observó un efecto en el ciclo celular asincrónico en presencia y ausencia de E2-16, se procedió a realizar la sincronización de células HaCaT WT, HaCaT LacZ alfa y HaCaT E2-16 en la fase G1 por depleción de suero, provocando que las células no pasaran el punto de restricción de G1 por falta de nutrientes. Esto para posteriormente poder realizar el ensayo de transición de las fases G1-S y el seguimiento a la progresión de la fase S, así como también observar si E2-16 pudiera tener un efecto sobre el punto de restricción de las células HaCaT, que afectara la eficiencia en la sincronización de las células HaCaT que expresan E2. Al realizar el ensayo se observó que las células tanto en presencia como en ausencia de E2-16 se sincronizaron en G1 eficientemente bajo las mismas condiciones (figura 14). Esto significa que la proteína E2-16 no impide la sincronización de las células HaCaT en la fase G1 del ciclo celular.



**figura 14. Ciclo celular sincronizado en G1 de células HaCaT WT, HaCaT LacZ y HaCaT E2-16.** Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo usando tinción con IP. Las células fueron sincronizadas en la fase G1 por depleción de suero 48hrs, mostrando una sincronización exitosa en las tres condiciones celulares.

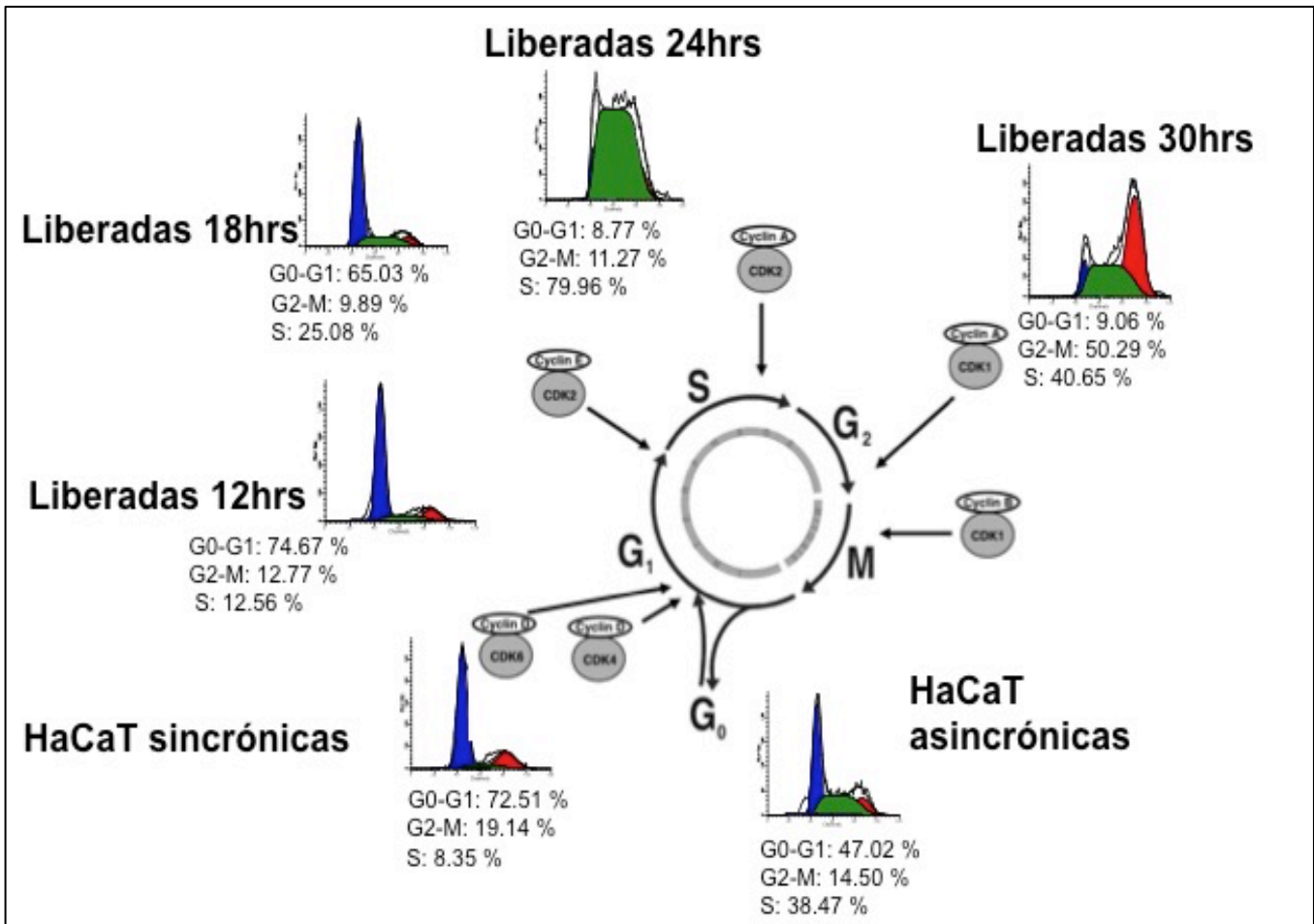
### **8.2.3 Transición de las fases G1-S y progresión de la fase S en presencia y ausencia de la proteína E2**

Luego de evaluar que la expresión de la proteína E2-16 no generó ningún efecto sobre el punto de restricción del ciclo celular G1 permitiendo la sincronización de las células HaCaT, se realizó la evaluación de la transición de la fase G1 hacia la fase S, y la progresión de esta fase.

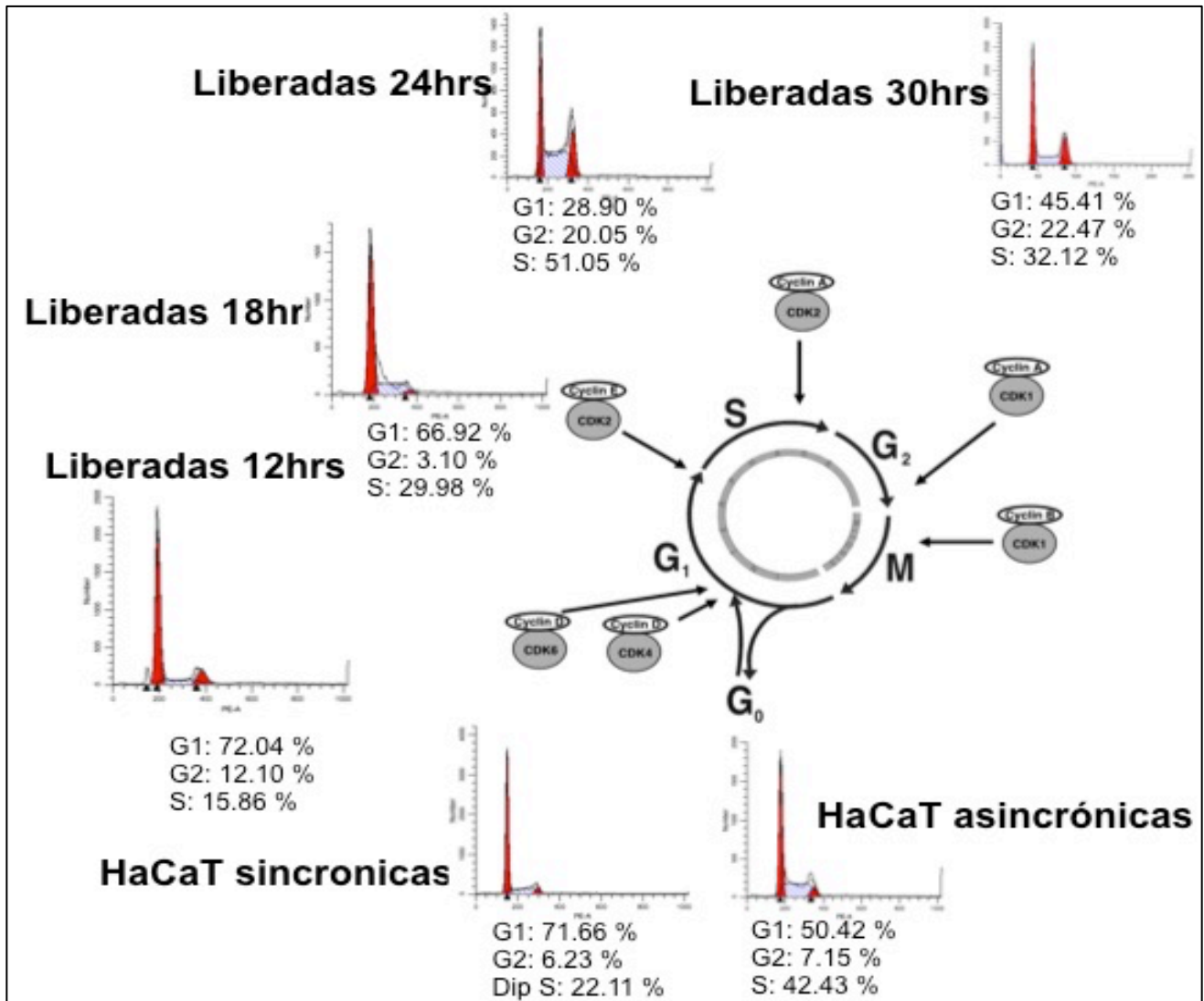
Para esto se procedió a realizar el ensayo en células HaCaT WT, HaCaT LacZ alfa y HaCaT E2-16 realizando la sincronización en G1 por depleción de suero y posteriormente liberando a las células por la adición de suero (nutrientes), para permitirles pasar el punto de restricción y que las células continuaran el ciclo celular sincrónicamente. Después de esto, se evaluaron tiempos tempranos después de haber sido liberadas, siendo estos 3, 6, 9 y 12hrs. Los resultados de estos ensayos mostraron que a estos tiempos las células continuaban sincronizadas en G1; por lo que se decidió prolongar el análisis por tiempos mas largos después de haber sido liberadas: 12, 18, 24 y 30hrs. En estos tiempos se observó que las células en los diferentes cultivos progresaron de la fase G1 hacia la fase S del ciclo celular y su progresión continuó hasta mostrar el perfil de un ciclo asincrónico (figura 15).

Al realizar el ensayo comparativo, pudimos observar que las células control (HaCaT WT y HaCaT LacZ alfa) siguieron el mismo perfil de ciclo en los tiempos evaluados, comenzando a salir de la sincronización de la fase G1 dentro de las 12hrs y 18hrs después de ser liberadas, pasando por un enriquecimiento en la fase S a las 24hrs, mostrando luego una disminución importante de la fase S con un aumento de la fase G2/M a las 30hrs y finalmente llegando a un perfil de ciclo asincrónico a las 36hrs después de ser liberadas. Este análisis nos permite definir que la duración de la fase S del ciclo celular en células HaCaT es de un máximo de 18hrs (figura 15 y figura 16).

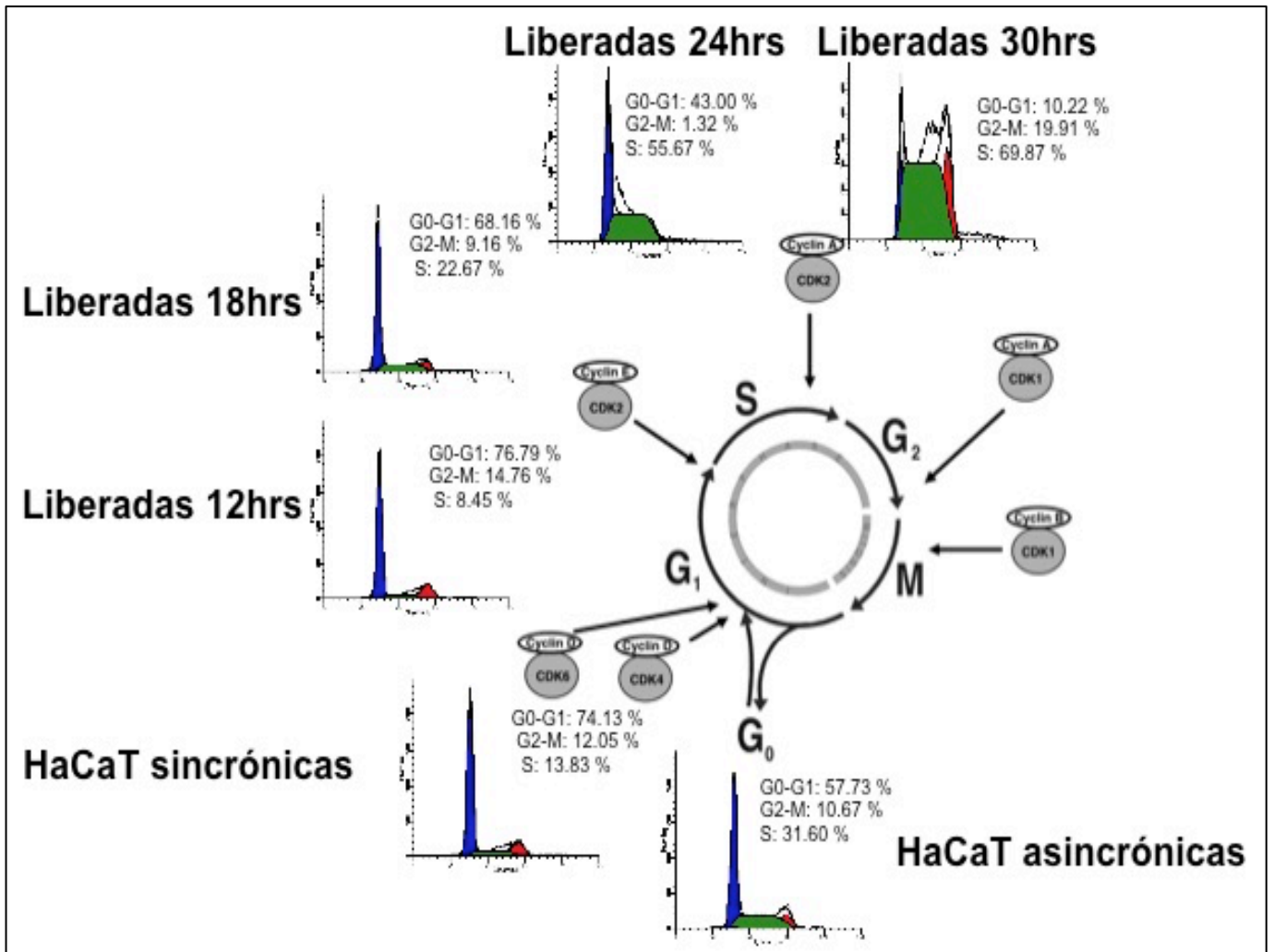
Al analizar el perfil del ciclo celular en los cultivos de células que expresan a la proteína E2-16 (HaCaT E2-16) observamos un perfil de ciclo similar al de los cultivos controles hasta las 18hrs: sin embargo 24hrs después de ser liberadas las células HaCaT E2-16 no se enriquecieron en la fase S, siendo hasta las 30hrs donde se observó un enriquecimiento mayoritario de la fase S del ciclo celular, sin observarse en ningún tiempo una disminución de esta fase (figura 17) (gráfica 1). Este efecto de retardamiento evidente en la transición G1-S y en la duración de la fase S del ciclo celular provocado por la presencia de E2-16, debe ser analizado con mayor detalle mediante ensayos que permitan observar los efectos en tiempos mayores de liberación, ya que esto permitiría precisar si existe un punto en el que las células HaCaT E2-16 llegan a mostrar un perfil de ciclo asincrónico después de ser liberadas de la sincronización, o bien si este efecto es permanente y posiblemente letal.



**Figura 15. Transición fase G1-S y progresión de la fase S en células HaCaT WT.** Evaluación de la transición por las fases G1 y S del ciclo celular por citometría de flujo usando una tinción con IP en células HaCaT WT, aunado a ensayos de sincronización en la fase G1 del ciclo celular, con su posterior liberación de la sincronización con la adición de 10% de SFB y siendo cosechadas a los tiempos de 12, 18, 24 y 30hrs después de su liberación. Observando que la transición por la fase S del ciclo celular ocurre entre las 12 y 30hrs después de haber sido liberadas de la sincronización en G1. También observando un enriquecimiento mayoritario de la fase S a las 24hrs.

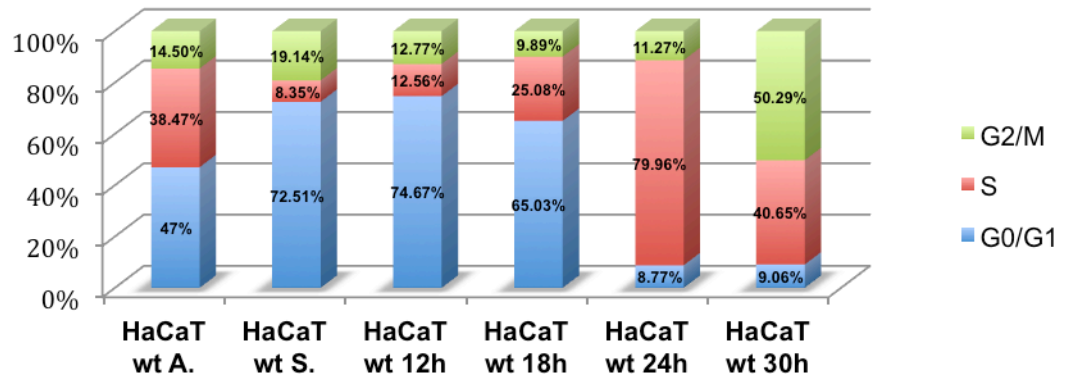


**Figura 16. Transición fase G1-S y progresión de la fase S en células HaCaT LacZ.** Evaluación de la transición por las fases G1 y S del ciclo celular por citometría de flujo usando una tinción con IP en células HaCaT LacZ, aunado a ensayos de sincronización en la fase G1 del ciclo celular, con su posterior liberación de la sincronización con la adición de 10% de SFB y siendo cosechadas a los tiempos de 12, 18, 24 y 30hrs después de su liberación. Observando que la transición por la fase S del ciclo celular ocurre entre las 12 y 30hrs después de haber sido liberadas de la sincronización en G1. También observando un enriquecimiento mayoritario de la fase S a las 24hrs.



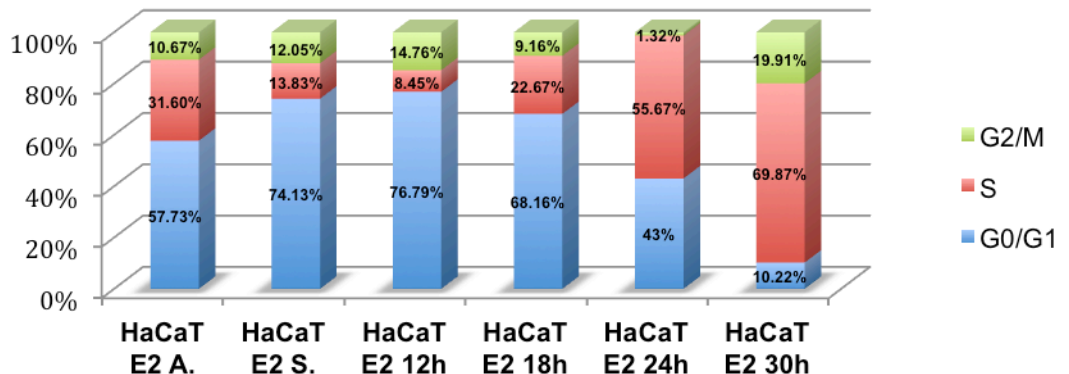
**Figura 17. Transición fase G<sub>1</sub>-S y progresión de la fase S en células HaCaT E2.** Evaluación de la transición por las fases G<sub>1</sub> y S del ciclo celular por citometría de flujo usando una tinción con IP en células HaCaT E2-16, aunado a ensayos de sincronización en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, con su posterior liberación de la sincronización con la adición de 10% de SFB y siendo cosechadas a los tiempos de 12, 18, 24 y 30hrs después de su liberación. Observando que la transición por la fase S del ciclo celular comienza a las 18hrs después de haber sido liberadas de la sincronización en G<sub>1</sub>, alcanzando un enriquecimiento mayoritario en la fase S del ciclo celular a las 30hrs después de haber sido liberadas de la sincronización en G<sub>1</sub>.

## HaCaT WT



## HaCaT E2-16

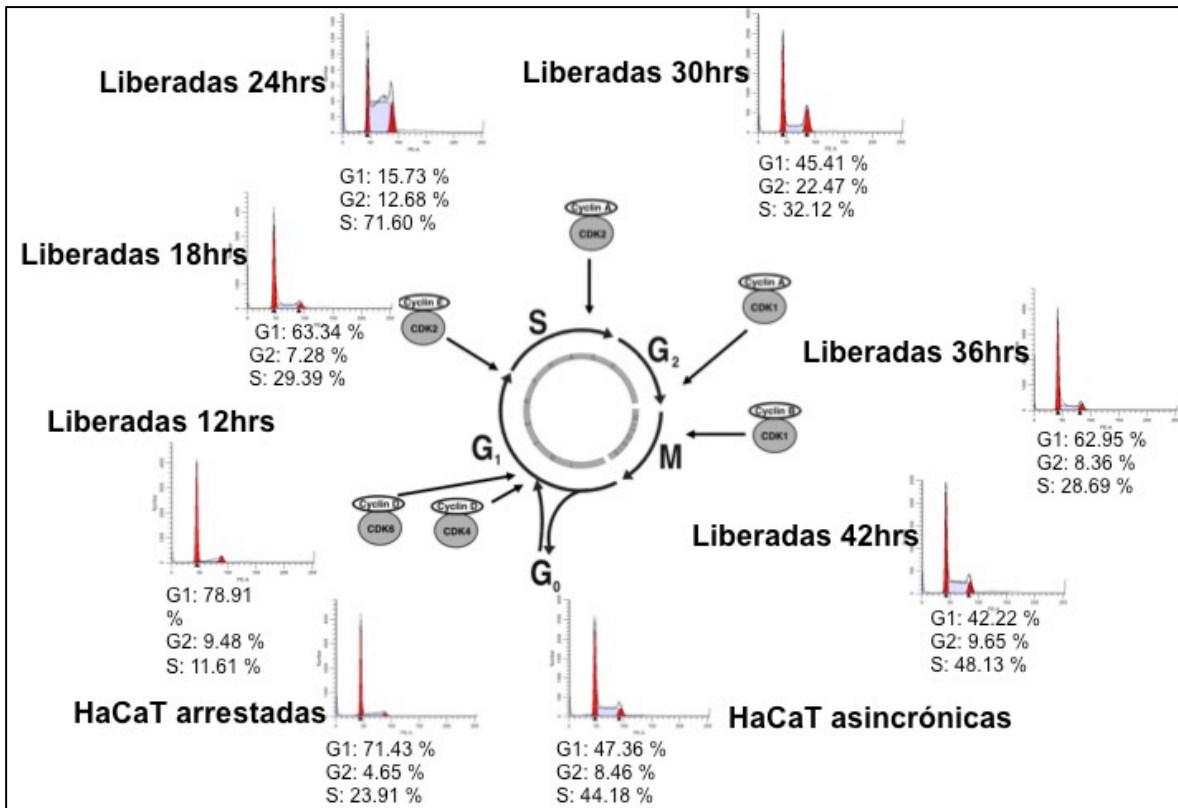
A = células asincrónicas  
 S = células sincrónicas  
 12h, 18h, etc = tiempos con  
 adición de suero



**Grafica 1. Comparación de la transición G1-S y progresión de fase S en células HaCaT WT y HaCaT E2-16, primera transducción.** Se compararon los porcentajes de las fases del ciclo celular en células HaCaT control con las células HaCaT E2-16 del primer ensayo de transición entre fases, encontrando similitud en el perfil de ciclo hasta las 18hrs después de ser liberadas. Pasado este punto, las células HaCaT control tienen el enriquecimiento máximo a las 24hrs en la fase S, mientras que las células HaCaT E2-16 lograron un enriquecimiento máximo en la fase S hasta las 30hrs.

Sin embargo, al realizar el ensayo a tiempos mayores de liberación, encontramos un comportamiento diferente de las células HaCaT E2-16 de una segunda

transducción. Aunque nuestras células control se comportaron de la misma forma que en los ensayos anteriores (figura 15 y 16), sorprendentemente las células transducidas y teóricamente expresando E2-16 presentaron un perfil de ciclo similar al de los controles (figura 18), no observándose algún efecto sobre la progresión del ciclo celular, contraponiéndose con los resultados del ensayo previo.



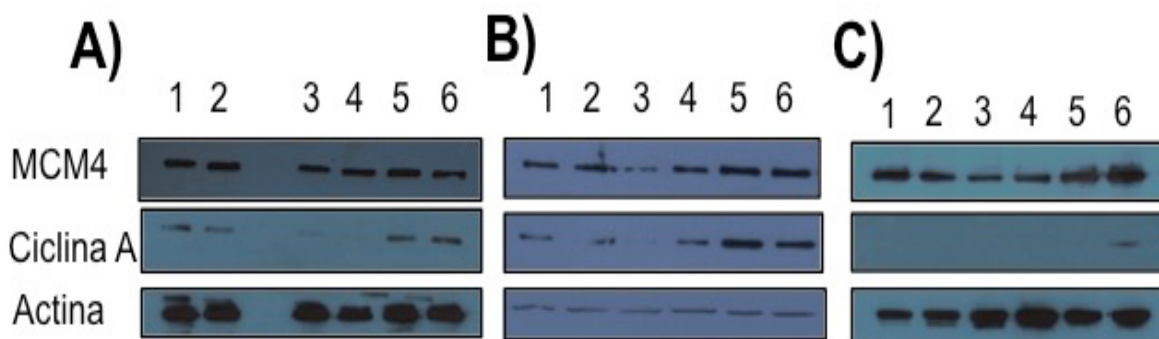
**Figura 18. Transición fase G1-S y progresión de la fase S en células HaCaT E2 usando tiempos mayores de liberación.** Evaluación de la transición por las fases G1 y S del ciclo celular por citometría de flujo usando una tinción con IP en células HaCaT E2-16, usando ensayos de sincronización en la fase G1 del ciclo celular, con su posterior liberación de la sincronización con la adición de 10% de SFB y siendo cosechadas a los tiempos de 12, 18, 24, 30, 36 y 42hrs después de su liberación. Observando que la transición por la fase S del ciclo celular empieza a ocurrir dentro de las 12 y 18hrs después de haber sido liberadas de la sincronización en G1 y un enriquecimiento mayoritario en la fase S del ciclo celular a las 24hrs después de haber sido liberadas de la sincronización en G1.



### **8.3 Expresión de la Ciclina A y MCM4 en la transición de las fases G1-S y progresión de la fase S en presencia y ausencia de la proteína E2**

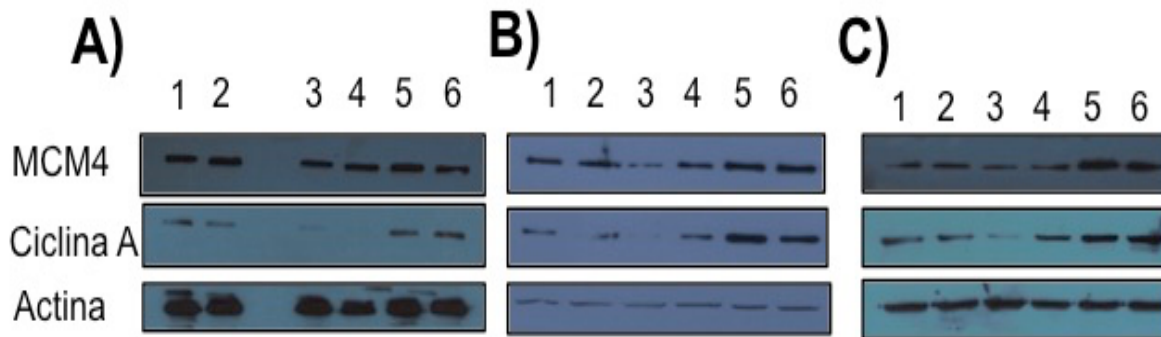
Una vez evaluado el efecto de E2-16 sobre la transición del ciclo celular en células HaCaT, se procedió a analizar si la expresión de E2-16 tenía un efecto sobre los niveles protéicos de las proteínas ciclina A y MCM4 en cada una de las fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M), ya que ensayos previos en el grupo de investigación han demostrado que en células C-33A la expresión de E2-16 induce una disminución muy importante en los niveles de RNA mensajero de la ciclina A (recordando que la ciclina A es importante para la transición de la fase G1-S y la progresión de la fase S). De esta forma, la evaluación de los niveles de estas proteínas se realizó utilizando los extractos protéicos obtenidos de los ensayos anteriormente presentados en la evaluación de la transición G1-S y progresión de la fase S, tanto de las células control como de las células con presencia de E2-16.

El ensayo de evaluación de niveles de ciclina A en células HaCaT WT indicó un comportamiento idéntico a lo reportado en la bibliografía, mostrando los niveles más altos de la proteína en el tiempo en que sucede el enriquecimiento de la fase S y en las fases G2/M, correspondiente a las 24 y 30hrs después de ser liberadas del arresto en G1. A su vez en el ensayo para la detección de la proteína MCM4 en los mismos lisados protéicos, se observó una ligera disminución de sus niveles en los primeros tiempos (12 y 18hrs) y un ligero aumento conforme sucede la progresión hacia la fase S y G2/M del ciclo celular (24 y 30hrs). El mismo patrón de ambas proteínas se observó cuando los ensayos fueron realizados en extractos protéicos obrtenidos de células HaCaT LacZ (figura 19A,B).



**Figura 19. Western Blot de MCM4, ciclina A y Actina en células HaCaT WT, HaCaT LacZ y HaCaT E2-16.** Se utilizaron lisados de A) HaCaT WT, B) HaCaT-LacZ, y C) HaCaT-E2, bajo diferentes condiciones: 1) Células asincrónicas, 2) Células sincrónicas en G1, 3) Células liberadas 12hrs, 4) Células liberadas 18hrs, 5) Células liberadas 24hrs, 6) Células liberadas 30hrs. Para evaluar la expresión de las proteínas ciclina A y MCM4, usando como control de carga Actina.

El análisis de los niveles de ciclina A en los extractos protéicos obtenidos de las células HaCaT que expresan E2-16 y que fueron utilizadas en el primer ensayo de transición de la fase G1-S y progresión de la fase S, mostró un comportamiento diferente a lo observado en las células control, mostrando una disminución en los niveles de ciclina A en su totalidad en los primeros tiempos y solo observando expresión en el enriquecimiento de la fase S, la cual concuerda con las 30hrs después de la liberación. Este resultado podría sugerir que la proteína E2-16 disminuye los niveles de ciclina A tanto a nivel de mensajero como de proteína en células HaCaT (figura 19C). A su vez en el ensayo de western blot para la detección de la proteína MCM4 utilizando los mismos extractos protéicos, se observa una ligera disminución en sus niveles en los primeros tiempos y un ligero aumento de su expresión conforme a su paso por la fase S y G2/M del ciclo celular. Este resultado es muy similar al observado en las células control, lo que parece indicar que E2-16 no tiene un efecto sobre los niveles de la helicasa MCM4 (figura 19C).



**Figura 20. Western Blot de MCM4, ciclina A y Actina en células HaCaT WT, HaCaT LacZ y HaCaT E2-16 2° ensayo.** Se utilizaron lisados de A) HaCaT WT, B) HaCaT-LacZ, y C) HaCaT-E2. Bajo diferentes condiciones: 1) Células asincrónicas, 2) Células sincrónicas en G1, 3) Células liberadas 12hrs, 4) Células liberadas 18hrs, 5) Células liberadas 24hrs, 6) Células liberadas 30hrs. Para evaluar la expresión de las proteínas ciclina A y MCM4, usando como control de carga Actina.

Curiosamente, al analizarse la expresión de estas proteínas en los extractos protéicos de células HaCaT E2-16 del ensayo de la progresión celular a mayores tiempos de salida del arresto en G1, se observó que el comportamiento de los niveles de las proteínas ciclina A y MCM4 fue muy similar al observado en las células control, observándose una expresión basal de las proteínas en células asincrónicas, con su posterior decremento en los tiempos tempranos después de liberarlas del arresto, y teniendo una mayor expresión a las 24 y 30hrs, las cuales corresponden a los puntos de enriquecimiento de la fase S y a la fase G2/M (figura 20).

## 9. DISCUSIÓN

El VPH al igual que algunos otros virus contiene proteínas capaces de regular la progresión del ciclo celular. Se conocen muy bien las actividades que las oncoproteínas E6 y E7 tienen sobre él, sin embargo no se conoce a detalle la manera en que las demás proteínas del virus lo afectan. Como ya se ha explicado la proteína E2 de VPH16 tiene la capacidad de regular la expresión de diversos genes, tanto virales como celulares, a través de dos mecanismos principales: su interacción con promotores a través de su dominio DBD y la interacción directa con proteínas a través de su dominio TAD principalmente (Bellanger et al. 2011).

Trabajos anteriores en nuestro grupo de investigación, han demostrado que la proteína E2 de VPH16 regula positivamente 581 genes y negativamente a 1048 genes en células C-33A (Ramírez-Salazar et al. 2011). También se demostró que la proteína E2 de VPH16 interactúa con TAF1 (Centeno-Cruz Federico 2008), y dentro del grupo de genes regulados por E2 de VPH16 se encontraron genes que son regulados de forma dependiente de TAF1 y que por tanto, pueden haber sido afectados mediante la interacción entre E2-16 y TAF1 (Ramírez-Salazar et al. 2011). Un trabajo posterior en las mismas células C-33A mostró cambios importantes en la unión de TAF1 y en los niveles de expresión de un grupo de genes que participan en la progresión del ciclo celular, tras la expresión de E2 de VPH16 (García-Venzor 2013). Uno de los genes destacados en este estudio fue el de la ciclina A, cuya expresión fue prácticamente nula en presencia de E2 de VPH16. Esta proteína es indispensable para la transición de la fase G1-S y la progresión de la fase S del ciclo celular, por lo que el estudio de la consecuencia de estos cambios en la expresión de la ciclina A sobre el ciclo celular resultaba muy interesante. Sin embargo una de las principales limitantes para realizar este estudio es el modelo celular, ya que al carecer de Rb y p53 funcionales, las células C-33A son difíciles de sincronizar en algunas fases del ciclo celular, haciendo complicado el estudio del ciclo celular en ella. Es por ello que se decidió trabajar con la línea celular epitelial VPH negativa HaCaT, la cual mantiene funcional a la proteína Rb y aunque posee tres mutaciones puntuales en el gen

P53, éstas afectan al dominio de unión al DNA, dejando totalmente funcionales los dominios de transactivación y tetramerización los cuales interactúan con la mayoría de las proteínas celulares (Hanna Berglind, Yudi Pawitan, Shunsuke Kato, Chikashi Ishioka 2008).

Los ensayos de ciclo celular en cultivos asincrónicos de la línea celular HaCaT mostraron que la presencia de E2 de VPH16, no provoca cambios importantes en los perfiles de ciclo celular. Esta observación ya había sido reportada tanto en nuestro grupo de trabajo como en otros grupos de investigación en otras líneas celulares (Centeno-Cruz Federico 2008, Tesis de Doctorado) (Johansson et al. 2009). El interés principal por realizar este análisis deriva del hecho del diferente fondo genético de la línea celular HaCaT con respecto a las líneas celulares en las que se realizaron los trabajos previos. En este ensayo de ciclo celular asincrónico, se esperaba encontrar el enriquecimiento en alguna de las fases del ciclo celular o indicios de endoreplicación ya que la disminución en los niveles de ciclina A, no permitiría la actividad cinasa de CDK2, por lo que al no fosforilar algunos blancos particulares como la DNA polimerasa alfa, cdc6 y MCM4, estas proteínas no podrían adquirir la función de asegurar que la replicación del DNA celular ocurra solo una vez por cada ciclo celular (Yam et al. 2002). Sin embargo, no observamos estos efectos en los cultivos asincrónicos de las células HaCaT E2-16. y consideramos que esto puede ser posiblemente debido a que el efecto de E2 sobre los genes implicados en ciclo celular podría ser menos drástico en estas células y que el cambio no sea suficiente para afectar el perfil de ciclo celular global de manera clara. Por esta razón, procedimos a la evaluación de la transición G1-S y de la progresión de la fase S ya que si los cambios en la expresión de los genes implicados en estas fases del ciclo fueran poco marcados, solo pudieran ser observados evaluando detalladamente las transiciones del ciclo celular. Para ello, primero intentamos realizar la sincronización de los cultivos de células HaCaT WT en la fase G1, dándonos cuenta que para la sincronización de estas células en G1 con una eficiencia superior al 60%, no es suficiente la depleción de suero o la eliminación de nutrientes, que en teoría impediría que las células pasaran el punto de

restricción, sino que también se requiere del efecto de inhibición por contacto (confluencia >80%). Posiblemente esta respuesta podría deberse a la incompleta funcionalidad de P53 provocada por las mutaciones antes mencionadas.

Una vez obtenidas las condiciones de la sincronización en la fase G1 de células HaCaT WT y LacZ alfa se procedió a evaluar la sincronización en células HaCaT E2-16, encontrándose que con las mismas condiciones su sincronización fue exitosa y similar a la observada en las células control, mostrando que E2-16 no evadió la sincronización en G1. Algunos antecedentes de nuestro grupo de trabajo han mostrado que E2-16 tiene la capacidad de aumentar los niveles de expresión de la ciclina D en células C-33A y esto favorecería que las células pasaran por alto el punto de restricción del ciclo celular sin problemas, como ya se ha reportado (Masamha & Benbrook 2009). Sin embargo las células HaCaT en presencia de E2 no lo hacen, lo que pudiera deberse a que aunque los niveles de mRNA de la ciclina D se ven aumentados, los niveles de proteína podrían no estarlo, por lo que para confirmar esta teoría sería necesario evaluar los niveles de proteína de la ciclina D en presencia de E2.

Al realizar el ensayo de la transición de la fase G1-S y la progresión de la fase S en células HaCaT control (HaCaT WT y HaCaT LacZ), pudo evaluarse el paso de la fase G1 hacia la fase S y su posterior paso hasta la fase G2/M encontrando que la fase S en células HaCaT control tiene una duración máxima de 18hrs, ya que el paso por la fase S se encontró dentro de las 12 y 30hrs después de ser liberadas de la sincronización; con un enriquecimiento mayoritario en la fase S a las 24hrs. Sin embargo, al realizar la comparación con la transición de las células HaCaT E2-16, se observó que E2-16 provocó un enriquecimiento mayoritario en la fase S hasta las 30hrs, cuando en las células control el enriquecimiento ocurre en las células control a las 24hrs después de ser liberadas. Esto sugiere que E2 de VPH16 provocó un retardamiento en la transición de la fase G1 hacia la fase S del ciclo celular, y además que pudiera existir un aumento en la duración de la progresión de la fase S. Estos resultados podrían correlacionar con datos de otro grupo de trabajo en donde encontraron un pequeño retraso en la progresión del

ciclo celular provocada por la presencia de E2-16 después de sincronizar células U2OS en G1 y luego liberarlas (Johansson et al. 2009). El retardamiento en la transición G1-S puede ser explicado por una disminución en la expresión de la ciclina A, ya que se sabe que los niveles de esta proteína controlan la tasa de transición de la fase G1 hacia la S, lo que obedece a que a mayor cantidad de ciclina A existe mayor paso en la transición de las fases G1-S (Yam et al. 2002). Por esta razón, fue necesario evaluar los niveles de ciclina A en cada uno de los tiempos de la transición evaluados en el ciclo celular mediante western blot en HaCaT control y HaCaT E2-16. Se encontró una disminución importante de los niveles de proteína de ciclina A en células HaCaT E2 al comparar los niveles de proteína con los observados en las células control. Esto correlacionó con los datos encontrados por nuestro grupo en los que la presencia de E2-16 provoca una disminución importante en los niveles de mensajero de la ciclina A (García-Venzor 2013). Estos datos encontrados explican de forma interesante el efecto del retardamiento en la transición de las fases G1-S del ciclo celular; sin embargo era necesario evaluar también a una de las proteínas blanco de la actividad de la ciclina A. La proteína que nosotros elegimos fue la helicasa MCM4 debido a que es de vital importancia en la formación de horquillas de replicación celular y tal vez importante para la replicación viral. Al evaluar los niveles de expresión de la proteína MCM4 total, no se encontraron diferencias con respecto a las células HaCaT control. Esto pudiera ser debido a que el efecto de una disminución en los niveles de ciclina A afectarían solamente a los niveles de fosforilación de la proteína y no tendría un impacto sobre los niveles de proteína total. Por lo que sería conveniente evaluar los niveles de proteínas fosforiladas tanto en presencia como en ausencia de E2-16.

Con la intención de conocer por un lado la duración precisa de la fase S en las células HaCaT E2 y por otro si estas células son capaces de alcanzar al paso del tiempo un estado asincrónico realizamos un ensayo incrementando el tiempo de seguimiento posterior a la liberación del arresto en G1. Al realizar este ensayo, sorprendentemente se observó un comportamiento prácticamente igual al observado en las células HaCaT control, mostrando la duración de la fase S

dentro de las 12 y 30hrs después de haber sido liberadas, con un enriquecimiento mayoritario de la fase S a las 24hrs.

Este resultado indicaría que la proteína E2-16 no tendría un efecto en la transición G1-S ni en la progresión de la fase S, a pesar de afectar los niveles de la proteína ciclina A. Sin embargo, al realizar la evaluación de los niveles de proteínas de estos ensayos, observamos que los niveles de la ciclina A no se veían afectados, mostrando un patrón muy similar al de las células HaCaT control.

Estos últimos resultados nos sugieren que muy posiblemente en las células HaCaT E2-16 utilizadas en este ensayo, la expresión del transgen no sucedió de la misma forma y los niveles que se alcanzaron de proteína E2 fueron mucho menores que en el ensayo previo. Estas diferencias pueden deberse a la integración azarosa del transgen, ya que puede integrarse a un sitio con modificaciones epigenéticas de silenciamiento génico, que le conferirían una baja capacidad de expresión.

En base a los resultados anteriores deducimos que es necesario evaluar los niveles de proteína E2-16 de cada ensayo con transducción lentiviral y seguir evaluándolos en la célula a todos los tiempos en que se realiza cada ensayo de progresión del ciclo celular, ya que de esta manera podríamos asegurar que los niveles de proteína no son una variable que pudiera afectar la interpretación de los efectos de la expresión de E2-16 sobre el ciclo celular en células HaCaT.



## 10. CONCLUSIONES

- La proteína E2 de VPH16 pudo expresarse de forma exitosa en la línea celular HaCaT mediante un sistema lentiviral.
- La proteína E2 de VPH16 no tiene un efecto sobre el perfil de ciclo celular asincrónico en la línea celular HaCaT.
- La proteína E2 de VPH16 puede tener un efecto de retardamiento en el la transición de las fases G1-S de la línea celular HaCaT, y este efecto podría ser dependiente de los niveles de expresión de la proteína E2.
- La proteína E2 de VPH16 es capaz de disminuir los niveles protéicos de la ciclina A en la progresión del ciclo celular de la línea celular HaCaT, pero no disminuye los niveles protéicos de la helicasa MCM4 total.

## 11. PERSPECTIVAS

- Analizar la transición de las fases del ciclo celular en la línea celular HaCaT E2-16, a tiempos mayores posteriores al arresto en G1 por ayuno de suero, realizando en paralelo un análisis de los niveles de proteína E2 en las células, para confirmar el efecto de retardamiento en la transición G1-S y el posible alargamiento de la fase S del ciclo celular y su dependencia con los niveles de expresión de la proteína E2-16.
- Evaluar los niveles de fosforilación de las proteínas blanco de los complejos Ciclina A/Cdk2, para elucidar el mecanismo mediante el cual la proteína E2-16 provoca el retardamiento de la transición G1-S, y posiblemente un alargamiento de la fase S del ciclo celular.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Aldana, Á. et al., 2012. Redalyc.Carcinogénesis inducida por el virus del papiloma humano. *redalyc*, 14, pp.438–456.
- Baseman, J.G. & Koutsky, L. a, 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 32 Suppl 1, pp.S16–24.
- Bellanger, S. et al., 2011. Review Article Tumor suppressor or oncogene ? A critical role of the human papillomavirus ( HPV ) E2 protein in cervical cancer progression. *Am J Cancer Res*, 1(3), pp.373–389.
- Buck, C.B., Day, P.M. & Trus, B.L., 2013. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, 445(1-2), pp.169–174.
- Caffarelli, N., Fehr, A.R. & Yu, D., 2013. Cyclin A Degradation by Primate Cytomegalovirus Protein pUL21a Counters Its Innate Restriction of Virus Replication. *PLoS Pathogens*, 9(12), pp.1–11.
- Carrillo, E., Garrido, E. & Gariglio, P., 2004. Specific in vitro interaction between papillomavirus E2 proteins and TBP-associated factors. *Intervirology*, 47(6), pp.342–9.
- Centeno-Cruz Federico, 2008. *Analisis del efecto de la interaccion de TAF1 con la proteina E2 de VPH16*. Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del IPN.
- Davy, C. & Doorbar, J., 2007. G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology*, 368(2), pp.219–226.
- Doorbar, J., 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science (London, England : 1979)*, 110(5), pp.525–41.
- Doorbar, J., 2005. The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 32 Suppl 1, pp.S7–15.
- Fando, R. & Zelada, A., 2013. La pandemia subvalorada del siglo XXI : el virus del papiloma humano . Su repercusión en la patogenia del cáncer cervicouterino.
- Garcia-Venzor, A., 2013. *Efecto de la interacción de la proteína E2 de VPH 16 con el Factor TAF1 sobre su unión a promotores celulares*.

- Garza, R.J., Lesiones en la mujer por virus papiloma humano. Available at: <http://www.viruspapiloma.com/lesiones-mujer-vph.htm> [Accessed January 1, 2015].
- Hanna Berglind, Yudi Pawitan, Shunsuke Kato, Chikashi Ishioka, T.S., 2008. Analysis of p53 mutation status in human cancer cell lines. *Cancer biology and therapy*, (April), pp.701–710.
- Hidalgo, A.C., 2006. impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna . *Rev Biomed*, 17(5), pp.81–84.
- Johansson, C. et al., 2009. The human papillomavirus 16 E2 protein is stabilised in S phase. *Virology*, 394(2), pp.194–9.
- Larraín, H., 2006. MECANISMO DE INFECCIÓN Y TRANSFORMACIÓN NEOPLÁSICA PRODUCIDO POR VIRUS PAPILOMA HUMANO EN EL EPITELIO CERVICAL. , (L).
- Luo, Y. et al., 2013. SMC1-mediated intra-S-phase arrest facilitates bocavirus DNA replication. *Journal of virology*, 87(7), pp.4017–32.
- Masamha, C.P. & Benbrook, D.M., 2009. Cyclin D1 degradation is sufficient to induce G1 cell cycle arrest despite constitutive expression of cyclin E2 in ovarian cancer cells. *Cancer Research*, 69(16), pp.6565–6572.
- McMurray, H.R. et al., 2001. Biology of human papillomaviruses. *International journal of experimental pathology*, 82(1), pp.15–33.
- Mo, M. et al., 2012. How viruses affect the cell cycle through manipulation of the APC/C. *Trends in Microbiology*, 20(9), pp.440–448.
- Muller, M. et al., 2012. Large scale genotype comparison of human papillomavirus E2-host interaction networks provides new insights for e2 molecular functions. *PLoS pathogens*, 8(6), p.e1002761.
- Muller, M. & Demeret, C., 2012. The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network. *The open virology journal*, 6, pp.173–89.
- Muñoz, N. et al., 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine*, 348(6), pp.518–27.
- Parish, J.L. et al., 2006. E2 Proteins from High- and Low-Risk Human Papillomavirus Types Differ in Their Ability To Bind p53 and Induce Apoptotic Cell Death E2 Proteins from High- and Low-Risk Human Papillomavirus Types

- Differ in Their Ability To Bind p53 and Induce Apoptotic Cell. *Society*, 80(9), pp.4580–4590.
- Pyeon, D. et al., 2009. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS pathogens*, 5(2), p.e1000318.
- Ramírez-Salazar, E. et al., 2011. HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. *Virology journal*, 8(1), p.247.
- Reimers, L.L. et al., 2009. Etiologic heterogeneity for cervical carcinoma by histopathologic type, using comparative age-period-cohort models. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(3), pp.792–800.
- Reinson, T. et al., 2015. The Cell Cycle Timing of Human Papillomavirus DNA Replication. *Plos One*, 10(7), p.e0131675.
- Sánchez-Barriga, J.J., 2012. Tendencias de mortalidad por cáncer cervicouterino en las siete regiones socioeconómicas y en las 32 entidades federativas de México en los años 2000-2008. *Gaceta Medica de Mexico*, 148(1), pp.42–51.
- Silva, R. et al., 2013. Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Rev Chilena Infectol*, 30(2), pp.186–192.
- Smith, J.S. et al., 2007. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 121(3), pp.621–32.
- Squiquera, L., 2006. VIRUS DE PAPILOMA HUMANO . HUMAN PAPILLOMAVIRUS . REVIEW OF THE DIFFERENT THERAPEUTIC MODALITIES . *REV ARGENT DERMATOL*, 87, pp.28–41.
- Steben, M. & Duarte, E., 2007. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic oncology*, 107(2 Suppl 1), pp.S2–5.
- Sunthamala, N. et al., 2014. E2 proteins of high risk human papillomaviruses down-modulate STING and IFN- $\kappa$  transcription in keratinocytes. *PloS one*, 9(3), p.e91473.
- Thierry, F., 2009. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology*, 384(2), pp.375–379.

- Velázquez-Márquez, N. et al., 2009. Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from a rural region of Puebla, Mexico. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 13(6), pp.690–5.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. & Berneman, Z.N., 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), pp.131–49.
- Woodman, C.B.J., Collins, S.I. & Young, L.S., 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews. Cancer*, 7(1), pp.11–22.
- Yam, C.H., Fung, T.K. & Poon, R.Y.C., 2002. Review Cyclin A in cell cycle control and cancer. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, pp.1317–1326.
- You, J., 2011. Papillomavirus interaction with cellular chromatin. , 1799, pp.192–199.