



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA

MOLECULAR

**EFFECTOS DE LA PROTEÍNA E2 DE LOS PAPILOMAVIRUS DE
ALTO Y BAJO RIESGO EN CÉLULAS PROGENITORAS DE
QUERATINOCITOS HUMANOS INMORTALIZADOS**

TESIS

Que presenta

M. en C. Victoria Domínguez Catzín

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

En la especialidad de Genética y Biología Molecular

Director de Tesis:

Dr. José Efraín Garrido Guerrero

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación en Biología Celular y Molecular del Cáncer en el Departamento de Genética y Biología Molecular del 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 No. 105174 y 256514. Durante la realización de este trabajo conté con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro 166970

ÍNDICE

Índice de Figuras	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	6
I. Virus del Papiloma Humano (VPH).....	6
II. Proteína Viral E2.....	8
III. Ciclo viral.....	11
IV. Proceso de la Diferenciación Epidermal.....	14
V. Factores que regulan el proceso de Diferenciación.....	14
ANTECEDENTES	19
I. Población Colateral (PC).....	23
II. Expresión de receptores de superficie celular.....	24
III. Modelos de estudio.....	25
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
I. Cultivos celulares.....	30
II. Generación del Sistema Lentiviral.....	30
III. Titulación lentiviral.....	31
IV. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	32
V. RT-qPCR.....	32
VI. Secuenciación.....	34
VII. Detección de proteínas en fase sólida.....	35
VIII. Identificación de Población Colateral (PC).....	36
IX. Identificación de subpoblaciones $\alpha 6$ -integrina/CD71.....	36
X. Ensayo de Auto-renovación.....	37

XI. Ensayo de Formación de colonias.....	37
XII. Ensayo de diferenciación.....	38
XIII. Análisis Estadístico.....	38
RESULTADOS	39
1. Análisis y determinación del modelo de estudio.....	39
I. Queratinocitos progenitores (HPEK).....	39
II. Línea celular inmortalizada de queratinocitos (HaCaT).....	40
2. Caracterización de las subpoblaciones $\alpha 6$ -integrin/CD71.....	41
I. Ensayo de auto-renovación.....	41
II. Ensayo de formación de colonias.....	43
III. Análisis de expresión de marcadores de troncalidad <i>SOX2</i> , <i>NANOG</i> , <i>OCT4</i>	45
3. Generación, propagación, purificación y titulación de lentivirus de tercera generación.....	46
I. Diseño de plásmidos de expresión.....	46
4. Transducción y expresión de genes VPH16-E2 y VPH11-E2.....	47
5. Evaluación de la abundancia relativa de las subpoblaciones $\alpha 6$ - integrin/CD71 en células HaCaT antes y durante la expresión de VPH16-E2 y VPH11-E2.....	49
6. Expresión de marcadores de troncalidad en presencia de VPH16-E2 y VPH11-E2.....	50
7. Ensayo de diferenciación de células HaCaT con CaCl ₂	52
8. Efecto de VPH16-E2 en las subpoblaciones celulares $\alpha 6$ int-CD71 en presencia de cloruro de calcio (CaCl ₂) y ácido retinoico (AR).....	55
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	69
PERSPECTIVAS	70
BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXO PUBLICACIÓN	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Clasificación de los cinco grupos evolutivos del VPH.....	7
Fig. 2 Representación esquemática del genoma del VPH.....	8
Fig. 3 Modelo de la Proteína E2 de los VPH's.....	10
Fig. 4 Ilustración del ciclo viral a través del epitelio.....	13
Fig. 5 Representación esquemática del proceso de Diferenciación Epitelial.....	16
Fig. 6. Población colateral.....	24
Fig. 7 Caracterización de queratinocitos basado en el fenotipo $\alpha 6$ -integrina/CD71.....	25
Fig. 8 Ensayo de citometría de flujo para identificar la Población Colateral (PC) en la línea celular HPEK.....	39
Fig. 9 Caracterización de la línea celular HaCaT con los marcadores anti- $\alpha 6$ -integrina y anti-CD71.....	40
Fig. 10 Estrategia para determinar la pureza de las subpoblaciones celulares.....	42
Fig. 11 Ensayo de auto-renovación en la línea celular HaCaT.....	43
Fig. 12 Ensayo de formación clonal.....	44
Fig. 13 Expresión de marcadores de troncalidad <i>SOX2</i> , <i>OCT4</i> , <i>NANOG</i>	45
Fig. 14 Clonación de genes de expresión.....	47
Fig. 15 Expresión de VPH16-E2 y VPH11-E2 en células HaCaT.....	48
Fig. 16 Evaluación de la abundancia relativa de las subpoblaciones $\alpha 6$ int/CD71 en presencia de VPH16-E2 y VPH11-E2.....	49
Fig. 17 Análisis de expresión génica por RT-qPCR de <i>SOX2</i> , <i>NANOG</i> y <i>OCT4</i> en células HaCaTwt, HaCaT-Vac, HaCaT-VPH11-E2 y HaCaT-VPH16-E2.....	51
Fig. 18 Cinética de diferenciación con CaCl_2 en células HaCaT.....	53
Fig. 19 Microfotografías de células HaCaT estimuladas con 5mM de CaCl_2	54
Fig. 20 Detección en fase sólida de involucrina en células HaCaTwt estimuladas con 5mM de CaCl_2	54
Fig. 21 La proteína VPH16-E2 promueve diferenciación en células HaCaT de una manera similar a inductores de diferenciación epiteliales.....	58

RESUMEN

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) es la cuarta causa de muerte en todo el mundo por cáncer en mujeres y es una enfermedad asociada a la infección persistente del Virus del Papiloma Humano (VPH), en particular de dos tipos de alto riesgo VPH16 y 18. Además de estos virus, de alto riesgo también existen virus de bajo riesgo como VPH11 y VPH6, que aunque no están relacionados con el cáncer, su importancia médica reside en su capacidad para generar lesiones y verrugas genitales. El virus inicia su ciclo replicativo infectando células situadas en la capa basal del epitelio, donde se localiza una pequeña población de células troncales epiteliales que desempeñan importantes funciones de renovación y mantenimiento del tejido. El gen viral E2 es uno de los primeros expresados después de la infección y desempeña papeles relevantes en el ciclo replicativo del virus, modificando procesos fundamentales en las células infectadas. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue demostrar la presencia de subpoblaciones celulares en la línea celular HaCaT y evaluar el efecto de la expresión de VPH16-E2 y VPH11-E2 en sus procesos biológicos como la diferenciación celular.

Las células HaCaT-VPH16-E2 y VPH11-E2 se generaron por transducción de la línea celular HaCaT con un vector lentiviral. El perfil de expresión de $\alpha 6$ -integrina-CD71 se estableció mediante inmuno-tinción y análisis de citometría de flujo. Después de la clasificación, las subpoblaciones celulares se analizaron en ensayos de auto-renovación, clonogenicidad y la expresión de factores de troncalidad (RT-qPCR).

Se identificaron en la línea celular HaCaT tres subpoblaciones diferentes que corresponden a células diferenciadas tempranas ($\alpha 6$ -integrina^{dim}), células transitoriamente amplificadas ($\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{bri}) y células progenitoras ($\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim}). La última subpoblación mostró características de las células madre, como la capacidad de auto-

renovación, la clonogenicidad y la expresión de los factores de troncalidad SOX2, OCT4 y NANOG, lo que sugiere que son células progenitoras. Interesantemente, la expresión de VPH16-E2 en células HaCaT modificó el inmunofenotipo $\alpha 6$ -integrina-CD71 modificando la abundancia relativa de las subpoblaciones celulares, reduciendo significativamente el porcentaje de células $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} y aumentando la abundancia relativa de la población ($\alpha 6$ -integrina^{dim}). Además, la expresión de los marcadores de células madre también se modificó, aumentando la expresión de SOX2 y NANOG, pero disminuyendo notablemente la expresión de OCT4. Por otro lado en los ensayos de diferenciación observamos que la proteína VPH16-E2 favorece un proceso de diferenciación comparable al inducido por calcio o ácido retinoico. Por lo tanto nuestros resultados demuestran que, aunque las proteínas E2 de los papilomavirus de alto y bajo riesgo son muy similares en estructura, funcionan de manera distinta en las células de la capa basal del epitelio estratificado, ya que el efecto de diferenciación temprana es mucho más evidente en presencia de VPH16-E2 que en células que expresan VPH11-E2.

ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth cause of death by cancer in women worldwide and is associated to the persistent infection of human papillomavirus (HPV), mainly from two high-risk types HPV16 and 18. In addition to these viral types, low-risk viruses not related to cancer generation, such as HPV11 and HPV6 have medical importance since its ability to generate benign lesions and genital warts.

HPV initiates its replicative cycle infecting cells located in the basal layer of the epithelium, where a small subpopulation of epithelial stem cells is located, performing the important functions of renewal and maintenance of the tissue integrity. Viral E2 gene is one of the first expressed after infection and plays relevant roles in the replicative cycle of the virus, modifying fundamental cellular processes. Thus, the aim of the present study was to demonstrate the presence of hierarchic subpopulations in HaCaT cell line and evaluate the effect of HPV16-E2 and HPV11-E2 expression, on their biological processes.

HaCaT-HPV16-E2 and HPV11-E2 cells were generated by transduction of HaCaT cell line with a lentiviral vector. The $\alpha 6$ -integrin-CD71 expression profile was established by immunostaining and flow cytometric analysis. After sorting, cell subpopulations were analyzed in biological assays for self-renewal, clonogenicity and expression of “stemness” factors (RT-qPCR).

We identified in HaCaT cell line three different subpopulations that correspond to early differentiated cells ($\alpha 6$ -integrin^{dim}), transitory amplifying cells ($\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{bri}) and progenitor cells ($\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim}). The last subpopulation showed stem cell characteristics, such as self-renewal ability, clonogenicity and expression of the well-known

stem cell factors *SOX2*, *OCT4* and *NANOG*, suggesting they are “stem-like” cells. Interestingly, the expression of HPV16-E2 changed the $\alpha 6$ -integrin-CD71 immunophenotype modifying the relative abundance of subpopulations in this cell line, reducing significantly the percentage of $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} and increasing the $\alpha 6$ -integrin^{dim} cells. Moreover, the expression of the stem cell markers was also modified, increasing the expression of *SOX2* and *NANOG*, but decreasing notably the expression of *OCT4*. On the other hand, in the differentiation assays we observed that the HPV16-E2 protein favors a differentiation process comparable to that induced by calcium or retinoic acid. Therefore, our results demonstrate that, although the E2 proteins of high and low risk papillomaviruses are very similar in structure, they have different functions in the cells of the basal layer of the stratified epithelium since the effect on early differentiation is considerably more evident in presence of HPV16-E2 than in cells expressing HPV11-E2.

INTRODUCCIÓN

I. Virus del Papiloma Humano (VPH)

El Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU) es un problema de salud pública que representa la tercera causa de muerte en mujeres mexicanas (INEGI 2013) y su desarrollo está relacionado con la presencia del Virus del Papiloma Humano (VPH), el cual está asociado a la aparición de este cáncer en un 90-100% de los casos; sin embargo es importante notar que la infección viral por sí sola no es capaz de inducir desarrollo de cáncer, ya que se ha demostrado que existe un alto porcentaje de mujeres infectadas con VPH's de alto riesgo las cuales presentan una citología del cérvix normal y jamás desarrollan cáncer [1].

El VPH es un virus pequeño de forma icosaédrica, desnudo, perteneciente a la familia *Papillomaviridae*. Se han descrito más de 100 tipos basados en el análisis de secuencias de su DNA y esta clasificación a su vez ha sido asociada al tipo de epitelio específico que infecta [2,3]. Desde el punto de vista evolutivo los papilomavirus han sido divididos para su estudio en dos grupos alfa y beta; el primero, es el grupo más grande y es donde se encuentran los papilomavirus que infectan mucosa genital, así como algunos tipos de papilomavirus cutáneos que rara vez se asocian a aparición de cáncer como el VPH2 [4] (Fig. 1 panel A). A su vez el grupo alfa tiene una subdivisión asociada al grado de oncogenicidad de cada tipo denominados papilomavirus de alto y de bajo riesgo. El VPH16 es el más representativo del primer grupo por estar presente en más del 50% de los casos de CaCU, dentro de la clasificación de virus de bajo riesgo se encuentran el VPH11 y el VPH6, que aunque no están relacionados con cáncer su importancia médica radica en su capacidad de generar lesiones y verrugas genitales [5] (Fig. 1 panel B).

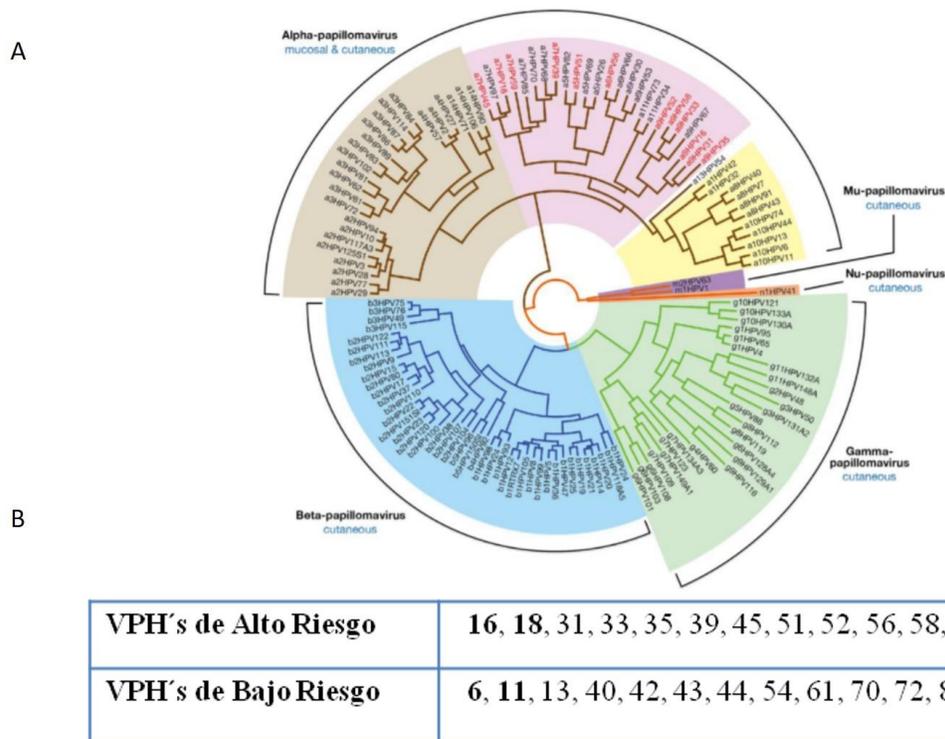


Fig. 1 Clasificación de los cinco grupos evolutivos del VPH [4] (A). Dentro del grupo de VPH que infectan mucosas se muestran los tipos más representativos de alto y bajo riesgo (B). Modificado de Egawa, N., et al., 2015 [6].

Sin importar el grado de oncogenicidad o el grupo al que pertenecen los papilomavirus comparten un gran número de características tanto morfológicas como funcionales por ejemplo todos contienen un DNA de doble cadena de un tamaño aproximado de 8Kb el cual se mantiene generalmente super-enrollado de manera episomal. Este codifica para 8 marcos abiertos de lectura (ORFs “*por sus siglas en inglés*”) en una de las cadenas del DNA, así como una región que no se transcribe ni se traduce, que regula la replicación y transcripción del virus conocida como “región larga de control” (LCR “*por sus siglas en inglés*”) la cual se encuentra organizada en nucleosomas [7]. En general la LCR está constituida en su porción 3’ por el origen de replicación y del promotor de los oncogenes E6 y E7, además de cuatro elementos de respuesta: el primero es un sitio de unión para el factor de transcripción SP1,

dos sitios de unión para la proteína E2 del virus que se caracterizan por ser secuencias palindrómicas [AACCg(N₄)cGGTT] y el cuarto que es la caja “TATA”. Hacia el extremo 5’ se localizan dos sitios más para unión de E2 además de una zona de “enhancer” específico de células epiteliales [8] y un sitio de reconocimiento para la proteína viral E1 que permite la replicación del virus [9].

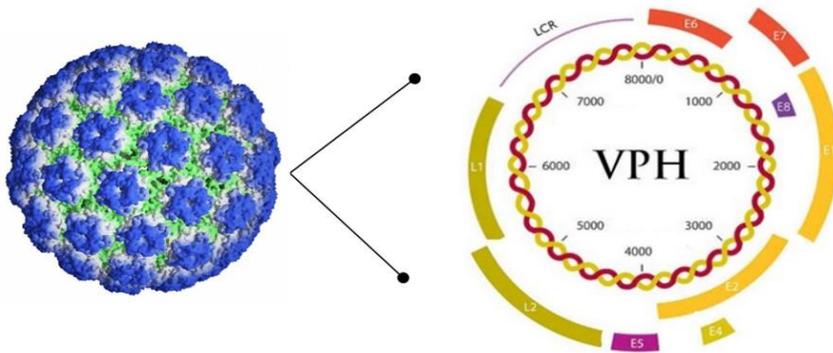


Fig. 2 Representación esquemática del genoma del VPH. Se muestran los genes de expresión temprana y tardía, así como la región larga de control (LCR). Modificado de Unger, E., et al., 2004 [10].

II. Proteína Viral E2

El gen E2 de los Papilomavirus codifica para una proteína de aproximadamente 48 kDa, con ligeras variaciones en su peso molecular dependiendo del tipo de VPH. Esta proteína posee tres dominios principales: el dominio de transactivación (TAD), un dominio de unión al DNA (DBD) y un dominio “bisagra”. El TAD está localizado en la región amino-terminal y está constituido por ~200 aminoácidos, los cuales forman a su vez, una región de α -hélices unidas por “loops” y una región de láminas- β unidas por vueltas sencillas [11,12]; también es importante en la formación de dímeros entre proteínas E2 unidas al DNA. El dominio carboxilo-terminal, corresponde a la región de la proteína E2 responsable del reconocimiento

de secuencias particulares del genoma viral. Los sitios de unión a E2 en el DNA (E2BSs) son específicos y se definen por una secuencia palindrómica consenso de 12 pb (ACCGN₄CGGT) [13]. La proteína E2 contacta a los E2BSs en las guanosinas de la secuencia palindrómica en cada cadena. Por su parte, el DBD no tiene motivos consenso de unión al DNA; sin embargo, se ha encontrado que leucinas espaciadas cada siete aminoácidos, así como ciertos aminoácidos hidrofóbicos, son importantes en la unión de E2 al DNA. El DBD se compone de ~200 aminoácidos y es una región necesaria para la dimerización de la proteína, lo que a su vez, permite que el DNA al que se une pueda doblarse [14]. El DBD está formado por una estructura denominada barril- β dimérico y cada monómero de E2 contribuye con una mitad de dicha estructura (4 láminas- β). El DBD consiste de una hélice principal de reconocimiento al DNA (α 1), una hélice pequeña adicional (α 2) y dos “loops” que conectan las láminas- β [15]. La conformación del monómero del DBD de E2 tiene una alta homología estructural entre todos los tipos de VPH, a excepción de la estructura cuaternaria (particularmente la orientación de las dos hélices de reconocimiento del DNA). Por último un dominio tipo “bisagra” que se encuentra poco conservado entre los tipos de VPH y que se localiza entre el dominio de transactivación y el de unión al DNA, que se conoce es una zona altamente fosforilable de la proteína [16] (Fig. 3).

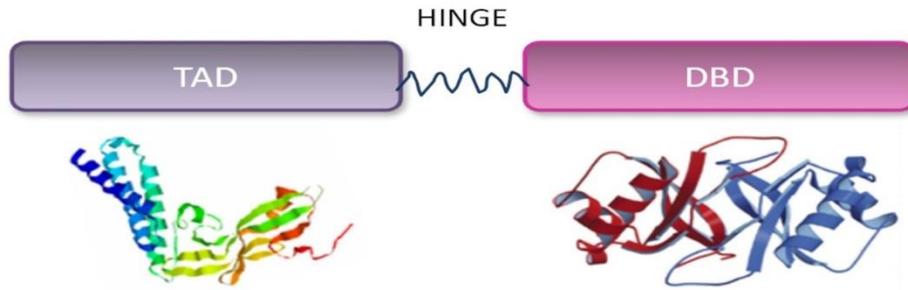


Fig. 3 Modelo de la Proteína E2 de los VPH's donde se muestra el dominio de transactivación en el extremo amino-terminal (TAD), la región bisagra (HINGE) y el dominio de unión al DNA y dimerización en el carboxilo-terminal (DBD). Modificado de Dell, G., et al., 2003 [17].

La proteína E2 participa en múltiples eventos durante la infección viral, por ejemplo, en células de la capa basal del epitelio se requiere para la iniciación de la replicación, para la transcripción, así como para la segregación del genoma viral a las células hijas durante la mitosis celular. Ya que funciona como una proteína de anclaje entre el genoma viral y los cromosomas de la célula hospedera, la proteína E2 de algunos tipos de VPH se asocia por medio de su C-terminal a la proteína Brd4 la cual es una proteína que participa en la mitosis celular a nivel de husos acromáticos; esta interacción permite la correcta segregación del genoma viral a las células hijas después de la división celular [18].

E2 como factor de transcripción se une al DNA reconociendo la secuencia palindrómica antes mencionada (E2BS) localizada en la LCR del genoma viral. En general en todos los tipos de VPH se han localizado cuatro de estas secuencias a lo largo de la LCR, dos más cercanas al promotor de E6 y dos más alejadas de este. Por esta razón es que E2 es considerada como un factor de transcripción del genoma viral, ya que regula al promotor controlando la expresión de los oncogenes E6 y E7. Cuando los niveles de E2 son bajos, ésta actúa como un activador transcripcional, mientras que a niveles elevados E2 reprime la expresión de los oncogenes virales por desplazamiento de SP1 de los sitios adyacentes del promotor evitando que el pre-

complejo de inicio de la transcripción pueda unirse al DNA [19], esta capacidad para activar o reprimir de acuerdo a su abundancia se da como resultado de la diferencia de afinidad entre los cuatro sitios de unión al DNA [20].

Cuando los niveles de E2 son bajos, la proteína se une primeramente a los sitios más alejados del promotor (sitios tres y cuatro); es en este momento cuando E2 puede reclutar a la maquinaria general de transcripción por interacción directa con la proteína de unión a caja TATA (TBP) y factores que se asocian a este como TFIID, que junto con TFIIB se unen al “core” del DNA.

III. Ciclo viral

El VPH tiene tropismo por epitelio escamoso y estratificado al igual que por mucosas; la infección del virus requiere que los viriones tengan acceso a la capa basal del epitelio, mediante una lesión o microabrasión en la cual ocurre la adhesión y la penetración de las partículas virales a las células en proliferación [21], siendo las proteínas integrales de membrana como los sindecanes y los betas-glicanos los receptores primarios que pueden mediar el contacto virus-célula y la $\alpha 6$ -integrina el receptor secundario para que se dé la infección [22,23]. Cuando el virus se une a la célula sufre un proceso de endocitosis en vesículas de clatrina o por la vía de las caveolas [24].

Una vez que se da el proceso de infección, el virus puede mantenerse en un ciclo de producción infectiva donde el genoma viral se establece en las células de la capa basal de manera episomal y en un bajo número de copias, es en este momento cuando inicia la expresión de las proteínas E1 y E2. E1 es una helicasa ATP-dependiente y es la única proteína con actividad enzimática que es codificada por el DNA viral; participa en la replicación del

DNA del VPH mediante la formación de un complejo con la proteína E2 y uniéndose al *ori* del genoma viral [25]. Una vez que se ha realizado la unión al DNA la proteína E2 se disocia del complejo permitiendo que E1 se ensamble en un anillo hexamérico que va a permitir el inicio de la replicación [26].

El genoma viral empieza a replicarse en niveles bajos en los núcleos de células infectadas sin producir partículas infectivas; conforme avanza el proceso de diferenciación celular las células basales pierden su capacidad de dividirse y ocupan los estratos suprabasales (estrato escamoso), cambiando también el patrón de expresión del genoma viral transcribiéndose importantemente los genes E6 y E7 bajo la regulación de la proteína E2.

La proteína E7 puede unirse y desestabilizar a la proteína supresora de tumor de retinoblastoma (pRb) evitando que esta se una al factor de transcripción E2F, favoreciendo la expresión de genes tanto virales como celulares que permiten la progresión del ciclo celular [27]. Además, puede bloquear la acción de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, evitando su unión con proteínas que también estimulan la progresión del ciclo celular [28].

Por otra parte la proteína E6 interactúa con las proteínas E6AP y p53, dando como resultado la degradación proteolítica de ésta última [29]. La expresión de los ORFs L1 y L2, así como el ensamblaje de la cápside con el genoma viral correspondiente, ocurre en los estratos escamoso y superficial del epitelio. Los viriones completos se encuentran únicamente en los estratos superficiales y su liberación ocurre a través de la exfoliación del epitelio [21,30] (Fig. 4).

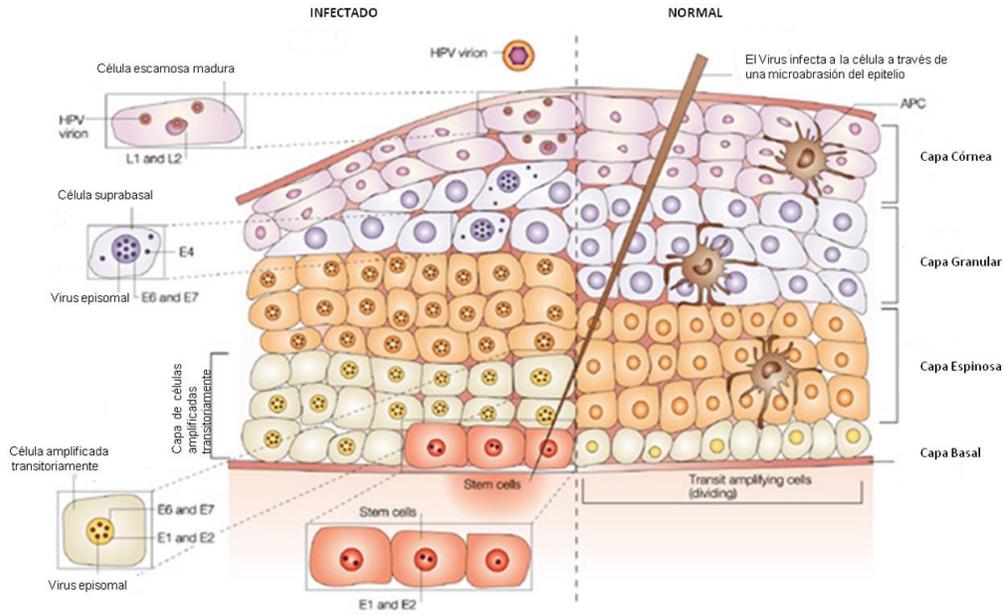


Fig. 4 Ilustración del ciclo viral a través del epitelio. La figura muestra la expresión diferencial de los productos virales. Tomado de Frazer, I., 2004 [31].

Si la infección por el VPH es persistente el virus podría entrar en un ciclo de transformación celular en donde se da lugar a eventos como la integración del genoma viral dentro del genoma de la célula hospedera, generalmente por rompimiento del marco de lectura de la proteína E2. Esto trae como resultado una desregulación de la transcripción y síntesis de E6 y E7 las cuales quedan bajo la regulación directa de factores transcripcionales de la célula, promoviendo ventajas en el crecimiento de las células infectadas contra las sanas, por lo tanto, una activación constitutiva de la proliferación, a consecuencia de esto una transformación del epitelio siendo este el primer paso para el inicio del cáncer [32,33].

Sin embargo, el éxito de la infección radica en la capacidad de completar el ciclo viral y producir viriones; para que esto suceda es indispensable que el epitelio también lleve a cabo el proceso de diferenciación celular.

IV. Proceso de la Diferenciación Epidermal

La epidermis funciona como una barrera protectora además de tener funciones inmuno-protectoras. Estas funciones están dadas debido a su delicada organización en epitelio escamoso multi-estratificado, el cual es generado por los queratinocitos en un proceso altamente regulado de diferenciación denominado cornificación o diferenciación terminal epidermal [34]. La capa interior o capa basal está formada por células cuboidales y es la capa encargada de la proliferación y renovación del epitelio. Conforme se dan los procesos de división celular, un porcentaje de células hijas va migrando a través de las diferentes capas y sufriendo subsecuentes pasos de diferenciación (capa espinosa y granular), hasta llegar a la diferenciación terminal que corresponde a la última capa de estratificación. Aquí se encuentran células aplanadas y enucleadas (corneocitos), las cuales van siendo liberadas por exfoliación y continuamente reemplazadas por células de estratos inferiores [35].

A. Estados de la Diferenciación Epidermal

Capa Basal. Siendo que el tejido epitelial se encuentra en constante proceso de renovación, requiere de un alto grado de organización que permita una correcta tasa de recambio celular, al igual que en otros tejidos la homeostasis epidermal está asegurada por una población de células madre (troncales) somáticas residentes, las cuales persisten a través de la vida de cada individuo y se localizan en la capa basal. Estas células son relativamente indiferenciadas y tienen una alta capacidad de auto-renovación, así como un gran potencial proliferativo [36].

Dentro de esta población de células se encuentran caracterizadas tres subpoblaciones clasificadas según su localización, potencial mitótico y propiedades de adhesión: (1) Células troncales, las cuales por un proceso de división celular dan origen a dos células hijas una de

ellas se mantiene como progenitora y la otra se denomina célula amplificada transitoriamente (2), éstas a diferencia de las primeras se limitan a pocos eventos de división celular y están destinadas a la diferenciación; por último (3) las células post-mitóticas, las cuales ya iniciaron un programa de diferenciación y su proceso de división celular es casi nulo [37,38].

Los queratinocitos de la capa basal que se encuentran en estado proliferativo se pueden distinguir claramente de las células suprabasales ya que presentan patrones específicos como uniones intercelulares tipo desmosomas y uniones adherentes. Después de un limitado número de divisiones mitóticas las células de la capa basal salen de este ciclo y se comprometen a diferenciación.

Capa Espinosa. La primera consecuencia de este cambio celular es la regulación a la baja de algunas proteínas como las integrinas; también se pierden los contactos con la matriz extracelular que permitan la migración a través del epitelio. Por otra parte comienza la expresión de queratinas como la queratina 1 y 10 (K1 y K10) [39]. Además comienzan a presentarse cambios morfológicos como la formación de filamentos agregados en el citoesqueleto llamados tonofilamentos [40], además del incremento en la expresión de desmosomas. Al final del proceso de maduración de los espinocitos se expresan proteínas de envoltura como la involucrina, y algunos aminoácidos como la glutamina y la lisina son depositadas en la membrana plasmática [41].

Más hacia la superficie del epitelio se encuentra la *Capa Granular*. En esta capa están presentes células granuladas. Este estrato contribuye a formar una barrera antimicrobiana y de defensa para el epitelio [42]. Finalmente y siendo la zona más expuesta del epitelio se forma la *Capa Córnea*. Donde las células mueren y se liberan mediante descamación [43].

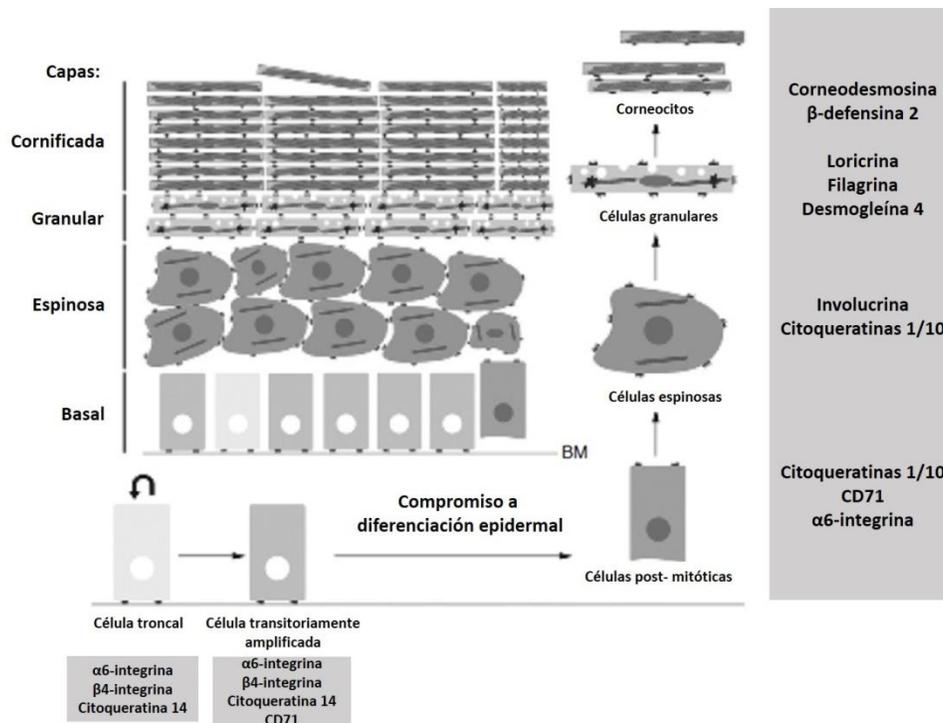


Fig. 5 Representación esquemática del proceso de Diferenciación Epitelial, así como de los cambios morfológicos que sufren las células durante cada evento de diferenciación. En el recuadro gris (derecha) se observa el patrón de expresión proteica característico de cada estrato celular. Tomado de Pasquiarello, N., et al., 2009 [35].

Además de las características morfológicas de las células epiteliales, durante el proceso de diferenciación estas se pueden distinguir en base a la expresión de ciertos genes, cuyos productos proteicos sirven como marcadores diferenciales (Fig. 5). La expresión diferencial se debe principalmente a modificaciones epigenéticas y a factores transcripcionales que activan promotores de genes implicados en la regulación de la diferenciación epitelial.

V. Factores que regulan el proceso de Diferenciación

Existen múltiples mecanismos que pueden dirigir un programa de diferenciación celular. Uno de estos involucra la metilación del DNA, que es regulada por enzimas DNA metiltransferasa (DNMT), las cuales adicionan un grupo metilo a residuos de citosinas en zonas

del DNA denominadas islas CpG. Estas islas se encuentran altamente metiladas en células jóvenes a diferencia de tejidos adultos que generalmente están libres de grupos metilos; este patrón de metilación se mantiene de manera inherente de una generación celular a otra [44].

Otro mecanismo de regulación está dirigido por factores de transcripción; existe evidencia que muestra la especificidad de algunos factores transcripcionales y su regulación en secuencias promotoras de genes que permiten la activación de vías de señalización para eventos de diferenciación. Por ejemplo la comunicación cruzada entre Notch1 y p63 para la regulación de la auto-renovación y la diferenciación del epitelio. Se sabe que p63 reprime la expresión de Notch1 en capas poco diferenciadas y que esta represión se abate en estratos superiores donde Notch1 induce arresto celular por inducción de la expresión de p21 [45], esto da como resultado un compromiso de diferenciación epidermal temprano, previniendo la expresión de marcadores de diferenciación terminal [46,47].

Además se ha reportado que la ausencia de Notch1 en células de la capa basal y de capas suprabasales permite la expresión de las proteínas de proliferación Ki67, queratina 14, integrina β 1 e integrina β 4 [45].

También existen reguladores para el mantenimiento de la proliferación y de las células troncales en el epitelio; tal es el caso de la isoforma de p63 denominada Δ Np63, la cual se encuentra predominantemente expresada en epidermis, mucosa oral, tracto urogenital y próstata [48]. Se ha demostrado que Δ Np63 actúa como un represor transcripcional en promotores génicos de proteínas relacionadas con diferenciación como p21 y 14-3-3 σ [49], favoreciendo así un estado de auto-renovación importante para el epitelio.

VI. Herramientas de expresión génica

Como hemos observado cuando se estudian procesos virales en donde se requiere de un fenómeno de diferenciación celular como en el caso de los papilomavirus es muy importante no solo seleccionar un modelo celular de estudio adecuado, además debemos identificar las herramientas más eficientes para la expresión del gen de interés. Actualmente una de las estrategias más utilizadas para la expresión de genes o de productos nucleotídicos en células eucariontes y evaluar sus efectos, es a través de la infección con vectores virales. Estos sistemas tienen ventajas sobre las transfecciones con DNA plasmídico.

Dentro del grupo de los vectores virales podemos encontrar los adenovirus, los virus adeno-asociados y los retrovirus [50-52], los cuales pueden utilizarse dependiendo de los requerimientos de expresión y de las condiciones de las células blanco. Los vectores retrovirales tienen alta capacidad codificante y expresión génica estable debido a su integración en el genoma de la célula hospedera; además su transducción en células quiescentes ha dado la ventaja de trabajar con ellos en cultivos celulares en proceso de diferenciación como neuronas [53], células de retina [54] y hepatocitos [55]. Además se pueden generar líneas celulares que expresen establemente el gen que se desea evaluar.

ANTECEDENTES

Como ya se mencionó existe basta información acerca del mecanismo de regulación que ejerce la proteína E2 sobre el genoma viral, por ejemplo, la importancia que tiene durante la replicación y su interacción con la helicasa E1 [25,56], o la regulación negativa/positiva durante la transcripción de las proteínas oncogénicas E6/E7 [57], además de las numerosas interacciones con proteínas celulares que permiten una correcta segregación del genoma viral y por lo tanto una persistencia de la infección [18,58].

Al mismo tiempo E2 participa en la regulación de procesos celulares fundamentales como la proliferación, ya sea de manera indirecta a través de la regulación de los niveles de E6 y E7, o bien a través de la interacción con proteínas celulares[59].

Se sabe que cuando el ORF de E2 se pierde por la integración del genoma viral al celular, la expresión de E6/E7 aumenta considerablemente, lo cual disminuye los niveles proteicos de p53 y de pRb. Como consecuencia la célula infectada pierde puntos de regulación a nivel de reparación del DNA y al mismo tiempo se promueve una división celular constitutiva, ya que el factor de transcripción E2F se encuentra libre permanentemente; lo cual está directamente asociado con el inicio de la transformación celular y más adelante con la progresión a cáncer [60].

Se ha demostrado que la reintroducción de la proteína E2 de BPV a células infectadas con VPH provoca un arresto celular en la fase G1, seguido de una disminución de los productos proteicos de los oncogenes virales E6 y E7, mostrando patrones característicos de senescencia. Posiblemente esto se deba a la represión de E6/E7 ya que las células recuperan

la capacidad de responder a daños al DNA como el acortamiento de telómeros [61]. Además una fracción de estas células que expresan E2, son dirigidas a apoptosis [62].

E2 puede llevar a apoptosis a las células independientemente de si estas han sido infectadas o no por VPH, mediante dos vías: la primera es independiente de p53 e involucra la regulación y represión de los oncogenes E6/E7 permitiendo así el restablecimiento de las proteínas celulares p53 y Rb [62]; y la segunda es a través de p53, ya que E2 interactúa directamente con esta proteína y con la proteína co-activadora CBP la cual participa en apoptosis dependiente de p53 [63,64].

Aunque la proteína E2 de todos los papilomavirus comparten cierta homología, existen diferencias en su habilidad de interactuar con proteínas de la célula hospedera, y por lo tanto en la manera en que afectan procesos celulares.

Por ejemplo, las proteínas E2 de los VPH de bajo riesgo como E2VPH11/VPH6 son incapaces de inducir apoptosis dependiente de p53, a diferencia de las proteínas E2 de VPH de alto riesgo (VPH16) [65], debido entre otras cosas, a las diferencias que se presentan en su localización celular. Las proteínas E2 de los VPH de bajo riesgo son predominantemente nucleares, mientras que las proteínas de los VPH de alto riesgo como E2VPH16 se localizan tanto en núcleo como en citoplasma, ya que contienen una secuencia de exporte nuclear inexistente en proteínas E2 de bajo riesgo [66].

Eventos como apoptosis, senescencia y proliferación celular han llevado a diferentes grupos de investigación a interesarse por los procesos de diferenciación que pudieran ser promovidos por proteínas virales como E2, ya que un punto crítico para el inicio de este fenómeno es un arresto en el ciclo celular, seguido de la expresión de genes relacionados con diferenciación

temprana. Si estos genes no son expresados, la célula podría quedarse en un estado de senescencia irreversible y más tarde llegar a un estado de inmortalización o apoptosis [67,68].

Una de las aproximaciones experimentales en estos estudios ha sido el uso de líneas celulares inmortalizadas provenientes de carcinomas [69-71], o líneas de queratinocitos inmortalizados de diferentes tejidos [72-74].

Por ejemplo; Burns *et al* demostraron que células (VPH-) en las que se ha expresado E2VPH16, muestran morfología típica de diferenciación, elongamiento celular e inicio de colonias en multicapas, incluso en medio libre de calcio; además de presentar marcadores de diferenciación como involucrina, filagrina y citoqueratinas 1 y 10 [68].

También se han mostrado altos niveles de apoptosis, debido a la interacción entre la región carboxilo terminal de E2VPH16 con p53, fenómeno observado por el grupo de Parish, donde utilizando como modelo la línea celular HeLa (VPH18) encontraron que la proteína E2VPH16 es capaz de dirigir las células a apoptosis [65].

Otros reportes también muestran procesos de diferenciación celular inducidos por E2 a través de su asociación con factores de transcripción implicados en los cambios de patrones de expresión celular, por ejemplo C/EBP y AP-1.

Una isoforma de C/EBP (C/EBP β) se expresa a niveles bajos en las células de la capa basal localizada principalmente en citoplasma, en el estrato superior (capa espinosa) se expresa fuertemente y se localiza en el núcleo celular y por último C/EBP α se expresa en la diferenciación terminal de queratinocitos [75,76].

En papilomas escamosos C/EBP β y C/EBP α se encuentran en la capa suprabasal de manera reducida [76], cuando existe una infección por VPH se observa que las proteínas E2 de los

tipos VPH18 y VPH8 cooperan de manera positiva con C/EBP β para activar promotores de genes que participan en la diferenciación de queratinocitos como la involucrina, trabajando como un co-activador de la transcripción en células RTS3b (VPH-) y C33A (VPH-) [77]. Interesantemente C/EBP α está involucrado en la activación del promotor de p21, cuyo producto proteico participa en el proceso de diferenciación en queratinocitos [78-81].

Por otra parte se han encontrado sitios de unión específica para E2 en el promotor de la β 4-integrina y se ha demostrado que la proteína viral regula negativamente su expresión. Esta proteína participa también en procesos de diferenciación ya que es la encargada de que los queratinocitos se anclen a la matriz extracelular [82].

Al parecer esta regulación negativa por E2 posibilitaría que las células infectadas establezcan contacto con células transitoriamente amplificadas en la capa basal, asegurándose que el virus no solo se replique sino que la célula se comprometa a un proceso de diferenciación que el virus requiere para su maduración [83].

Una de las limitantes para el estudio de la participación del VPH en el proceso de diferenciación epidermal ha sido el modelo de estudio, ya que es complicado establecer un sistema de estratificación celular que permita estudiar paso a paso el progreso de la infección.

Un acercamiento a este fenómeno ha sido la separación de subpoblaciones celulares equivalentes a células de la capa basal que es donde se inicia la infección por VPH y donde se expresa por primera vez la proteína E2.

Estas estrategias se han probado en cultivos primarios y en líneas celulares transformadas, a través de la identificación de receptores de membrana como desmogleina-3, integrinas α 6, β 1, la molécula CD71 (receptor de Transferrina), la presencia de la molécula p63 en el

núcleo, o características propias de su metabolismo, como la sobre-expresión de la enzima Aldehído deshidrogenasa (ALDH), o de las bombas ABCG [84-87]. Para seleccionar la estrategia correcta es necesario conocer algunas características de los modelos de estudio.

Por ejemplo:

I. Población Colateral (PC)

Esta estrategia se basa en la exclusión del colorante Hoechst 33342 por la alta expresión de los transportadores de membrana de la familia ABC (ATP-binding cassette) que son un conjunto de proteínas con la capacidad de unirse al ATP y usarlo como fuente energética para el transporte endógeno o exógeno de moléculas a través de la membrana celular.

Dicho colorante es usado de manera normal para el estudio de la distribución de las células dentro del ciclo celular, sin embargo Goodell et al., [88] observaron que al teñir células de la médula ósea con Hoechst 33342 y evaluarlas simultáneamente a 573 nm (rojo) y 450 nm (azul) en un citómetro de flujo, se puede observar en la gráfica una pequeña población que no se tiñe, la cual representa aproximadamente el 0.1% y a la cual se le dió el nombre de población colateral (PC). Se ha demostrado también que la exclusión del Hoechst por la PC involucra la actividad del transportador ABC MDR1 (transportador de resistencia multidroga

1) ya que al agregar un inhibidor de este transportador (verapamilo) la PC prácticamente desaparece.

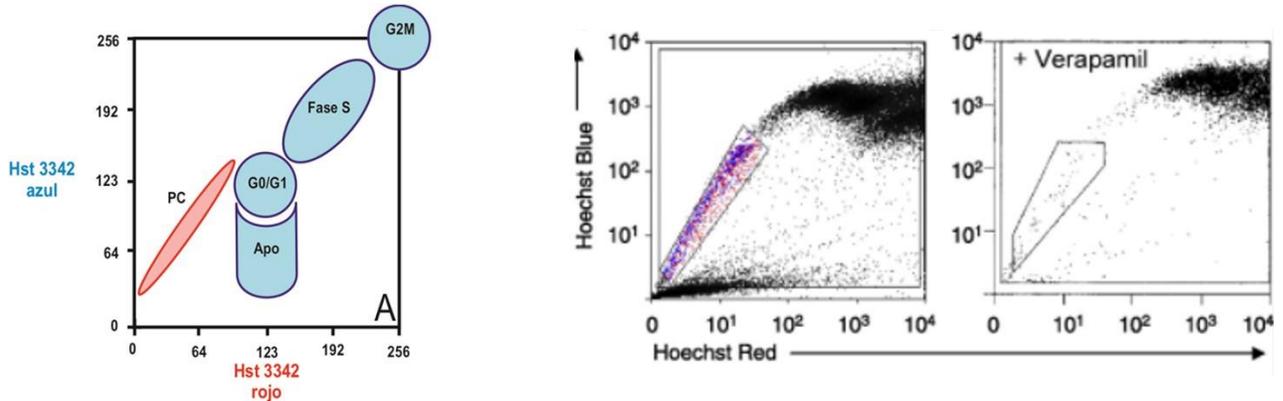


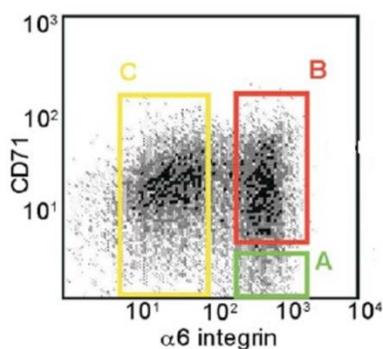
Fig. 6. Población colateral. Izq. Diagrama que muestra la distribución de las células teñidas con Hoechst-33342 por citometría de flujo. Der. Ejemplo de identificación de la población colateral. Tomado de Goodell, M. A., et al., 1996 [88].

Existe un alto número de líneas celulares que contienen una pequeña población celular, muy parecida a células troncales, con capacidad proliferativa ilimitada y resistente a drogas citotóxicas y a radiación (C6, MCF-7, U-20S, SaOS-2 y HeLa, entre otras), y que esta población colateral (PC) podría ser la responsable de las recaídas en los tratamientos contra diferentes tipos de cáncer [89].

II. *Expresión de receptores de superficie celular*

La capa basal del epitelio es una zona con poblaciones heterogéneas en donde se encuentran células tanto en estado proliferativo como en estado de diferenciación. Las células de la capa basal están adheridas a la matriz extracelular vía integrinas y la disminución de estas regula los procesos de diferenciación [90,91]. Se ha descrito que queratinocitos primarios con niveles elevados de desmogleina 3 (Dsg3) presentan características de células progenitoras y coinciden con la elevada expresión de $\alpha 6$ -integrina y con una disminución del receptor de

transferrina CD71 [84]. De esta manera Schluter y colaboradores desarrollaron una técnica de separación de tres subpoblaciones en queratinocitos primarios, combinando la identificación de los marcadores $\alpha 6$ -integrina/CD71 por citometría de flujo. De esta manera identificaron las tres subpoblaciones: $\alpha 6$ -integrina^{dim} (células post-mitóticas), $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{bri} (células transitoriamente amplificadas) y $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} (células progenitoras) [84]. Además esta estrategia permite separar las células y mantenerlas metabólicamente activas para su posterior estudio.



	Cell population	Incidence	% G ₀	% S+G ₂ M
A	$\alpha 6^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{dim}}/\text{KSC}/\text{Quiescent}$	9.74±0.83	*97.85±0.23	2.35±0.09
B	$\alpha 6^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{bri}}/\text{TA}/\text{Cycling}$	45.42±0.72	**92.15±0.93	***7.68±0.99
C	$\alpha 6^{\text{dim}}/\text{ED}/\text{Differentiated}$	44.94±0.26	97.65±0.29	2.18±0.31

Fig. 7 Caracterización de queratinocitos basado en el fenotipo $\alpha 6$ -integrina/CD71. Resultado de la citometría de flujo con las tres sub poblaciones $\alpha 6$ -integrina^{dim} (células post mitóticas), $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{bri} (células transitoriamente amplificadas) and $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} (células progenitoras) y los porcentajes de abundancia relativa celular. Tomado de Schluter, H., et al., 2011 [92].

III. Modelos de estudio

Cuando se quiere analizar un fenómeno celular es requisito indispensable la correcta elección del modelo de estudio y aunque es muy común el uso de líneas celulares transformadas, estas no siempre proporcionan información que se relaciona satisfactoriamente con los procesos celulares que suceden en la progresión de CaCU.

Existen reportes sobre la expresión génica de diferentes líneas celulares provenientes de carcinomas cervicales, en los que se ha demostrado que una de las líneas celulares que menos se correlaciona con las características de un cáncer cérvico-uterino es HeLa, ya que cuando se cultiva en monocapa presenta un patrón de expresión muy diferente al de biopsias de cérvix con cáncer. Por el contrario, las líneas celulares C4-I y C4-II presentan la correlación más alta comparada contra biopsias de cáncer cervical [93]. Este estudio también mostró que líneas celulares C4-I, C4-II, CaSki y SiHa, mantienen alta correlación con muestras de CaCU en las vías de proliferación celular [93].

Estos reportes nos indican la importancia del empleo de modelos celulares que tengan una mayor aproximación con los fenómenos naturales de estudio. Una opción alternativa es el uso de células provenientes de cultivos primarios de queratinocitos (HKc), líneas celulares de queratinocitos tempranos (HPEK o NPHK) o líneas inmortalizadas a partir de tejido epitelial (HaCaT) los cuales han sido utilizados en el estudio de las vías de señalización durante la diferenciación y estratificación del epitelio [94].

JUSTIFICACIÓN

Aunque es bien conocido que la proteína E2 del VPH participa en la regulación de distintos procesos celulares incluyendo apoptosis, proliferación y diferenciación, desconocemos si existen diferencias en la regulación de estos procesos entre proteínas de virus de alto y bajo riesgo, así como si son capaces de llevar a cabo estas funciones en las células de la capa basal del epitelio donde se inicia la infección viral.

Por lo tanto consideramos importante el análisis comparativo de procesos celulares entre las proteínas E2VPH16 (alto riesgo) y la proteína E2VPH11 (bajo riesgo) en células progenitoras de queratinocitos humanos inmortalizados.

HIPÓTESIS

La proteína E2 de VPH16 afectará de manera más significativa procesos celulares como la diferenciación de células progenitoras en comparación con la proteína E2 de VPH11.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el proceso de diferenciación celular de células progenitoras de queratinocitos humanos inmortalizados en presencia de las proteínas E2 de papilomavirus de alto y bajo riesgo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Demostrar que la línea celular HaCaT presenta diferentes subpoblaciones a través de los marcadores $\alpha 6^{int}/CD71$.
2. Evaluar las características de troncalidad de la sub-población $\alpha 6^{int}^{bri}/CD71^{dim}$ de la línea celular HaCaT.
3. Expresar las proteínas E2 VPH16 y E2 VPH11 en la línea celular HaCaT a través de un sistema lentiviral.
4. Evaluar la abundancia relativa de las poblaciones $\alpha 6^{int}/CD71$ en la línea celular HaCaT antes y durante la expresión de las proteínas E2 de alto y bajo riesgo.
5. Evaluar las características de troncalidad de las poblaciones $\alpha 6^{int}^{bri}/CD71^{dim}$ y no $\alpha 6^{int}^{bri}/CD71^{dim}$ antes y durante la expresión de E2 VPH16 y E2 VPH11.
6. Evaluar el proceso de diferenciación temprana en la línea celular HaCaT antes y durante la expresión de las proteínas E2 VPH16 y E2 VPH11.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Las células HEK293-FT (ATCC) fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100µg/mL) a 37°C en una atmósfera humidificada a 5% de CO₂.

Las células HaCaT (donadas generosamente por el Dr. Norbert Fusenig) fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100µg/mL) a 37°C en una atmósfera humidificada a 5% de CO₂.

Generación del Sistema Lentiviral

Para generar las partículas lentivirales fue necesario 48 hrs antes de la co-transfección sembrar cajas P100 con 3 X 10⁶ células HEK293-FT (las células deben estar a un 80-85% de confluencia en el momento de la transfección). Se retiró el medio y se lavaron con medio OPTIMEM. Las mezclas de transfección contenían: 7.5 µg de plásmido pMDG.2, 2.5 µg de plásmido psPAX2, 3.0 µg de plásmido pSIN- (VPH16-E2, VPH11-E2 o Vac) y 36 µl de Lipofectamina resuspendidos en 3ml de medio OPTIMEM. La mezcla de transfección se agregó gota a gota a las cajas de cultivo celular, las cuales se incubaron 24 hrs a 37°C en una atmósfera humidificada a 5% de CO₂. Pasado el tiempo de transfección se retiró el medio y las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamine (2 mM), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100µg/mL) y 10 mM de butirato de sodio. Se incubaron 48 hrs a 37°C en una atmósfera humidificada a 5% de CO₂.

Para la purificación de partículas lentivirales se colectó el medio de cultivo y se centrifugó a 4 °C a 500g durante 15 min para empastillar el desecho celular. El sobrenadante resultante se hizo pasar por un filtro de PVDF 0.45 µm y se ultracentrifugó a 70,000g por 90 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en albumina al 0.01%, para después ser almacenada a 4°C por 24 hrs. Pasado este tiempo se dividió en alícuotas y se almacenó a -70°C.

Titulación lentiviral

Para la cuantificación de genomas virales se siguió la metodología de Carmo, et al., 2004 [95]. El primer paso fue realizar una curva patrón con el DNA control, en este caso se utilizó el plásmido pSin-eGFP-PUR linearizado para evitar la formación de estructuras secundarias y tener una correcta amplificación.

Una alícuota de lentivirus resuspendida en albumina se calentó a 75°C por 10 min para liberar el RNA. Para eliminar el DNA celular que pudo haber quedado en el sobrenadante se agregaron 2U de DNAsa I, 4 µl de MgCl₂ 25 mM y se aforó a 100 µl con H₂O estéril antes de incubar a temperatura ambiente por 30 min. Se tomaron 5 µl de la dilución y se hizo una síntesis de cDNA utilizando cebadores al azar (“Random primers”).

El perfil térmico que se utilizó para RT-qPCR fue el siguiente:

1 ciclo de desnaturalización de 15 minutos a 95 °C; 40 ciclos de amplificación, cada uno con un período de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 62 °C y 30 segundos a 72 °C. Con una curva de disociación de 1 minuto a 60 °C y 95 °C 15 segundos.

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

JVTLenTitLP: 5' TGA GTC ACC CAC ACA AAG GA 3'

JVTLenTitRP: 5' CCA AGC TGG CCT AAC TTC AG 3'

La cuantificación de material genético viral se realizó considerando el peso molecular de las bases nitrogenadas y a partir de la curva patrón se interpolaron los valores de las partículas virales.

Generación de células HaCaT-VPH11-E2, HaCaT-VPH16-E2 y HaCaT-Vac

Células HaCaT fueron transducidas con 1 MOI de lentivirus Lenti-VPH11-E2, Lenti-VPH16-E2 o Lenti-Vac y [6 µg] concentración final de polybrene en medio DMEM 10% de SFB. Las células se incuban 24 hrs a 37°C en 5% CO₂. Pasado el tiempo de incubación se retira el medio, se lavan dos veces con PBS 1X y se agrega medio fresco a las células. La selección con puromicina inicia 48 hrs post-transfección y continua hasta que el control (células HaCaT in transducir) muere completamente.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los genes VPH11-E2, VPH16-E2, SOX2, NANOG, OCT4, B-ACTINA se realizó un ensayo de amplificación por PCR. Se prepararon reacciones de 25µl con los siguientes componentes: dNTPs [100µM], MgSO₄ [1.5mM], Buffer [1X], oligonucleótidos específicos (5pM de cada uno), 1U de enzima DNA polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen), DNA molde (1ng/µl de reacción) y H₂O hasta un volumen final de 25µl.

RT-qPCR

RNA total de las células transducidas con lentivirus fue obtenido utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la síntesis de cDNA se utilizó 1 µg de RNA. Se incubaron el RNA y 0.5µg de Oligo dT a 70°C durante cinco minutos

y se agregaron a esta mezcla: dNTPs [1.5mM] de cada uno, Buffer M-MLV (5X), 25U de RNAsin y 200U de la enzima transcriptasa Reversa M-MLV (PROMEGA). Se incubó la reacción a 42°C por 90 minutos, se dejó enfriar 5 minutos más a 4°C y el 10% del volumen total de la reacción se utilizó para la qPCR; ésta última se realizó con utilizando el estuche comercial ABSOLUTE qPCR SYBR Green Mix (Abgene) siguiendo las instrucciones del fabricante. La evaluación de los niveles de mRNA del gen constitutivo actina fue utilizado para la normalización. La cuantificación de los amplicones fue realizada por el método de doble delta Ct ($\Delta\Delta Ct$).

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para PCR y RT-qPCR:

Nombre	Secuencia
VDCEcoE216AA Fw	5' ATTCCGAATTCATGGAGACTCT 3'
VDCBamE216AA Rv	5' TTCGGGATCCTCATATAGACAT 3'
E216AA Hinge Fw	5' TTGGGGATCCGTGTTTAGCAGCAACGAAGTAT 3'
E216AA Hinge Rv	5' ATCCGAATTCTCAGTTAATCCGTCCTTTGTGTGAGCT 3'
VDCRTSOX2 Fw	5' TCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG 3'
VDCRTSOX2 RV	5' AGAGGCAAACCTGGAATCAGGA 3'
VDCRTNanog Fw	5' GCAATGGTGTGACGCAGAAG 3'

VDCRTNanog Rv 5' ATTGGAAGGTTCCCAGTCGG 3'

VDCRTOct4 Fw 5' CTTGCAAGCCCTCATTCACC 3'

VDCRTOct4 Rv 5' GGTCCGAGGATCAACCCAG 3'

Actina Fw 5' GCGGGAAATCGTGCGTGACATT 3'

Actina Rv 5' GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG 3'

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Tabla 2. Perfiles térmicos para la amplificación de genes analizados

Gen	Desnaturalización			Amplificación			Extensión		
	°C	Tiempo	Ciclos	°C	Tiempo	Ciclos	°C	Tiempo	Ciclos
				94	45''	35			
VPH11-E2	95	3'	1	62	1'	35	72	5'	1
				72	90''	35			
				94	45''	35			
VPH16-E2	95	3'	1	63	1'	35	72	5'	1
				72	90''	35			
				95	15''	40			
SOX2	95	10'	1	63.7	30''	40	72	5'	1
				72	30''	40			
				95	15''	40			
NANOG	95	10'	1	67	30''	40	72	5'	1
				72	30''	40			
				95	15''	40			
OCT4	95	10'	1	65.5	30''	40	72	5'	1
				72	30''	40			
				95	15''	40			
ACTINA	95	10'	1	62	30''	40	72	5'	1
				72	30''	40			

Secuenciación

El DNA plasmídico utilizado como molde para secuenciación se purificó por el método de fenol/cloroformo: alcohol isoamílico. Posteriormente se preparó cada reacción de secuenciación utilizando el sistema BigDye® Terminador v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Cada reacción de secuenciación consistió en 4 µl de BigDye® Premix,

2 µl de Buffer de secuenciación 5X, 2µL del oligonucleótido requerido [10pM], 500 ng del DNA molde para la secuenciación y el volumen de H₂O necesario para llevar la reacción a 20 µl totales. Las condiciones para la reacción de secuenciación fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización durante 5 minutos a 96°C; 28 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales comprendía un período de 35 segundos a 96°C, 25 segundos a 55°C y 4 minutos a 60°C; y finalmente 1 ciclo de extensión durante 4 minutos a 60°C. Después de la amplificación, las muestras fueron purificadas con las columnas CENTRISEP Spin Columns (Princeton Separations) y analizadas en secuenciador automático. La Tabla 1 muestra los oligonucleótidos que se utilizaron para las reacciones de secuenciación.

Detección de proteínas en fase sólida

Se obtuvieron lisados totales de células HaCaT parentales (wild type) (HaCaTwt) y HaCaT-VPH16-E2 utilizando buffer RIPA modificado (20 mM MOPS-NaOH pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 % deoxicolato de sodio, 1 % Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS) e inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Se separaron 50 µg de proteínas totales en un gel de poliacrilamida SDS 10% (SDS-PAGE), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se detectaron las proteínas con anticuerpos específicos anti-VPH16-E2, anti-citokeratina 14 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), anti-citokeratina 10 (Abcam PLC, MA, USA), anti-involucrina (Abcam PLC, MA, USA), anti-β-actina (donado generosamente por el Dr. Manuel Hernández). Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa cabra anti-ratón IgG (H+L) o cabra anti-conejo IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA). La inmunodetección se realizó utilizando el estuche comercial SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific, IL, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y las proteínas se cuantificaron con el programa computacional Image J (National Institutes of Health, MD, USA).

Identificación de Población Colateral por citometría de flujo

Se lavaron las células con solución salina D-PBS 1X, se tripsinizaron y se empastillaron por centrifugación a 500g durante 5 min, se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron en 1ml de D-PBS 1X. Se contaron las células en una cámara de Neubauer y se prepararon tubos de 1×10^6 células resuspendidas en 1.5ml. Se incubaron todas las muestras a 37 °C, durante 15 min en oscuridad y a un tubo se añadió 100 μ M de verapamilo (control negativo). Pasado el tiempo de incubación se agregaron 10 μ g/ml de reactivo Hoechst 33342 a todas las muestras excepto a un tubo (control de células sin teñir) y se incubaron en baño maría a 37 °C por 90 min. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 500g por 5 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1ml de PBS 1X en tubos de citometría. El yoduro de propidio se agregó minutos antes de la lectura en el citómetro en una concentración final de 2 μ g/ml. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta el momento del análisis de citometría.

Identificación de subpoblaciones celulares α 6int-CD71 por citometría de flujo

Siguiendo la metodología descrita por Li A., 2005 [96], se lavaron las células HaCaT con solución salina PBS 1X, se tripsinizaron y se centrifugaron a 500g durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 1ml de PBS 1X. Se contaron las células en una cámara de Neubauer y se prepararon tubos de 1×10^6 células resuspendidas en 1.5 ml de PBS 1X. Se centrifugaron a 500g durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en 100 μ l de solución de bloqueo (PBS 1X BSA 2%-SFB 2%), se incubaron 15 min a 4 °C. Nuevamente se centrifugaron a 500 g, por 5 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 200 μ l de solución de marcaje (PBS 1X BSA 1%), donde se añadieron los anticuerpos de la siguiente manera: muestra 1. Sin anticuerpos (células control sin teñir), 2. PE-anti- α 6integrina (2.0 μ l), 3. PE-CY5-anti-CD71 (0.8 μ l) y 4. PE-anti- α 6integrina (2.0

μl) / PE-CY5-anti-CD71 (0.8 μl) Tinción doble. Se incubaron 45 min en hielo protegidos de la luz y se agitaron con delicadeza cada 15 min para evitar que se precipitaran las células. Pasado el tiempo de incubación las células se lavaron 2 veces en 1ml de PBS 1X con centrifugación a 500g por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 500 μl de PBS 1X en tubos de citometría y se almacenaron en hielo para su análisis en el FACS.

Ensayos de auto-renovación

Utilizando la separación de células por citometría de flujo se obtuvieron las subpoblaciones de células HaCaTwt $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} y No- $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} y se sembraron en cajas de 6 pozos con 4.5×10^3 células/pozo y se cultivaron bajo condiciones normales. Después de 10 días de cultivo, las células se analizaron por citometría de flujo bajo el fenotipo $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} y No- $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim}, se separaron nuevamente ambas poblaciones y se sembraron en cajas de 6 pozos con 4.5×10^3 células/pozo. Se cultivaron en condiciones normales durante 10 días y se evaluó la capacidad de auto-renovación de cada subpoblación.

Formación de colonias

Utilizando la separación de células por citometría de flujo se obtuvieron las subpoblaciones de células HaCaTwt $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} y No- $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} y se sembraron en cajas de 6 pozos con 4.5×10^3 células/pozo y se cultivaron bajo condiciones normales. Después de 7 días de cultivo, las células se analizaron por su capacidad de formar holoclonas o paraclonas, se contaron y observaron en un microscopio invertido evaluando el porcentaje de cada tipo de clona. Este ensayo se realizó durante dos rondas de enriquecimiento de cada subpoblación.

Ensayos de Diferenciación

Células HaCaTwt y HaCaT-VP16-E2 se sembraron y cultivaron a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 24 hrs. Los cultivos celulares se lavaron dos veces con PBS 1X y se incubaron con medio D-MEM suplementado con cloruro de calcio (5 mM CaCl₂) o ácido retinóico (1 μM AR) (Sigma-Aldrich, MO, USA) durante 5 días. Después del tratamiento las células se cosecharon y se analizaron por citometría de flujo analizando el fenotipo α6-integrina-CD71, para comparar el estado de diferenciación entre HaCaTwt y HaCaT-VP16-E2; o bien las células se cosecharon y se prepararon lisados para el análisis de los niveles de diferentes marcadores de diferenciación.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism[®] v6.0 (GraphPad Software). Los resultados están representados por al menos tres experimentos independientes. Se realizó prueba de ANOVA para determinar la significancia estadística entre dos grupos el cual está representado como $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Análisis y determinación del modelo de estudio

Como se mencionó, la proteína E2 de los papillomavirus se expresa de manera temprana durante la infección en las células cervicales, por lo que su expresión abarca desde las células de la capa basal hasta células de la capa espinosa. De esta manera, fue importante seleccionar el modelo de estudio más adecuado que permitiera el análisis de la participación de E2 en el inicio de la infección del VPH.

I. Queratinocitos progenitores HPEK.

El primer modelo celular que se probó fueron las células HPEK, que es una línea celular de queratinocitos tempranos y que se ha utilizado para diversos estudios de proliferación y diferenciación epidermal [97,98]. Se realizó la determinación de potenciales células con características de troncalidad a través de la técnica descrita por Goodell de población colateral, la cual se muestra en la Fig. 8.

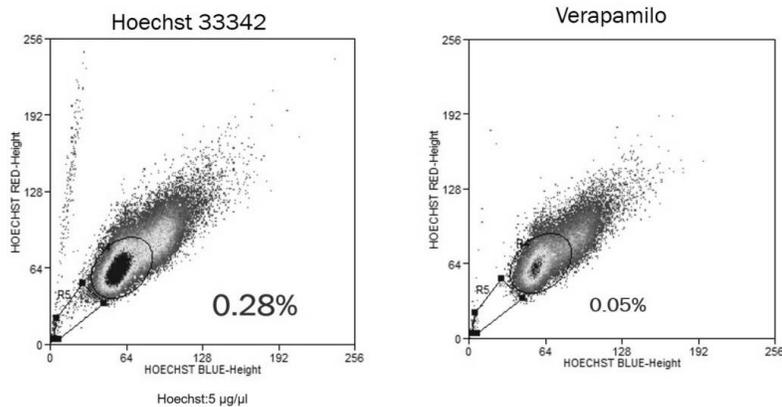


Fig. 8 Ensayo de citometría de flujo para identificar la Población Colateral (PC) en la línea celular HPEK. En el panel de la izquierda corresponde a la tinción con Hoechst 33342. El panel de la derecha muestra el ensayo control con en el que las células fueron tratadas con el inhibidor verapamilo. Todas las imágenes mostradas son ensayos representativos de al menos tres experimentos independientes.

Aunque estos resultados permiten identificar una Población Colateral en queratinocitos, existen reportes que indican que las células de la población colateral en estas células no tienen las características “stem-like” de queratinocitos que se obtienen mediante otras técnicas de separación [99]. Otro de los inconvenientes de utilizar estas células, es el limitado número de pases para que mantengan características de células progenitoras, lo que representa una condicionante para ser un modelo de estudio que expresara de manera estable los genes de interés de nuestro estudio durante un tiempo prolongado. Por estas razones decidimos caracterizar otra línea celular y utilizar una estrategia alternativa de separación de células “stem-like”.

II. Línea celular inmortalizada de queratinocitos HaCaT.

La línea celular HaCaT es una línea celular inmortalizada de queratinocitos VPH- y que ha sido ampliamente utilizada para simular tejidos epiteliales [100,101]. Para determinar en esta línea celular la existencia de una subpoblación con características de troncalidad, decidimos

utilizar la técnica de Schluter H, *et al.* [92] identificando los receptores de membrana $\alpha 6$ -integrina y el receptor de transferrina CD71.

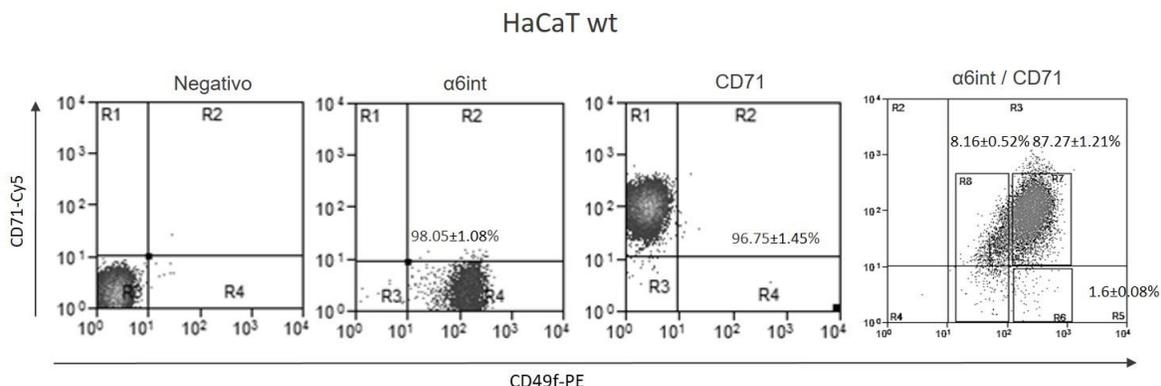


Fig. 9 Caracterización de la línea celular HaCaT con los marcadores anti- $\alpha 6$ -integrina y anti-CD71. Las imágenes mostradas son ensayos representativos de al menos tres experimentos independientes.

Como podemos observar la línea celular HaCaT presenta tres subpoblaciones celulares semejantes a las detectadas en queratinocitos progenitores: $\alpha 6$ -integrin^{dim} (8.16 ± 0.52 %) que corresponde a “células diferenciadas tempranas”, $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{bri} (87.27 ± 1.21 %) que corresponde a “células transitoriamente amplificadas” y $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} que es la población menos abundante (1.16 ± 0.08 %) y que aparentemente correspondería a “células progenitoras”.

2. Caracterización de las subpoblaciones $\alpha 6$ int-CD71

Una vez elegido a las células HaCaT como el modelo de estudio y la estrategia experimental de inmunotinción de $\alpha 6$ -integrin-CD71 para separar las subpoblaciones celulares, se eligieron tres metodologías para caracterizarlas.

I. Ensayo de auto-renovación.

Este ensayo permite identificar células que son capaces de dividirse simétrica y asimétricamente para auto-renovar una población con las mismas características de la célula madre y para reconstituir el fenotipo de su linaje celular. Es una técnica de citometría donde se separan las células y se crecen bajo las mismas condiciones de las células parentales y después de varios días se analiza nuevamente el perfil poblacional [85,102,103].

Para asegurarnos de realizar una correcta separación celular realizamos un primer ensayo de pureza para determinar que las células que se obtienen a través de esta estrategia tienen las características que buscamos. Cuando la prueba arrojó un porcentaje de pureza mayor del 95%, continuamos la separación de las subpoblaciones. El siguiente esquema muestra el proceso del análisis de pureza.

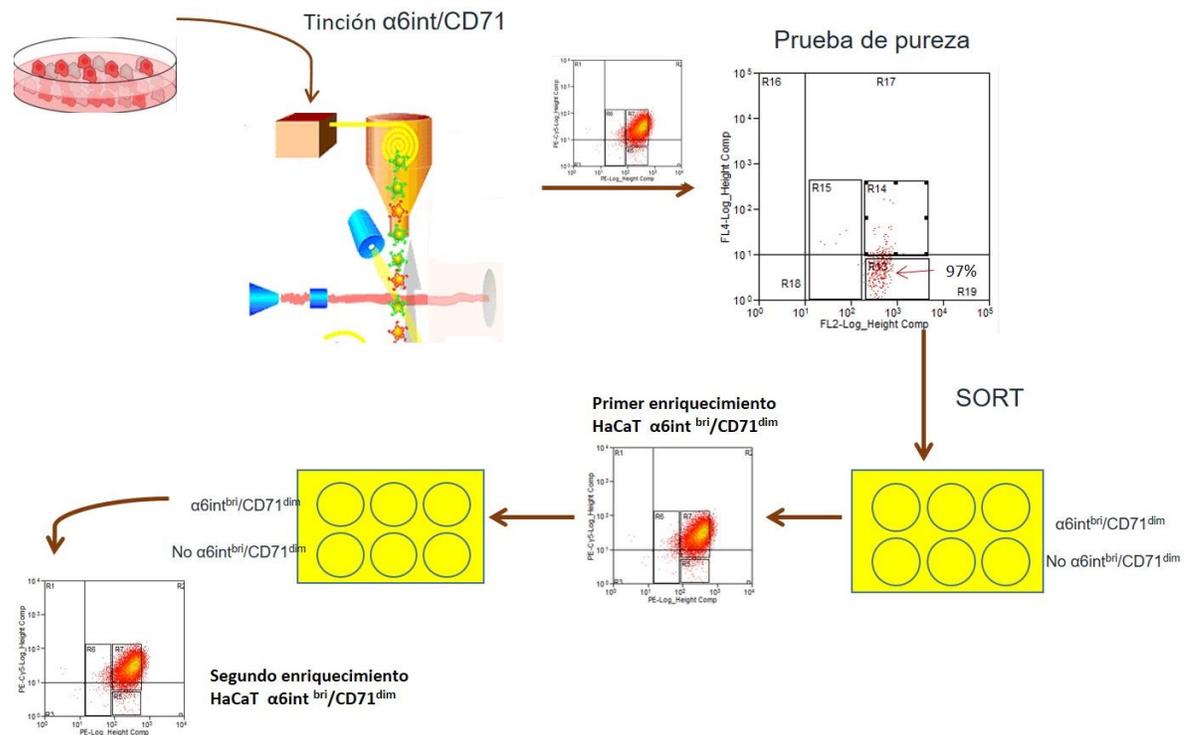


Fig. 10. Estrategia para determinar la pureza de las subpoblaciones celulares mediante citometría de flujo y el enriquecimiento de la población $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} tras dos rondas de separación.

Como se observa en la Fig. 11, después de dos rondas de separación de la subpoblación $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} son capaces de restaurar el fenotipo original e incrementar la población del $1.16 \pm 0.08 \%$ al $3.9 \pm 0.33 \%$, contrario a lo que sucede con la combinación de las subpoblaciones $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{bri} + $\alpha 6$ -integrin^{dim} que a partir de ahora llamaremos No- $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim}; estas células tras cada ronda de separación reconstituyen el fenotipo de célula transitoriamente amplificadas y diferenciadas pero son incapaces de restaurar las células progenitoras. Esto quiere decir que las células $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} presentan la habilidad de autorenovación característico de células progenitoras [92].

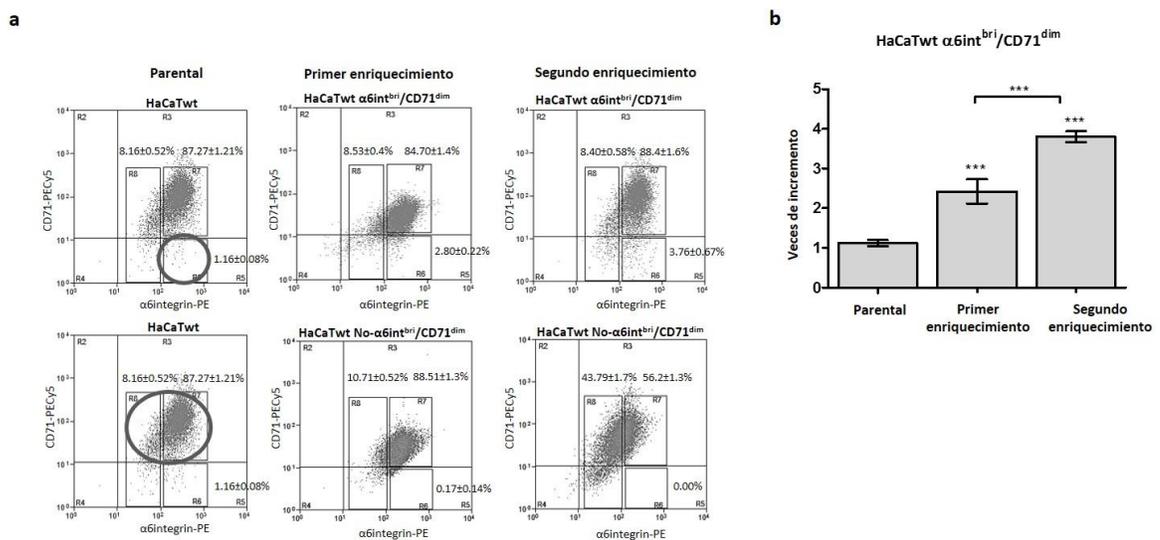


Fig. 11. Ensayo de auto-renovación en la línea celular HaCaT. **a)** Ensayo de citometría de flujo. En la parte superior se muestra el enriquecimiento de la población $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim}. En el panel inferior la separación de la población No- $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} y como esta no es capaz de enriquecer la subpoblación $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim}. **b)** Análisis estadístico del ensayo de auto-renovación tras dos rondas

de separación. Todas las imágenes mostradas son ensayos representativos de al menos tres experimentos independientes.

II. Ensayo de formación clonal.

El objetivo de este ensayo es analizar la capacidad de una célula de dividirse simétrica o asimétricamente y formar clonas [104]. Existen tres tipos de clonas: las holoclonas, que se forman a partir de una célula progenitora con características de troncalidad que se divide simétricamente formando células de diámetro más pequeño, con divisiones lentas en comparación con la formación de otras clonas y como resultado son clonas pequeñas; la meroclonas, que se forman por la división sucesiva de una célula comprometida a la diferenciación y que tienen rondas de división simétrica y rondas de división asimétrica, dando como resultado clonas con células pequeñas y redondeadas y en la periferia células ligeramente alargadas; y las paraclonas que se forman por la división de una célula diferenciada temprana, estas clonas son alargadas y no tienen una forma bien definida además la tasa de división es más acelerada que las holoclonas [105]. Para realizar este ensayo separamos 50,000 células de cada subpoblación, $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} y las No- $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim}, en placas de 6 pozos y se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo durante 10 días; pasado este tiempo se contaron y analizaron según su morfología en holoclonas y paraclonas.

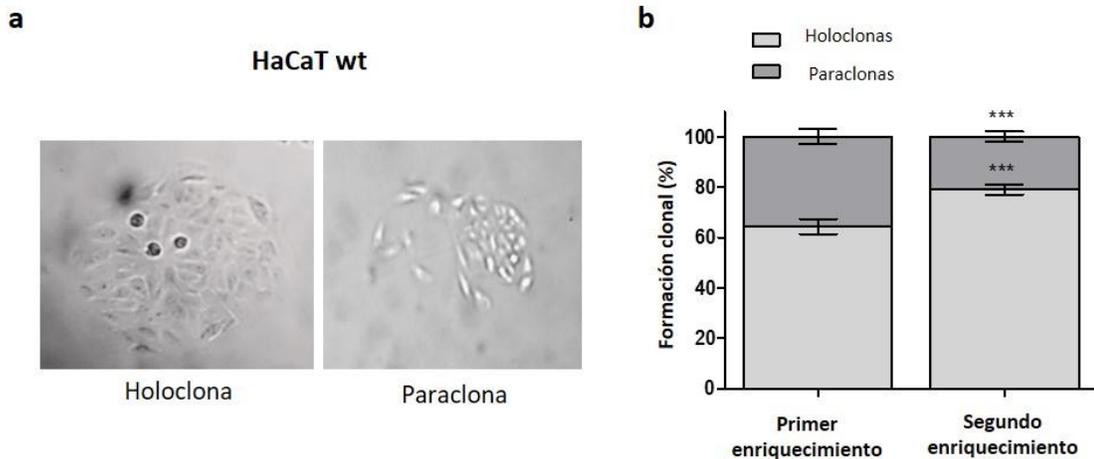


Fig. 12 Ensayo de formación clonal. **a)** Micrografías de las clonas formadas de la separación de la subpoblación $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim}. **b)** Análisis estadístico del número de holoclonas y paraclonas que forman las células $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim}.

La Fig. 12 muestra que las células HaCaT $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} son capaces de formar clonas con las características antes mencionadas al igual que lo reportado en cultivos primarios de queratinocitos [105]. Las células $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} tienen la capacidad de formar un mayor número de holoclonas en ambos enriquecimientos en comparación con la formación de paraclonas (62 ± 2 vs. 38 ± 3.5 y 68 ± 5.5 vs. 32 ± 3.5) y como se esperaba las células No- $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} solo son capaces de formar paraclonas (2 vs. 98 ± 1 and 0 vs 100).

III. Análisis de la expresión de marcadores de troncalidad.

Es bien sabido que las células con características de troncalidad, independientemente de si se trata de células normales o cancerosas, expresan factores transcripcionales distintos a células comprometidas a la diferenciación; entre ellos *SOX2*, *NANOG* y *OCT4* [106-108]; por esta razón decidimos analizar la expresión de estos genes a nivel de mRNA. Se separaron por citometría de flujo las subpoblaciones $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} y No- $\alpha 6$ -

integrin^{bri}/CD71^{dim} y se extrajo RNA total, realizándose una RT-qPCR para los tres marcadores los cuales fueron normalizados contra actina.

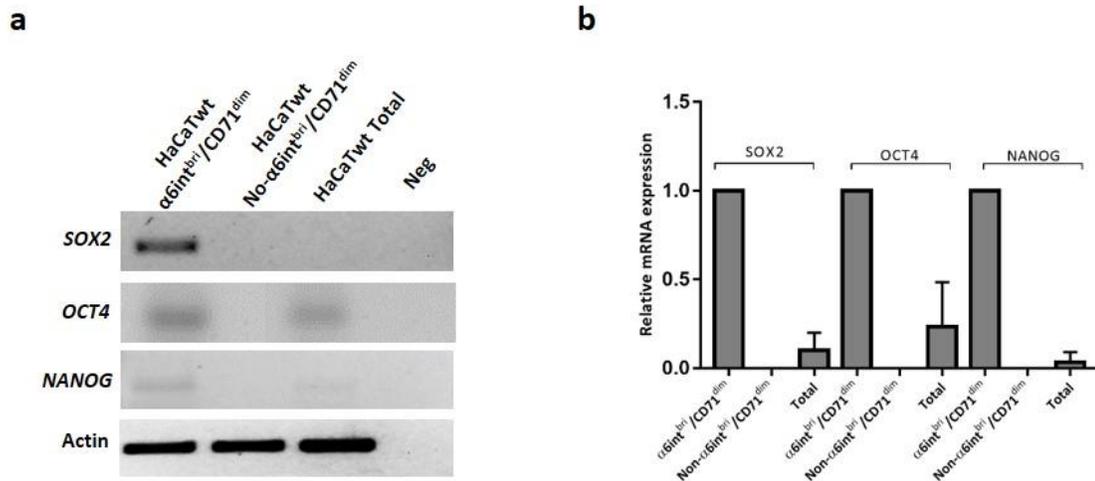


Fig. 13 Expresión de marcadores de troncalidad *SOX2*, *OCT4*, *NANOG*. **a)** Expresión de marcadores de troncalidad en las diferentes subpoblaciones celulares en ensayo por RT-PCR. **b)** Expresión de marcadores de troncalidad en las diferentes subpoblaciones celulares en ensayo por RT-qPCR.

Como se esperaba, las células α6-integrin^{bri}/CD71^{dim} así como la población celular total expresan los tres marcadores de troncalidad, mientras que en las células No-α6-integrin^{bri}/CD71^{dim} su expresión está ausente.

El análisis de estos tres ensayos nos dieron la certeza de que las células α6-integrin^{bri}/CD71^{dim} tienen características de células progenitoras y que en conjunto con la subpoblaciones α6-integrin^{bri}/CD71^{bri} y α6-integrin^{dim} son un buen modelo para estudiar la participación de las proteínas VPH16-E2 y VPH11-E2 en la diferenciación celular.

3. Generación, propagación, purificación y titulación de lentivirus de tercera generación.

I. Diseño de plásmidos de expresión

Utilizando como molde el plásmido pSin-EF2-Sox2-Pur (Addgene, MA, USA), se eliminó el marco de lectura del gen *SOX2* mediante restricción con las enzimas EcoRI y BamHI y se clonó el ORF de VPH16-E2AA o VPH11-E2, para generar los plásmidos pSin-EF2-E216-Pur y pSin-EF2-E211-Pur. Se elaboró un tercer plásmido que no contenía gen de expresión y que fue ligado con las mismas enzimas EcoRI y BamHI denominado pSin-EF2-VAC-Pur.

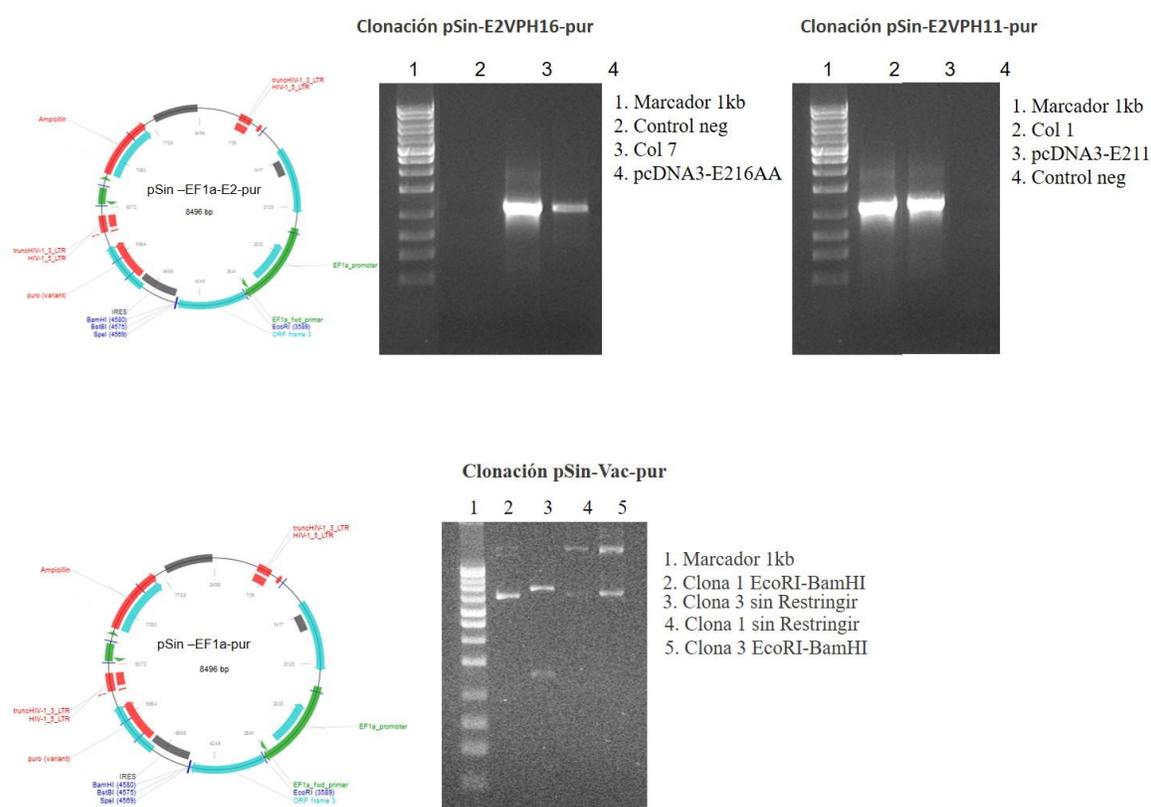


Fig. 14 Clonación de genes de expresión VPH16-E2 y VPH11-E2 en plásmidos pSin-pur así como el plásmido pSin-pur religado como control vacío.

Transducción y expresión de los genes VPH16-E2 y VPH11-E2

Para determinar el momento más temprano en la expresión de los genes virales VPH16-E2 y VPH11-E2 se realizó una cinética de evaluación de sus niveles de mRNA cada 24 hrs durante

10 días. Las células HaCaT se infectaron en todos los casos con 1 MOI y fueron seleccionadas con 0.25 g/mL de puromicina. Se compararon con células HaCaT sin infectar las cuales para el día 5 habían muerto en su totalidad. Cada 24 hrs se realizó la extracción de RNA de células transducidas con los lentivirus VPH16-E2, VPH11-E2 y lentivirus VAC. En ambos casos se detectó la expresión desde el tercer día.

Es importante mencionar que durante el periodo de infección notamos que la morfología de las células transducidas con el lentivirus VPH16-E2 se modificó, presentando un alargamiento celular semejante al descrito para células epiteliales diferenciadas (Fig. 15 panel a). Además del análisis del nivel de mRNA se realizó la detección de proteínas en fase sólida para comprobar únicamente la presencia de la proteína VPH16-E2 (Fig. 15 panel c), ya que en el mercado no existen anticuerpos comerciales para VPH11-E2.

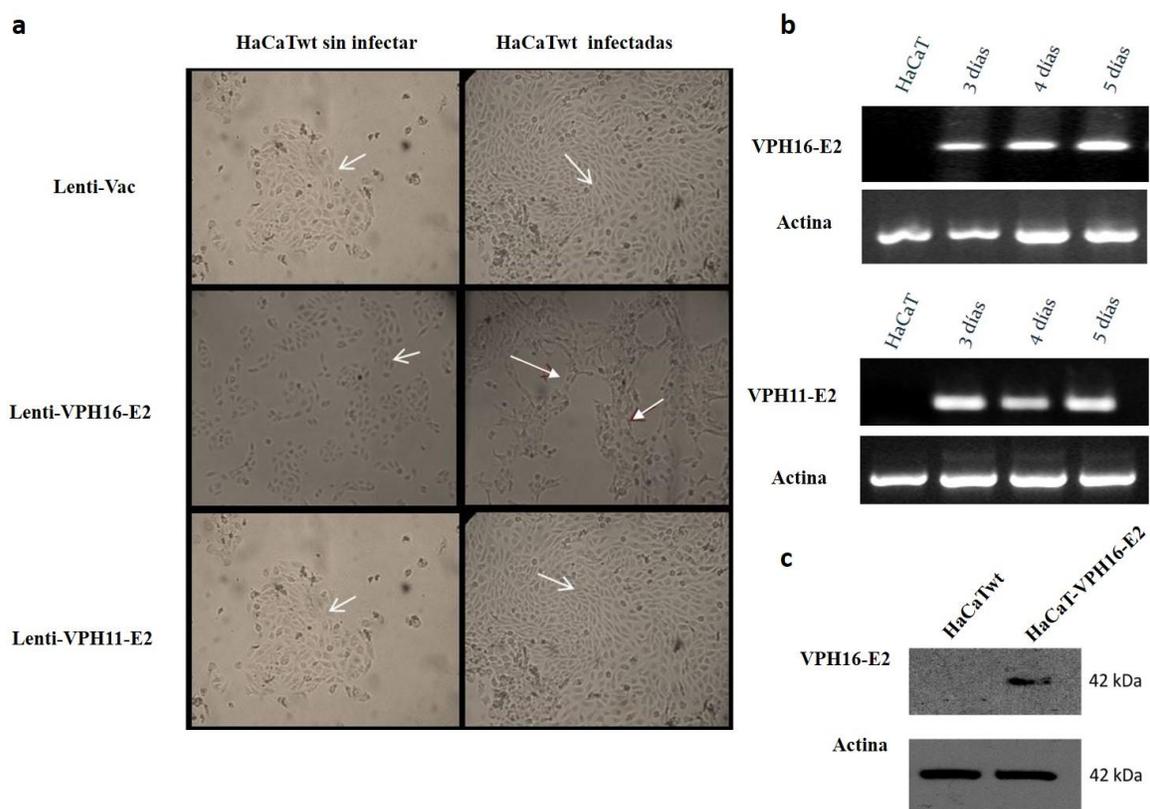


Fig. 15 Expresión de VPH16-E2 y VPH11-E2 en células HaCaT. **a)** Microfotografías de células HaCaT transducidas con lentivirus Lenti-Vac, Lenti-VPH16-E2 y Lenti-VPH11-E2 seleccionadas con puromicina durante 5 días. **b)** RT-PCR en punto final de células HaCaT-VPH16-E2 y HaCaT-VPH11-E2. **c)** Detección en fase sólida de la expresión de la proteína VPH16-E2 en células HaCaT-VPH16-E2.

5. Evaluación de la abundancia relativa de las poblaciones α 6int/CD71 en la línea celular HaCaT durante la expresión de las proteínas VPH16-E2 y VPH11-E2

Para determinar la participación de las proteínas VPH16-E2 y VPH11-E2 en las subpoblaciones α 6int-CD71 se transdujeron células HaCaT con 1 MOI de lentivirus que expresaban los genes E211, E216 y lentivirus Vac como control. Se seleccionaron durante 5 días con puromicina y las células resistentes HaCaT-VPH16-E2, HaCaT-VPH11-E2, HaCaT-Vac y HaCaT-wt se tripsinizaron y se tiñeron con los anticuerpos anti- α 6int y anti-CD71 para analizar por citometría de flujo la abundancia relativa de las subpoblaciones.

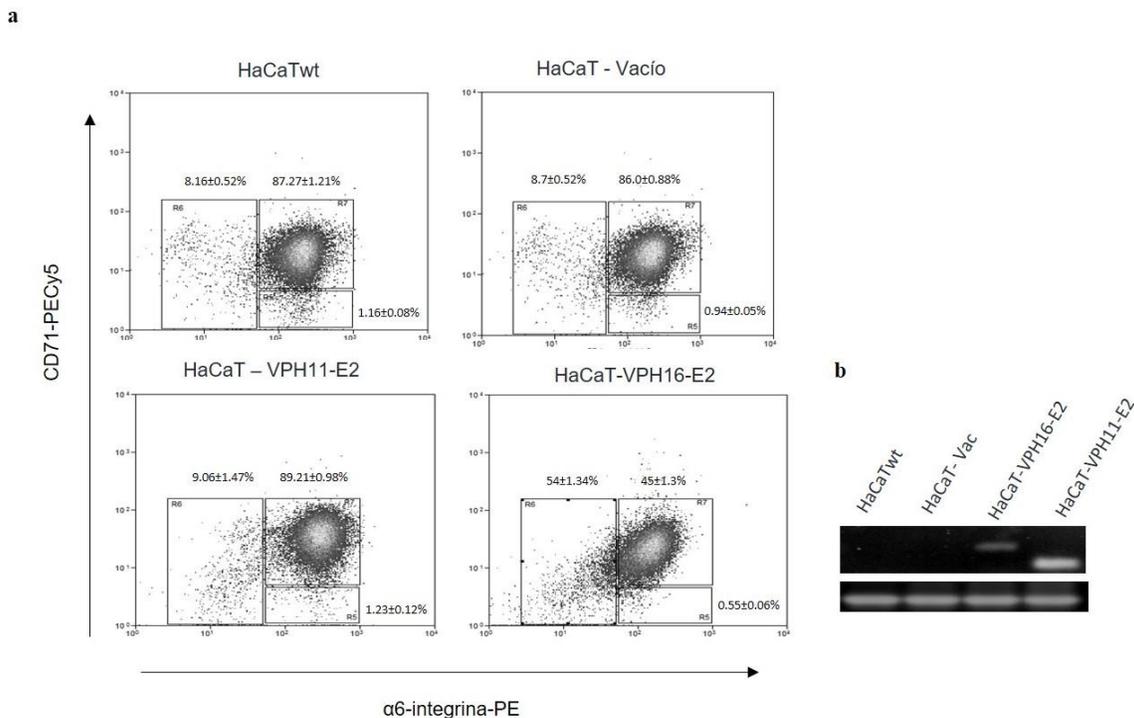


Fig. 16. Evaluación de la abundancia relativa de las subpoblaciones $\alpha 6 \text{int} / \text{CD71}$ en la línea celular HaCaT durante la expresión de las proteínas VPH16-E2 y VPH11-E2. Las imágenes mostradas son ensayos representativos de al menos tres experimentos independientes.

Como se observa en la Fig. 16 la transducción con el lentivirus vacío no produce ningún cambio en la abundancia relativa de las subpoblaciones celulares; mientras que en el caso de las células VPH11-E2 se observa un pequeño incremento en la población $\alpha 6 \text{int}^{\text{bri}} / \text{CD71}^{\text{bri}}$ de (87.27 ± 1.21 a 89.21 ± 0.98), mientras que en el caso de las células HaCaT VPH16-E2 observamos un fuerte incremento en la población $\alpha 6 \text{int}^{\text{dim}}$ semejante a un proceso de diferenciación (8.16 ± 0.52 vs. $54 \pm 1.34\%$), seguido de una disminución de la población $\alpha 6 \text{int}^{\text{bri}} / \text{CD71}^{\text{bri}}$ que va del ($87.27 \pm 1.21\%$ vs. $45 \pm 1.3\%$) y finalmente una clara disminución de la población $\alpha 6 \text{int}^{\text{bri}} / \text{CD71}^{\text{dim}}$ de (1.16 ± 0.08 vs. $0.55 \pm 0.06\%$) que equivale aproximadamente al 50%. Estos eventos sugieren que las proteínas E2 de los papilomavirus de alto y bajo riesgo afectan de diferente manera los procesos de proliferación y

diferenciación celular, sugiriendo que la proteína VPH16-E2 es un mayor inductor de la diferenciación en comparación con VPH11-E2.

Debido al decremento de alrededor del 50% en la subpoblación $\alpha 6int^{bri}/CD71^{dim}$ se decidió realizar un análisis de los marcadores de troncalidad en presencia de las proteínas virales.

6. Expresión de marcadores de troncalidad en presencia de las proteínas virales VPH16-E2 y VPH11-E2.

Nuevamente se realizó la transducción lentiviral por cinco días, seleccionando con puromicina y pasado este tiempo las células HaCaT-VPH16-E2, HaCaT-VPH11-E2 y HaCaT-Vac (HaCaT-wt como control) se tripsinizaron y se tiñeron con los anticuerpos anti- $\alpha 6int$ y anti-CD71 para separar por citometría de flujo las subpoblaciones celulares $\alpha 6int^{bri}/CD71^{dim}$ y una mezcla de las subpoblaciones $\alpha 6int^{bri}/CD71^{bri}$ y $\alpha 6int^{dim}$ a la cual llamamos No- $\alpha 6int^{bri}/CD71^{dim}$. Se extrajo RNA tanto de la población celular total como de las subpoblaciones y se analizó la expresión por RT-qPCR de los marcadores *SOX2*, *NANOG* y *OCT4* que son factores transcripcionales presentes en células con características de troncalidad.

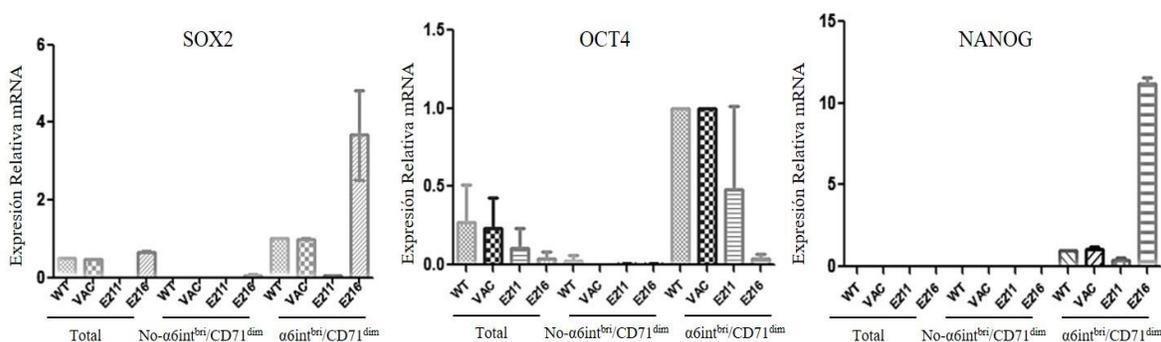


Figura. 17a Análisis de expresión génica por RT-qPCR de *SOX2*, *NANOG* y *OCT4* en células HaCaT-wt, HaCaT-Vac, HaCaT-VPH11-E2 y HaCaT-VPH16-E2 en población total y después de la separación por

citometría de flujo de las subpoblaciones $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim} y No- $\alpha 6$ -integrin^{bri}/CD71^{dim}. Los valores se representan como las diferencias de los valores de doble Delta-Ct ($\Delta\Delta Ct$) con respecto a las células no infectadas y la expresión del gen constitutivo *ACTINA*. Las barras representan la media \pm SD ($P < 0.05$). Las imágenes mostradas son ensayos representativos de al menos tres experimentos independientes.

La Fig. 17 muestra la expresión de los marcadores de troncalidad en las diferentes subpoblaciones celulares. Como se esperaba, ninguna de las subpoblaciones No- $\alpha 6$ int^{bri}/CD71^{dim} los expresan, ya que son células en proceso de diferenciación. Por otra parte en las células totales se detectan niveles muy bajos del mRNA tanto de *SOX2* como de *OCT4*, mientras que las subpoblaciones $\alpha 6$ int^{bri}/CD71^{dim} presentaron una expresión diferencial dependiendo de la proteína viral que era expresada. Para el caso de las células HaCaT-VPH11-E2 $\alpha 6$ int^{bri}/CD71^{dim} prácticamente se abate la expresión de *SOX2* y *NANOG* y la expresión de *OCT4* no se mantuvo constante. Sin embargo en el caso de las células HaCaT-VPH16-E2 $\alpha 6$ int^{bri}/CD71^{dim}, se obtuvo un perfil con diferencias estadísticamente significativas en donde aumenta la expresión de *SOX2* (5 veces) y *NANOG* (10 veces) y casi desaparece la expresión de *OCT4*; estos resultados fueron completamente opuestos a lo observado en células HaCaT-VPH11-E2. Estos resultados nuevamente sugieren que las interacciones de las proteínas virales con proteínas celulares son muy distintas entre proteínas de virus de alto y bajo riesgo. Todos estos cambios en la expresión de los marcadores de troncalidad inducidos por VPH16-E2 indican que esta proteína viral podría estar regulando el destino celular manteniendo a las células en un “estado progenitor” y evitar su salida hacia la diferenciación temprana.

7. Ensayo de diferenciación de células HaCaT con CaCl₂.

Resultado de las observaciones anteriores donde encontramos que la proteína E2 del VPH16 aparentemente acelera el proceso de diferenciación, decidimos establecer un modelo de referencia y seguir comparando los efectos de las proteínas E2 de los virus de alto y bajo riesgo en las subpoblaciones celulares. Por lo tanto realizamos un ensayo de diferenciación con CaCl₂, que es un inductor bien estudiado [109-111]. Se sembraron células HaCaT y se cultivaron en medio suplementado con 5mM de CaCl₂ realizándose una cinética de tiempo durante 5 días. Se cosecharon células cada 48 hrs y se analizaron los perfiles de abundancia relativa en las subpoblaciones celulares α int-CD71. Las células HaCaT al recibir el estímulo continuo con CaCl₂ van modificando la abundancia relativa de las subpoblaciones, ya que tras tres días de tratamiento la subpoblación α int^{bri}/CD71^{bri} sufrió un incremento del 5% en comparación a las células HaCaT sin estímulo, mientras que para el día 5 la subpoblación más abundante fue la α int^{dim} que representa células en proceso de diferenciación (8.16±0.52 vs 30.01 ±0.66 %), mientras que la subpoblación de células progenitoras α int^{bri}-CD71^{dim} disminuyó en un 55% (Fig. 18). Estos valores son semejantes a los observados en células HaCaT-VPH16-E2.

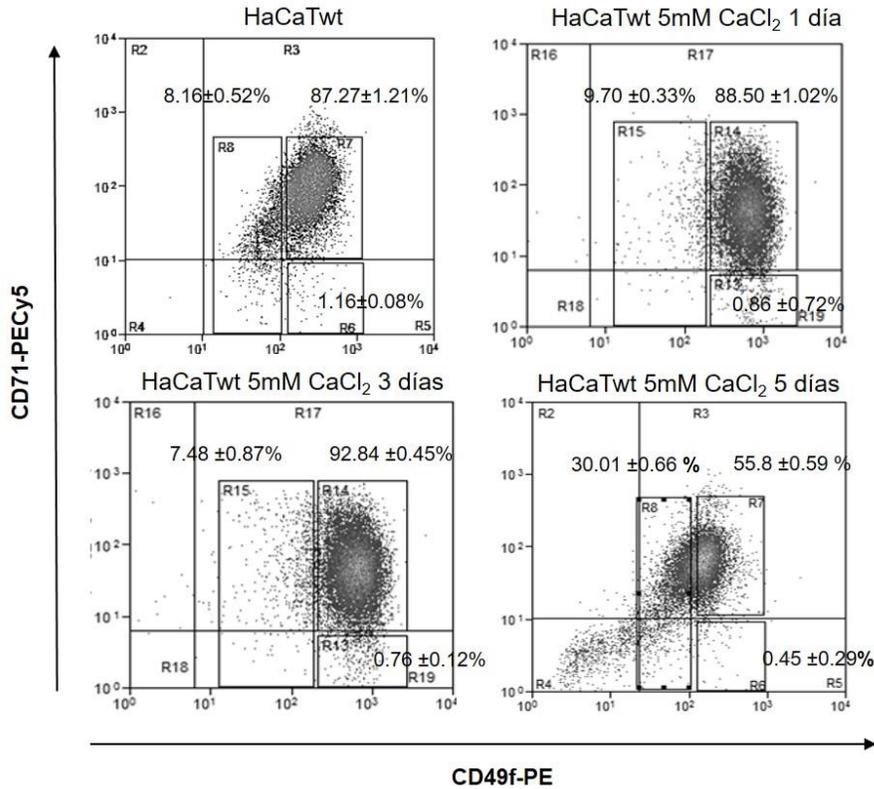


Fig. 18 Cinética de diferenciación con CaCl₂ en células HaCaT. Análisis de las sub poblaciones α 6int/CD71 en células HaCaTwt estimuladas con 5mM de CaCl₂ a diferentes tiempos. Las imágenes mostradas son ensayos representativos de al menos tres experimentos independientes.

De igual forma la morfología de las células se modificó en las células HaCaT con CaCl₂ en comparación con células HaCaT sin tratamiento, ya que se pudo observar el alargamiento de las células tratadas con calcio, que se vuelve más evidente conforme transcurren los días (Fig. 19); este fenómeno también lo observamos en las células HaCaT-VPH16-E2.

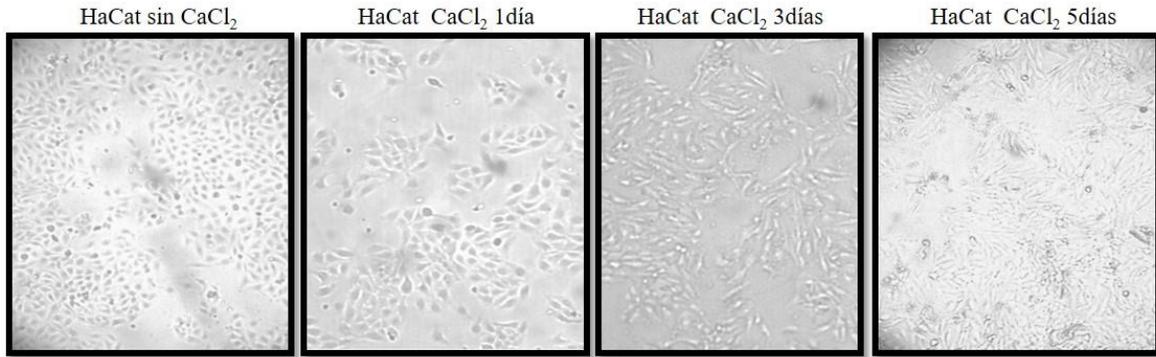


Fig. 19 Microfotografías de células HaCaT estimuladas con 5mM de CaCl₂.

Para confirmar el proceso de diferenciación de células HaCaT tratadas con CaCl₂ realizamos un ensayo de detección de fase sólida de involucrina, que es una proteína características de células epiteliales del estrato espinoso [35]. En la figura 20 se muestra la expresión de esta proteína en la forma completa en las células HaCaT con y sin tratamiento, pero muy importante de sus formas precursoras, únicamente en las células HaCaT que fueron estimuladas por 3 y 5 días con 5mM de CaCl₂.

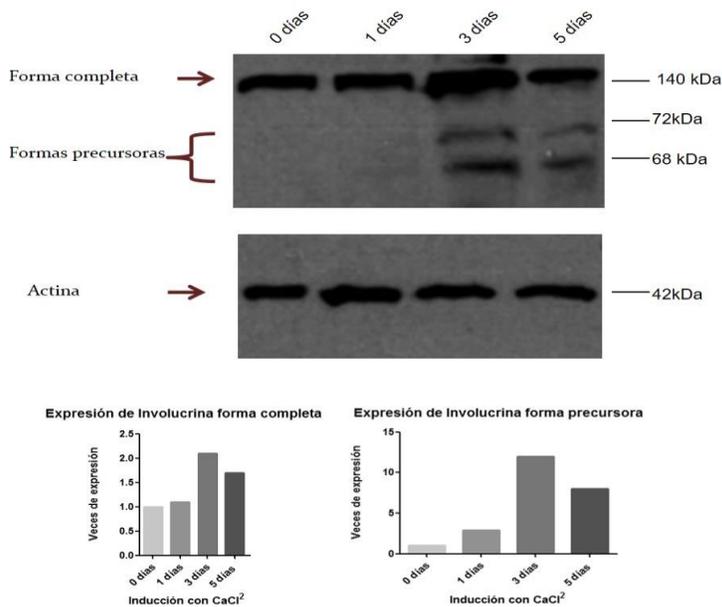


Fig. 20 a) Detección en fase sólida de involucrina en células HaCaTwt estimuladas con 5mM de CaCl₂. **b)** Gráficas de barras del análisis densitométrico de la forma completa de la involucrina (izq.) y sus formas precursoras (der.).

8. Efecto de VPH16-E2 en las subpoblaciones celulares α 6int-CD71 en presencia de cloruro de calcio (CaCl₂) y ácido retinoico (AR).

Es bien sabido que existen otros tipos de inductores de la diferenciación de epitelios, además del CaCl₂, como el ácido retinoico (AR) [112-114]. Por esta razón decidimos comparar el efecto de ambos inductores, contra el observado tras la expresión de VPH16-E2. En primer lugar analizamos la abundancia relativa de dos proteínas marcadores que nos permitirían evaluar el proceso de diferenciación temprana, la citoqueratina 10 (CK10) que es una proteína que se expresa *de novo* en células diferenciadas [35,90] y la citoqueratina 14 (CK14) que está presente en todas las células de la capa basal del epitelio [35]. Observamos que en células HaCaT-VPH16-E2 existe una considerable disminución en los niveles de CK14 y un incremento de más 100% en CK10 comparado con HaCaT-wt (Fig. 21, panel a). Esto

claramente demuestra que la proteína VPH16-E2 promueve la diferenciación temprana en células HaCaT. Además las células tratadas con CaCl₂ o con AR tienen una disminución tanto de CK10 como de CK14, la disminución más evidente es causada por el AR ya que se observa una reducción del 80% en CK14 y 100% de CK10; mientras que los tratamientos con CaCl₂ provocan una reducción del 10% y del 60% respectivamente (Fig. 21 panel a). Estos resultados indican que ambos tratamientos inducen un proceso de diferenciación mucho más acelerado y probablemente por vías distintas que VPH16-E2, ya que los bajos niveles de CK10 y CK14 en células tratadas sugieren un paso más avanzado en el proceso de diferenciación, el cual ya ha sido reportado anteriormente [111,113].

Teniendo en mente los efectos del CaCl₂ y de VPH16-E2 en las subpoblaciones celulares α 6-int-CD71 fue de nuestro interés compararlos con los efectos provocados por el AR. Analizamos por citometría de flujo la abundancia relativa de las subpoblaciones celulares α 6-int-CD71 en células tratadas por cinco días con 5mM de CaCl₂, 1 μ M de AR y células HaCaT-VPH16-E2.

Observamos que tanto el CaCl₂ como el AR inducen cambios significativos en el perfil de expresión de las subpoblaciones celulares α 6-integrin-CD71 de células HaCaT; sin embargo existen claras diferencias entre ambos tratamientos, lo que sugiere que aunque ambos agentes son inductores de la diferenciación, estos no son equivalentes. La principal diferencia observada fue que el CaCl₂ indujo un considerable incremento en la población de células diferenciadas tempranas (α 6-integrin^{dim}) (32.51 ± 1.15 %) (Fig. 21, panel d), mientras que el enriquecimiento de esta población en presencia de AR es inclusive mayor (66.64 ± 1.5 %) (Fig. 21, panel f).

Considerando que las células pueden recibir estímulos de manera natural para diferenciarse independientemente de la presencia de VPH16-E2, tratamos células HaCaT-VPH16-E2 con CaCl₂ o bien con AR por cinco días para evaluar los perfiles de expresión de α6-integrina-CD71 por citometría de flujo. Encontramos que los perfiles de expresión son diferentes para cada inductor usado, ya que en HaCaT-VPH16-E2 tratadas con CaCl₂, se induce un considerable incremento en la abundancia relativa de la subpoblación α6-integrin^{bri}/CD71^{dim} ($0.55 \pm 0.06 \%$ vs. $1.38 \pm 0.3 \%$) (Fig. 21, paneles c y e) [R6]), con valores incluso más elevados que los presentes en células HaCaT-wt sin ningún tratamiento ($1.16 \pm 0.08 \%$) (Fig. 21, panel b). Además este tratamiento también induce en estas células un incremento en la abundancia relativa de la subpoblación α6-integrin^{bri}/CD71^{bri} considerada como la subpoblación de células transitoriamente amplificadas ($45 \pm 1.3 \%$ vs. $68.76 \pm 1.12 \%$), lo que sugiere que el tratamiento con CaCl₂ y la presencia de VPH16-E2 no restringen a la célula únicamente a la diferenciación temprana, sino que también las mantiene en un proceso de proliferación activa (Fig. 21, paneles c y e [R7]).

Por otra parte el tratamiento con AR en células HaCaT-VPH16-E2 produjo un efecto mucho más marcado en el estado de diferenciación que el observado en HaCaT-wt, ya que la subpoblación α6-integrin^{dim} en células HaCaT-VPH16-E2 presentó un incremento de ($66.64 \pm 1.5 \%$ vs $75.84 \pm 1.02 \%$) (Fig. 21, paneles f y g [R8]). De la misma manera que con el CaCl₂, el AR en presencia de E216 incrementó visiblemente la subpoblación α6-integrin^{bri}/CD71^{dim} en comparación con células no tratadas HaCaT-VPH16-E2 ($0.55 \pm 0.06 \%$ vs $0.98 \pm 0.39 \%$) (Fig. 21, paneles c y g [R6]).

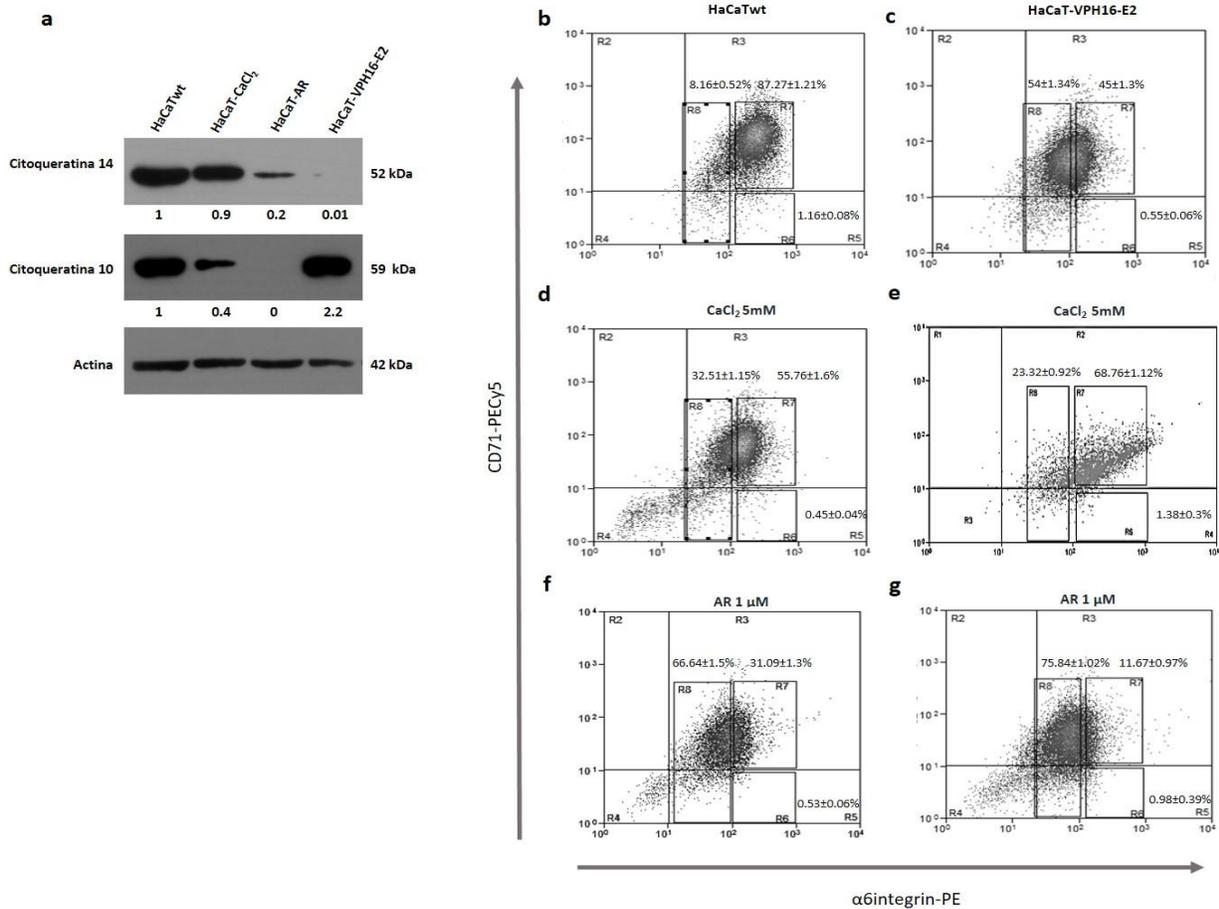


Fig. 21 La proteína VPH16-E2 promueve diferenciación en células HaCaT de una manera similar a inductores de diferenciación epiteliales. **a)** Detección en fase sólida de la expresión de citoqueratinas 10 y 14 en células HaCaTwt no estimuladas, HaCaT estimuladas durante 5 días con 5 mM de CaCl₂ o 1 μM de AR y células HaCaT-VPH16-E2. Los valores numéricos debajo de cada línea son los resultados cuantitativos expresados como la proporción de las células HaCaTwt no estimuladas y normalizadas contra β-actina. Análisis de citometría de flujo. Paneles izquierdos (**b**, **d** y **f**), células HaCaTwt; paneles derechos (**c**, **e** y **g**), células HaCaT-VPH16-E2. **b** y **c**, células no estimuladas; **d** y **e**, estimuladas con CaCl₂; **f** y **g**, estimuladas con AR. Las imágenes mostradas son ensayos representativos de al menos tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

La proteína E2 del VPH ha sido ampliamente estudiada debido a sus múltiples efectos sobre la regulación del ciclo viral, y se ha demostrado que participa tanto en la replicación del genoma del virus como en la regulación de la expresión de los oncogenes E6 y E7 mediante su unión al promotor, funcionando como un activador y/o represor de la transcripción [115-117].

Esta función como factor transcripcional también tiene un impacto sobre los genes de la célula huésped y en múltiples estudios realizados en líneas celulares inmortalizadas y transformadas o que provienen de biopsias de CaCU [66,116,118-120], se ha demostrado que esta regulación de la transcripción de genes celulares tiene efectos directos sobre distintos procesos como proliferación, diferenciación y aún muerte celular.

Sin embargo, la infección de VPH en la capa basal del epitelio cervical puede suceder en cualquier subtipo celular que la integra y por ello la expresión de la proteína E2 podría tener efectos particulares en cada uno de ellos. Un número limitado de células en esta capa del epitelio, posee características de células progenitoras y para establecerlas como “modelo” de estudio es necesario lograr su separación y enriquecimiento.

Diferentes estrategias han permitido lograr la separación de esta subpoblación tanto de cultivos primarios como de líneas celulares transformadas, ya sea mediante la identificación de diferentes receptores de membrana, como desmogleina-3, integrinas $\alpha 6$, $\beta 1$, el receptor de Transferrina (CD71) [92], o bien por la presencia de la molécula p63 en el núcleo, o más aún por las características propias de su metabolismo, como la sobre-expresión de la enzima Aldehído deshidrogenasa (ALDH), o de las bombas ABCG [84-87].

La línea celular HaCaT que deriva de queratinocitos inmortalizados espontáneamente y carece de genomas de HPV, ha sido ampliamente utilizada para simular tejidos epiteliales [100,101]. Utilizando la técnica descrita por Schluter, H y col. [92] en este trabajo demostramos que en esta línea celular, al igual que lo que sucede en cultivos primarios de queratinocitos, existen tres subpoblaciones celulares, basados en la identificación y marcaje simultáneo de dos receptores de membrana $\alpha 6$ -integrina y CD71. Estas subpoblaciones corresponden a: células en proceso de diferenciación (8.16 ± 0.52 %) ($\alpha 6$ -int^{dim}), células transitoriamente amplificadas (87.27 ± 1.21 %) ($\alpha 6$ -int^{bri}/ CD71^{bri}) y células progenitoras (1.16 ± 0.08 %) ($\alpha 6$ -int^{bri}/ CD71^{dim}) (Fig. 9).

Para demostrar que la subpoblación de células $\alpha 6$ -int^{bri} / CD71^{bri} corresponde a células progenitoras epiteliales y presentan características de “troncalidad”, evaluamos sus propiedades utilizando tres parámetros; primero, realizamos un análisis de auto-renovación mediante la separación de las subpoblaciones por citometría de flujo y su resiembra en condiciones normales de cultivo. Este tipo de análisis se ha utilizado en numerosos trabajos para identificar tanto células troncales normales como cancerosas [85,102,121], observando en todos los casos que la subpoblación “troncal” es capaz de restablecer el fenotipo inicial con tres subpoblaciones y además incrementar el número de células “troncales” tras cada evento de separación.

Por ejemplo en nuestro grupo de trabajo se demostró que las líneas celulares cancerosas contienen un número elevado de células con características de troncalidad en comparación con cultivos primarios o líneas celulares inmortalizadas, y que tras cada evento de separación esta población se incrementa exponencialmente [85]. Cuando comparamos este antecedente con lo encontrado en la línea celular HaCaT, observamos que la subpoblación $\alpha 6$ int^{bri}/

CD71^{dim} se encuentra en bajo porcentaje (1.16 ± 0.08 %) y que aunque son capaces de incrementar su población del 1% al 3.8% tras dos eventos de separación y resiembra (Fig. 11), este crecimiento no es exponencial como sucede en el caso de células troncales cancerosas. Por otra parte y como era de esperarse las subpoblaciones no- $\alpha 6$ -int^{bri}/ CD71^{dim} no fueron capaces de restablecer el fenotipo inicial de la línea celular ni de generar una subpoblación $\alpha 6$ -int^{bri}/ CD71^{dim}.

Nuestro segundo criterio de evaluación de “troncalidad” fue el ensayo de formación clonal (Fig. 12); el cual demostró que las células $\alpha 6$ -int^{bri}/ CD71^{dim} de células HaCaT-wt son capaces de formar tres tipos de clonas muy parecidas a las que forman cultivos primarios de queratinocitos [122], con características morfológicas distintivas que corresponden a holoclonas en un alto porcentaje en comparación con meroclonas y paraclonas. Cuando analizamos la capacidad de formación de clonas de la subpoblaciones No- $\alpha 6$ -int^{bri}/ CD71^{dim}, estas fueron incapaces de formar holoclonas generando únicamente meroclonas y paraclonas que además mostraban una tasa de proliferación muy alta si se compara con aquella observada en las paraclonas y meroclonas formadas por las células $\alpha 6$ -int^{bri}/ CD71^{dim}.

Adicionalmente observamos que las dimensiones de las holoclonas generadas por las células $\alpha 6$ -int^{bri}/ CD71^{dim} así como el tamaño de las células que las conformaban, fueron mucho más pequeñas que lo observado en las meroclonas y paraclonas formadas tanto en los cultivos de células HaCaT $\alpha 6$ -int^{bri}/ CD71^{dim} como No- $\alpha 6$ -int^{bri}/ CD71^{dim}. Esta característica está relacionada con la capacidad proliferativa de las células, y nuestra observación coincide con trabajos anteriores en donde se demuestra que las células con características de troncalidad en epitelios tienen una tasa de división celular mucho más lenta que aquellas que son transitoriamente amplificadas [105,123].

Por último analizamos en las diferentes subpoblaciones de la línea celular HaCaT mediante RT-PCR la expresión de los factores de transcripción *SOX2*, *NANOG* y *OCT4*, que son considerados marcadores de troncalidad y cuya expresión ha sido reportada para células progenitoras de queratinocitos normales [106,108] (Fig. 13). La presencia de mRNA de estos factores únicamente en la subpoblación $\alpha6\text{-int}^{\text{bri}}/\text{CD71}^{\text{dim}}$, explica en buena parte su capacidad de auto-renovación y de formación mayoritariamente de holoclonas. En apoyo a nuestros resultados, recientemente se reportó que en la línea celular HaCaT creciendo en monocapa, es posible observar mediante inmunodetección la presencia de las proteínas *OCT4* y *NANOG*, a pesar de que en las condiciones particulares de cultivo y a diferencia de las células troncales cancerosas evaluadas, estas células no fueron capaces de formar esferoides [86].

Tomando en conjunto, estos resultados nos confirman que la subpoblación celular $\alpha6\text{-int}^{\text{bri}}/\text{CD71}^{\text{dim}}$ de aproximadamente 1% en la línea celular HaCaT se encuentra enriquecida en células progenitoras.

A pesar de que se trata de una línea celular inmortalizada, la línea celular HaCaT posee características particulares que la hacen muy atractiva para utilizarla como sistema biológico, como son su capacidad de responder a una variedad de estímulos de diferenciación como el CaCl_2 , el ácido retinoico, y el propio contacto célula-célula [124-126], y ahora la demostración de que posee una subpoblación (en bajo porcentaje, pero constante) que expresa marcadores de troncalidad y que tiene una capacidad de auto-renovación similar a la observada en células troncales epiteliales normales, lo que muy probablemente permite el mantenimiento de la línea celular a través del tiempo.

Estas características sumadas a la ausencia de genomas de VPH en ella, hacen de esta línea celular un modelo muy apropiado para estudiar los efectos de la expresión de los genes virales sobre las tres principales poblaciones celulares que conforman la capa basal del epitelio y que pueden ser un blanco de la infección por HPV.

Haciendo uso del sistema lentiviral de tercera generación establecimos un modelo celular capaz de expresar las proteínas virales VPH16-E2 y VPH11-E2 en las tres subpoblaciones celulares y demostramos que aunque estructuralmente las proteínas E2 de papilomavirus de alto y bajo riesgo son muy similares sus funciones en la célula huésped son muy diferentes.

Observamos que la expresión de la proteína VPH16-E2 en células HaCaT genera un cambio significativo en las proporciones de las tres subpoblaciones celulares a partir del quinto día y que esta modificación favorece el proceso de diferenciación temprana, ya que la abundancia relativa de las células $\alpha 6\text{-int}^{\text{bri}}/\text{CD71}^{\text{dim}}$ (progenitores) disminuye importantemente, mientras que la población de células comprometidas a diferenciación $\alpha 6\text{-int}^{\text{dim}}$ incrementa (Fig. 17). Estos resultados corroboran y complementan lo observado por Burns y colaboradores, quienes reportaron la expresión de marcadores de diferenciación temprana en presencia de E2-VPH16 en células HaCaT totales [119]. En este mismo sentido, reportes previos de nuestro grupo de trabajo en células C-33A, indican que la presencia de E2-VPH16 modifica los perfiles de expresión génica afectando importantemente las vías de señalización de las integrinas, WNT/ β -catenina, RhoA y Notch [118], todas ellas responsables de respuestas de proliferación y diferenciación celular. Sin embargo, la proteína VPH11-E2 no fue capaz de iniciar un proceso de diferenciación en estas condiciones (Fig. 17). Bajo este escenario existen dos posibilidades: a) que las proteínas E2 de bajo riesgo no inducen procesos de diferenciación en la célula huésped o b) que requieren de tiempos más prolongados de

expresión para lograrlo, ya que observamos un ligero incremento en la abundancia relativa de la subpoblación $\alpha 6\text{-int}^{\text{bri}}/ \text{CD71}^{\text{bri}}$ ($87.27 \pm 1.21\%$ vs $89.21 \pm 0.98\%$), lo que podría significar que la proteína VPH11-E2 favorece un proceso de diferenciación más lento y que lo que observamos en nuestro estudio fue el paso del estado progenitor al de proliferación activa.

Considerando las implicaciones que estos cambios en las proporciones de las subpoblaciones pudieran tener, analizamos el efecto de la expresión de E2 sobre los niveles del RNAm de los marcadores de troncalidad en cada una de ellas. Como observamos en la figura 18, la abundancia relativa del RNAm de este grupo de genes se encuentra alterado cuando la proteína VPH11-E2 se expresa, los tres marcadores disminuyen drásticamente, mientras que con VPH16-E2 este efecto no es homogéneo, ya que mientras para el caso de *SOX 2* y *NANOG* hay un aumento evidente en su expresión, sucede lo contrario para el caso de *OCT4*.

Algunas de las proteínas que se ha demostrado interactúan con la proteína VPH-E2, como CBP/p300, SP1, TAF1 y BRD4 [77,127-130], son factores transcripcionales que participan de manera importante en la regulación de genes cruciales en las vías de proliferación y diferenciación celular. Recientemente, también se ha reportado la participación de algunos de estos factores transcripcionales en la regulación de la expresión de los genes *SOX2*, *NANOG* y *OCT4*; por ejemplo se sabe que SP1 se une directamente al promotor de *OCT4* y favorece su transcripción [131]. De esta forma, la interacción de la proteína E2 con SP1 podría impedir su unión a promotores génicos, el de *OCT4* entre ellos, lo que explicaría el bajo nivel de expresión que observamos en nuestros ensayos. Por otra parte se sabe que E2 es capaz de estabilizar la unión de BRD4 a promotores celulares [132] lo cual explicaría la sobre-expresión de *NANOG* en presencia de VPH16-E2 ya que se ha demostrado que BRD4 es una pieza muy importante en la regulación de este marcador de troncalidad [128]. Se ha

observado que cuando células progenitoras epiteliales son estimuladas con diversos agentes inductores de diferenciación, se genera en ellas un cambio en los perfiles de expresión de los marcadores de troncalidad, sin embargo de manera temporal y aparentemente como una respuesta de resistencia al proceso de diferenciación, al disminuir los niveles de expresión de uno de estos factores, la célula responde sobre-expresando otro que sustituya la ausencia del primero [107,133-135]. La modificación en la abundancia relativa de las subpoblaciones celulares, así como los cambios generados en el patrón de expresión de estos genes en las células progenitoras presentes en el cultivo de células HaCaT que expresan el gen VPH16-E2, indican un efecto similar al anteriormente descrito y sugieren que la expresión de esta proteína viral provoca en las células progenitoras epiteliales su transición hacia la diferenciación.

Con la finalidad de profundizar en el análisis de esta posibilidad, decidimos utilizar dos inductores de diferenciación cuyos efectos son muy conocidos y han sido evaluados en queratinocitos, como el CaCl₂ y el ácido retinoico (AR) [109,136]. Sin embargo hasta nuestro conocimiento, el efecto de estos inductores sobre las subpoblaciones constituyentes de esta línea celular no han sido reportados, por lo que este trabajo es pionero al respecto.

Cuando las células fueron estimuladas con 5mM de CaCl₂ o 1μM de AR durante 5 días [109,112], el perfil de abundancia relativa de las subpoblaciones se observó muy similar al encontrado en las células en presencia de la proteína VPH16-E2 durante 5 días, donde la tendencia fue a una disminución cercana al 50% en la subpoblación $\alpha 6\text{-int}^{\text{bri}}/\text{CD71}^{\text{dim}}$, una disminución de la subpoblación TA y un marcado incremento en la población de células diferenciadas (Fig. 21). Estos resultados confirman que la proteína VPH16-E2 *per se* es capaz

de provocar un proceso de diferenciación tanto en las células troncales como en las células transitoriamente amplificadas.

Con el interés de conocer la manera en que este efecto inducido por la expresión de VPH16-E2 afecta la respuesta de las células cuando estas se encuentran sometidas a un estímulo natural de diferenciación, se realizaron ensayos orientados en ese sentido.

El estímulo de diferenciación generado por el tratamiento durante cinco días con $1\mu\text{M}$ de AR cuando la proteína VPH16-E2 está presente, generó un efecto de aceleración en el proceso de diferenciación, ya que la subpoblación de TA prácticamente estuvo ausente y el mayor porcentaje de células correspondieron a células comprometidas a la diferenciación (Fig. 21 g). Sin embargo, los cultivos celulares que expresan VPH16-E2 tras el tratamiento con 5Mm CaCl_2 generaron un perfil en el que aproximadamente el 70% de la población correspondió a células TA, lo que significa que en este caso las células son inducidas primeramente a un proceso de proliferación acelerada para después diferenciarse (Fig. 21 e). Este comportamiento puede deberse a un efecto aditivo sobre los niveles de expresión del gen p21, ya que se ha demostrado que, por un lado es activado transcripcionalmente por la proteína E2 de VPH [127,137], y por otro, p21 es activado por la cascada S100C/A11 que es inducida por CaCl_2 y por consecuencia llevando a la hiperproliferación celular [109]. El comportamiento observado también podría estar relacionado con la expresión o ausencia de diferentes reguladores de la diferenciación epidermal, como la proteína 3 de unión al factor de crecimiento de insulina (IGFBP-3), el cual es característico de células de la capa basal del epitelio y cuando es reprimido por la estimulación por CaCl_2 envía a las células a proliferación [110].

De manera muy interesante el comportamiento de la población $\alpha 6\text{-int}^{\text{bri}}/\text{CD71}^{\text{dim}}$ tras el estímulo de diferenciación en las células que expresan E2, fue radicalmente distinto al observado cuando sucede el estímulo de diferenciación (tanto CaCl_2 como AR) en las células HaCaT carentes de E2, o en aquellas en las que se expresa E2 pero no reciben estímulo adicional, ya que mientras en estos últimos casos la abundancia relativa de la población tiende a disminuir hasta en un 50%, en los primeros ese porcentaje aumenta hasta alcanzar el 1% (100% de incremento) para el caso del AR y hasta el 1.6% (160% de incremento) en el caso de la inducción con CaCl_2 (Fig. 21 c, e, g).

Este comportamiento generado por E2 puede ser debido tanto a la regulación transcripcional directa de genes implicados en algunas vías, como a mecanismos indirectos a nivel de cromatina como podrían ser la metilación del DNA y la modificación de histonas en regiones génicas que regulen los mecanismos de decisión celular hacia la troncalidad o hacia la diferenciación.

Como se mencionó anteriormente se ha reportado que cuando las células progenitoras son inducidas hacia la diferenciación, éstas tienen la capacidad de mantener a una pequeña subpoblación “protegida” del compromiso a diferenciarse y mantenerse en un estado troncal [107,134]. Estudios en células troncales embrionarias han demostrado que tras su estimulación con AR es posible distinguir dos distintas subpoblaciones, basados en su respuesta al AR; una de ellas pierde prácticamente la expresión de *OCT4* y se compromete a la diferenciación, mientras que la otra mantiene la expresión de *OCT4* y permanece en un estado de troncalidad. Esto se debe a la expresión diferencial entre ambas subpoblaciones tanto de genes de la vía de Notch, como de componentes del complejo SWI/SNF y de enzimas que modifican las histonas [138].

Tomando en conjunto estos resultados sugieren que la sinergia entre el estímulo de diferenciación que representa la expresión de VPH16-E2 acompañado de un segundo estímulo de diferenciación como es el CaCl₂ o el AR (VPH16-E2/CaCl₂ ó VPH16-E2/AR) pueden promover el paso de algunas “células troncales” al nivel inmediato superior de diferenciación, mientras que el porcentaje restante de esta subpoblación parece ser menos receptivo al estímulo, dando la oportunidad de que estas se mantengan en un estado troncal, se dividan simétricamente y como resultado se observe un incremento en la población $\alpha 6$ -int^{bri}/CD71^{dim}.

CONCLUSIONES

En conclusión, determinamos que es posible separar tres subpoblaciones en la línea celular HaCaT bajo el fenotipo $\alpha 6$ -int/CD71 que corresponden a células en proceso de diferenciación, transitoriamente amplificadas y progenitoras, esta última acompañada de características de troncalidad como capacidad de autorenovación, y expresión de los factores de transcripción *SOX2*, *NANOG* y *OCT4*.

Que las proteínas virales VPH11-E2 y VPH16-E2 aunque estructuralmente son muy similares sus funciones en la célula huésped son distintas, los efectos en el proceso de diferenciación en células HaCaT son mucho más evidentes en la proteína VPH16-E2 que los efectos de VPH11-E2.

La proteína VPH16-E2 es capaz de modificar la expresión de los marcadores de troncalidad, y estos cambios podrían estar involucrados en el control de la salida de la troncalidad hacia la diferenciación temprana. Efectos que observamos en la modificación de la abundancia relativa de las tres subpoblaciones celulares.

PERSPECTIVAS

Realizar un análisis mucho más detallado sobre los procesos de diferenciación en presencia de VPH16-E2 en células HaCaT estimuladas con CaCl_2 y AR para determinar el mecanismo que siguen estas células en la salida a la diferenciación, así como en la regulación de factores de transcripción moduladores de la troncalidad.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Devgan V, Nguyen BC, Oh H, Dotto GP: P21waf1/cip1 suppresses keratinocyte differentiation independently of the cell cycle through transcriptional up-regulation of the igf-i gene. *J Biol Chem* 2006;281:30463-30470.
- 2 Bernard HU: The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005;32 Suppl 1:S1-6.
- 3 Harwood CA, Proby CM: Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:101-114.
- 4 de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H: Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
- 5 Persson G, Andersson K, Krantz I: Symptomatic genital papillomavirus infection in a community. Incidence and clinical picture. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996;75:287-290.
- 6 Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J: Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses* 2015;7:3863-3890.
- 7 Engel LW, Heilman CA, Howley PM: Transcriptional organization of bovine papillomavirus type 1. *Journal of virology* 1983;47:516-528.
- 8 Stunkel W, Bernard HU: The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. *Journal of virology* 1999;73:1918-1930.
- 9 Pett M, Coleman N: Integration of high-risk human papillomavirus: A key event in cervical carcinogenesis? *The Journal of pathology* 2007;212:356-367.
- 10 Unger ER, Barr E: Human papillomavirus and cervical cancer. *Emerg Infect Dis* 2004;10:2031-2032.
- 11 Antson AA, Burns JE, Moroz OV, Scott DJ, Sanders CM, Bronstein IB, Dodson GG, Wilson KS, Maitland NJ: Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus e2 protein. *Nature* 2000;403:805-809.
- 12 Harris SF, Botchan MR: Crystal structure of the human papillomavirus type 18 e2 activation domain. *Science* 1999;284:1673-1677.
- 13 Hou SY, Wu SY, Chiang CM: Transcriptional activity among high and low risk human papillomavirus e2 proteins correlates with e2 DNA binding. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:45619-45629.
- 14 McBride AA, Romanczuk H, Howley PM: The papillomavirus e2 regulatory proteins. *The Journal of biological chemistry* 1991;266:18411-18414.
- 15 Nadra AD, Eliseo T, Mok YK, Almeida CL, Bycroft M, Paci M, de Prat-Gay G, Cicero DO: Solution structure of the hpv-16 e2 DNA binding domain, a transcriptional regulator with a dimeric beta-barrel fold. *Journal of biomolecular NMR* 2004;30:211-214.
- 16 Howley PM, Schlegel R: The human papillomaviruses. An overview. *The American journal of medicine* 1988;85:155-158.
- 17 Dell G, Wilkinson KW, Tranter R, Parish J, Leo Brady R, Gaston K: Comparison of the structure and DNA-binding properties of the e2 proteins from an oncogenic and a non-oncogenic human papillomavirus. *J Mol Biol* 2003;334:979-991.
- 18 McPhillips MG, Ozato K, McBride AA: Interaction of bovine papillomavirus e2 protein with brd4 stabilizes its association with chromatin. *J Virol* 2005;79:8920-8932.
- 19 Kim K, Garner-Hamrick PA, Fisher C, Lee D, Lambert PF: Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on e2 function, and implications in viral infection. *J Virol* 2003;77:12450-12459.

- 20 Hines CS, Meghoo C, Shetty S, Biburger M, Brenowitz M, Hegde RS: DNA structure and flexibility in the sequence-specific binding of papillomavirus e2 proteins. *Journal of molecular biology* 1998;276:809-818.
- 21 Doorbar J: Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 2006;110:525-541.
- 22 Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R: Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *Journal of virology* 2003;77:13125-13135.
- 23 Patterson NA, Smith JL, Ozbun MA: Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *Journal of virology* 2005;79:6838-6847.
- 24 Day PM, Lowy DR, Schiller JT: Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 2003;307:1-11.
- 25 Chen G, Stenlund A: Sequential and ordered assembly of e1 initiator complexes on the papillomavirus origin of DNA replication generates progressive structural changes related to melting. *Molecular and cellular biology* 2002;22:7712-7720.
- 26 Loo YM, Melendy T: Recruitment of replication protein a by the papillomavirus e1 protein and modulation by single-stranded DNA. *Journal of virology* 2004;78:1605-1615.
- 27 Gonzalez SL, Strelau M, He X, Basile JR, Munger K: Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 e7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of e7. *Journal of virology* 2001;75:7583-7591.
- 28 Noya F, Chien WM, Broker TR, Chow LT: P21cip1 degradation in differentiated keratinocytes is abrogated by costabilization with cyclin e induced by human papillomavirus e7. *Journal of virology* 2001;75:6121-6134.
- 29 Gravitt P, and Shah, K.V: Chapter 3: The biology of human papillomavirus infections. *Cervical cancer: From etiology to prevention*. Book Series: Cancer Prevention-Cancer Causes ISSN 1568-2595 2004;. Ed. Rohan, T. & K. V. Shah. Vol.2. Online: DOI: 10.1007/1-4020-2016-3. ISBN: 978-1-4020-2016-2
- 30 Longworth MS, Laimins LA: Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:362-372.
- 31 Frazer IH: Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 2004;4:46-54.
- 32 Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT: Analysis of the physical state of different human papillomavirus dnas in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *Journal of virology* 1991;65:606-612.
- 33 Hopman AH, Smedts F, Dignef W, Ummelen M, Sonke G, Mravunac M, Vooijs GP, Speel EJ, Ramaekers FC: Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of hpv 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *The Journal of pathology* 2004;202:23-33.
- 34 Fuchs E: Epidermal differentiation. *Current opinion in cell biology* 1990;2:1028-1035.
- 35 Pasquariello N, Oddi S, Malaponti M, Maccarrone M: Regulation of gene transcription and keratinocyte differentiation by anandamide. *Vitam Horm* 2009;81:441-467.
- 36 Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E: Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 2004;118:635-648.
- 37 Dunnwald M, Tomanek-Chalkley A, Alexandrunas D, Fishbaugh J, Bickenbach JR: Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering. *Exp Dermatol* 2001;10:45-54.
- 38 Potten CS, Booth C: Keratinocyte stem cells: A commentary. *J Invest Dermatol* 2002;119:888-899.

- 39 Moll R, Franke WW, Volc-Platzer B, Krepler R: Different keratin polypeptides in epidermis and other epithelia of human skin: A specific cytokeratin of molecular weight 46,000 in epithelia of the pilosebaceous tract and basal cell epitheliomas. *J Cell Biol* 1982;95:285-295.
- 40 Eichner R, Sun TT, Aebi U: The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. *J Cell Biol* 1986;102:1767-1777.
- 41 Rice RH, Green H: Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: Activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell* 1979;18:681-694.
- 42 Oren A, Ganz T, Liu L, Meerloo T: In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp Mol Pathol* 2003;74:180-182.
- 43 Deraison C, Bonnart C, Lopez F, Besson C, Robinson R, Jayakumar A, Wagberg F, Brattsand M, Hachem JP, Leonardsson G, Hovnanian A: Lektin fragments specifically inhibit klk5, klk7, and klk14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol Biol Cell* 2007;18:3607-3619.
- 44 Bird AP: The relationship of DNA methylation to cancer. *Cancer Surv* 1996;28:87-101.
- 45 Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F, Dotto GP: Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J* 2001;20:3427-3436.
- 46 Nickoloff BJ, Qin JZ, Chaturvedi V, Denning MF, Bonish B, Miele L: Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through nf-kappab and ppargamma. *Cell Death Differ* 2002;9:842-855.
- 47 Nguyen BC, Lefort K, Mandinova A, Antonini D, Devgan V, Della Gatta G, Koster MI, Zhang Z, Wang J, Tommasi di Vignano A, Kitajewski J, Chiorino G, Roop DR, Missero C, Dotto GP: Cross-regulation between notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. *Genes Dev* 2006;20:1028-1042.
- 48 Dellavalle RP, Egbert TB, Marchbank A, Su LJ, Lee LA, Walsh P: Cusp/p63 expression in rat and human tissues. *J Dermatol Sci* 2001;27:82-87.
- 49 Westfall MD, Mays DJ, Sniezek JC, Pietenpol JA: The delta p63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by hay-wells syndrome-derived mutations. *Molecular and cellular biology* 2003;23:2264-2276.
- 50 Eriksson M, Guse K, Bauerschmitz G, Virkkunen P, Tarkkanen M, Tanner M, Hakkarainen T, Kanerva A, Desmond RA, Pesonen S, Hemminki A: Oncolytic adenoviruses kill breast cancer initiating cd44+cd24-/low cells. *Mol Ther* 2007;15:2088-2093.
- 51 Kolodkin-Gal D, Zamir G, Pikarski E, Pikarski A, Shimony N, Wu H, Haviv YS, Panet A: A novel system to study adenovirus tropism to normal and malignant colon tissues. *Virology* 2007;357:91-101.
- 52 Escors D, Breckpot K: Lentiviral vectors in gene therapy: Their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*;58:107-119.
- 53 Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D: In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science (New York, NY)* 1996;272:263-267.
- 54 Miyoshi H, Takahashi M, Gage FH, Verma IM: Stable and efficient gene transfer into the retina using an hiv-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10319-10323.
- 55 Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM: Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 1997;17:314-317.
- 56 Rogers AJ, Loggen M, Lee K, Angeletti PC: Varying efficiency of long-term replication of papillomaviruses in *saccharomyces cerevisiae*. *Virology* 2008;381:6-10.

- 57 Demeret C, Desaintes C, Yaniv M, Thierry F: Different mechanisms contribute to the e2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *Journal of virology* 1997;71:9343-9349.
- 58 McPhillips MG, Oliveira JG, Spindler JE, Mitra R, McBride AA: Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *Journal of virology* 2006;80:9530-9543.
- 59 Webster K, Parish J, Pandya M, Stern PL, Clarke AR, Gaston K: The human papillomavirus (hpv) 16 e2 protein induces apoptosis in the absence of other hpv proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem* 2000;275:87-94.
- 60 Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT: Hpv16 e6 and e7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 1989;8:3905-3910.
- 61 Goodwin EC, Yang E, Lee CJ, Lee HW, DiMaio D, Hwang ES: Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10978-10983.
- 62 Desaintes C, Goyat S, Garbay S, Yaniv M, Thierry F: Papillomavirus e2 induces p53-independent apoptosis in hela cells. *Oncogene* 1999;18:4538-4545.
- 63 Gu W, Shi XL, Roeder RG: Synergistic activation of transcription by cbp and p53. *Nature* 1997;387:819-823.
- 64 Massimi P, Pim D, Bertoli C, Bouvard V, Banks L: Interaction between the hpv-16 e2 transcriptional activator and p53. *Oncogene* 1999;18:7748-7754.
- 65 Parish JL, Kowalczyk A, Chen HT, Roeder GE, Sessions R, Buckle M, Gaston K: E2 proteins from high- and low-risk human papillomavirus types differ in their ability to bind p53 and induce apoptotic cell death. *Journal of virology* 2006;80:4580-4590.
- 66 Blachon S, Bellanger S, Demeret C, Thierry F: Nucleo-cytoplasmic shuttling of high risk human papillomavirus e2 proteins induces apoptosis. *J Biol Chem* 2005;280:36088-36098.
- 67 Wright WE, Shay JW: The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol* 1992;27:383-389.
- 68 Burns JE, Walker HF, Schmitz C, Maitland NJ: Phenotypic effects of hpv-16 e2 protein expression in human keratinocytes. *Virology*;401:314-321.
- 69 Matlashewski G: The cell biology of human papillomavirus transformed cells. *Anticancer Res* 1989;9:1447-1456.
- 70 Suh DS, Kim SC, An WG, Lee CH, Choi KU, Song JM, Jung JS, Lee KS, Yoon MS: Differential apoptotic response in hpv-infected cancer cells of the uterine cervix after doxorubicin treatment. *Oncology reports*;23:751-756.
- 71 Arroyo M, Bagchi S, Raychaudhuri P: Association of the human papillomavirus type 16 e7 protein with the s-phase-specific e2f-cyclin a complex. *Mol Cell Biol* 1993;13:6537-6546.
- 72 Fusenig NE, Boukamp P: Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog* 1998;23:144-158.
- 73 Javaherian A, Vaccariello M, Fusenig NE, Garlick JA: Normal keratinocytes suppress early stages of neoplastic progression in stratified epithelium. *Cancer Res* 1998;58:2200-2208.
- 74 Yirrell DL, Roome AP, Darville JM, Ashley CR, Harbour J: Comparison of the continuous cell line 293 with human embryo kidney cells and human embryo fibroblast cells for the cultivation of ocular viruses. *J Clin Pathol* 1983;36:996-999.
- 75 Maytin EV, Habener JF: Transcription factors c/ebp alpha, c/ebp beta, and chop (gadd153) expressed during the differentiation program of keratinocytes in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* 1998;110:238-246.

- 76 Oh HS, Smart RC: Expression of ccaat/enhancer binding proteins (c/ebp) is associated with squamous differentiation in epidermis and isolated primary keratinocytes and is altered in skin neoplasms. *J Invest Dermatol* 1998;110:939-945.
- 77 Hadaschik D, Hinterkeuser K, Oldak M, Pfister HJ, Smola-Hess S: The papillomavirus e2 protein binds to and synergizes with c/ebp factors involved in keratinocyte differentiation. *J Virol* 2003;77:5253-5265.
- 78 Timchenko NA, Wilde M, Nakanishi M, Smith JR, Darlington GJ: Ccaat/enhancer-binding protein alpha (c/ebp alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (waf-1/cip-1/sdi-1) protein. *Genes & development* 1996;10:804-815.
- 79 Missero C, Calautti E, Eckner R, Chin J, Tsai LH, Livingston DM, Dotto GP: Involvement of the cell-cycle inhibitor cip1/waf1 and the e1a-associated p300 protein in terminal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5451-5455.
- 80 Missero C, Di Cunto F, Kiyokawa H, Koff A, Dotto GP: The absence of p21cip1/waf1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes & development* 1996;10:3065-3075.
- 81 Lee D, Lee B, Kim J, Kim DW, Choe J: Camp response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus e2 protein and activates e2-dependent transcription. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:7045-7051.
- 82 Danen EH, Sonnenberg A: Integrins in regulation of tissue development and function. *The Journal of pathology* 2003;201:632-641.
- 83 Oldak M, Smola H, Aumailley M, Rivero F, Pfister H, Smola-Hess S: The human papillomavirus type 8 e2 protein suppresses beta4-integrin expression in primary human keratinocytes. *Journal of virology* 2004;78:10738-10746.
- 84 Wan H, Yuan M, Simpson C, Allen K, Gavins FN, Ikram MS, Basu S, Baksh N, O'Toole EA, Hart IR: Stem/progenitor cell-like properties of desmoglein 3dim cells in primary and immortalized keratinocyte lines. *Stem Cells* 2007;25:1286-1297.
- 85 Villanueva-Toledo J, Ponciano-Gomez A, Ortiz-Sanchez E, Garrido E: Side populations from cervical-cancer-derived cell lines have stem-cell-like properties. *Mol Biol Rep* 2014;41:1993-2004.
- 86 Ortiz-Sanchez E, Santiago-Lopez L, Cruz-Dominguez VB, Toledo-Guzman ME, Hernandez-Cueto D, Muniz-Hernandez S, Garrido E, Cantu-De Leon D, Garcia-Carranca A: Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: Phenotyping, stemness, and human papilloma virus co-receptor expression. *Oncotarget* 2016
- 87 Gilormini M, Wozny AS, Battiston-Montagne P, Ardail D, Alphonse G, Rodriguez-Lafrasse C: Isolation and characterization of a head and neck squamous cell carcinoma subpopulation having stem cell characteristics. *J Vis Exp* 2016
- 88 Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC: Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996;183:1797-1806.
- 89 Kondo T, Setoguchi T, Taga T: Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the c6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:781-786.
- 90 Kaur P, Li A: Adhesive properties of human basal epidermal cells: An analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J Invest Dermatol* 2000;114:413-420.
- 91 Croagh D, Phillips WA, Redvers R, Thomas RJ, Kaur P: Identification of candidate murine esophageal stem cells using a combination of cell kinetic studies and cell surface markers. *Stem Cells* 2007;25:313-318.
- 92 Schluter H, Paquet-Fifield S, Gangatirkar P, Li J, Kaur P: Functional characterization of quiescent keratinocyte stem cells and their progeny reveals a hierarchical organization in human skin epidermis. *Stem Cells* 2011;29:1256-1268.

- 93 Carlson MW, Iyer VR, Marcotte EM: Quantitative gene expression assessment identifies appropriate cell line models for individual cervical cancer pathways. *BMC Genomics* 2007;8:117.
- 94 Pozzi S, Zambelli F, Merico D, Pavesi G, Robert A, Maltere P, Gidrol X, Mantovani R, Vigano MA: Transcriptional network of p63 in human keratinocytes. *PLoS One* 2009;4:e5008.
- 95 Carmo M, Peixoto C, Coroadinha AS, Alves PM, Cruz PE, Carrondo MJ: Quantitation of mlv-based retroviral vectors using real-time rt-pcr. *J Virol Methods* 2004;119:115-119.
- 96 Li A, Kaur P: Facs enrichment of human keratinocyte stem cells. *Methods Mol Biol* 2005;289:87-96.
- 97 Nousbeck J, Sarig O, Avidan N, Indelman M, Bergman R, Ramon M, Enk CD, Sprecher E: Insulin-like growth factor-binding protein 7 regulates keratinocyte proliferation, differentiation and apoptosis. *J Invest Dermatol* 2010;130:378-387.
- 98 Cordani N, Pozzi S, Martynova E, Fanoni D, Borrelli S, Alotto D, Castagnoli C, Berti E, Vigano MA, Mantovani R: Mutant p53 subverts p63 control over klf4 expression in keratinocytes. *Oncogene* 2011;30:922-932.
- 99 Terunuma A, Kapoor V, Yee C, Telford WG, Udey MC, Vogel JC: Stem cell activity of human side population and alpha6 integrin-bright keratinocytes defined by a quantitative in vivo assay. *Stem Cells* 2007;25:664-669.
- 100 Buschke S, Stark HJ, Cerezo A, Pratzel-Wunder S, Boehnke K, Kollar J, Langbein L, Heldin CH, Boukamp P: A decisive function of transforming growth factor-beta/smad signaling in tissue morphogenesis and differentiation of human hacat keratinocytes. *Mol Biol Cell* 2011;22:782-794.
- 101 Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988;106:761-771.
- 102 Miyanishi M, Mori Y, Seita J, Chen JY, Karten S, Chan CK, Nakauchi H, Weissman IL: Do pluripotent stem cells exist in adult mice as very small embryonic stem cells? *Stem Cell Reports* 2013;1:198-208.
- 103 Miyamoto T, Furusawa C, Kaneko K: Pluripotency, differentiation, and reprogramming: A gene expression dynamics model with epigenetic feedback regulation. *PLoS Comput Biol* 2015;11:e1004476.
- 104 Lecardonnel J, Deshayes N, Genty G, Parent N, Bernard BA, Rathman-Josserand M, Paris M: Ageing and colony-forming efficiency of human hair follicle keratinocytes. *Exp Dermatol* 2013;22:604-606.
- 105 Li X, Upadhyay AK, Bullock AJ, Dicolandrea T, Xu J, Binder RL, Robinson MK, Finlay DR, Mills KJ, Bascom CC, Kelling CK, Isfort RJ, Haycock JW, MacNeil S, Smallwood RH: Skin stem cell hypotheses and long term clone survival--explored using agent-based modelling. *Sci Rep* 2013;3:1904.
- 106 Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE: Oct4 expression in adult human stem cells: Evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005;26:495-502.
- 107 Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P: Transcriptional regulation of nanog by oct4 and sox2. *J Biol Chem* 2005;280:24731-24737.
- 108 Chen Y, Sen GL: Sox2 expression inhibits terminal epidermal differentiation. *Exp Dermatol* 2015
- 109 Micallef L, Belaubre F, Pinon A, Jayat-Vignoles C, Delage C, Charveron M, Simon A: Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte hacat cells compared with normal human keratinocytes. *Exp Dermatol* 2009;18:143-151.
- 110 Edmondson SR, Werther GA, Wraight CJ: Calcium regulates the expression of insulin-like growth factor binding protein-3 by the human keratinocyte cell line hacat. *J Invest Dermatol* 2001;116:491-497.

- 111 Denning MF, Dlugosz AA, Williams EK, Szallasi Z, Blumberg PM, Yuspa SH: Specific protein kinase c isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell Growth Differ* 1995;6:149-157.
- 112 Xing F, Liao W, Jiang P, Xu W, Jin X: Effect of retinoic acid on aquaporin 3 expression in keratinocytes. *Genet Mol Res* 2016;15:15016951.
- 113 Poumay Y, Herphelin F, Smits P, De Potter IY, Pittelkow MR: High-cell-density phorbol ester and retinoic acid upregulate involucrin and downregulate suprabasal keratin 10 in autocrine cultures of human epidermal keratinocytes. *Mol Cell Biol Res Commun* 1999;2:138-144.
- 114 Metallo CM, Ji L, de Pablo JJ, Palecek SP: Retinoic acid and bone morphogenetic protein signaling synergize to efficiently direct epithelial differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008;26:372-380.
- 115 Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M: Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability. *Virology* 2009;384:360-368.
- 116 Hamid NA, Brown C, Gaston K: The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:1700-1717.
- 117 Bellanger S, Tan CL, Xue YZ, Teissier S, Thierry F: Tumor suppressor or oncogene? A critical role of the human papillomavirus (hpv) e2 protein in cervical cancer progression. *Am J Cancer Res* 2011;1:373-389.
- 118 Ramirez-Salazar E, Centeno F, Nieto K, Valencia-Hernandez A, Salcedo M, Garrido E: Hpv16 e2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. *Virol J* 2011;8:247.
- 119 Burns JE, Walker HF, Schmitz C, Maitland NJ: Phenotypic effects of hpv-16 e2 protein expression in human keratinocytes. *Virology* 2010;401:314-321.
- 120 Bellanger S, Blachon S, Mechali F, Bonne-Andrea C, Thierry F: High-risk but not low-risk hpv e2 proteins bind to the apc activators cdh1 and cdc20 and cause genomic instability. *Cell Cycle* 2005;4:1608-1615.
- 121 Li L, Piloto O, Nguyen HB, Greenberg K, Takamiya K, Racke F, Huso D, Small D: Knock-in of an internal tandem duplication mutation into murine flt3 confers myeloproliferative disease in a mouse model. *Blood* 2008;111:3849-3858.
- 122 Barrandon Y, Green H: Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:2302-2306.
- 123 Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, Cegalerba M, Maltere P, Zobiri O, Gidrol X, Waksman G, Martin MT: Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells* 2006;24:965-974.
- 124 Torma H: Regulation of keratin expression by retinoids. *Dermatoendocrinol* 2011;3:136-140.
- 125 Deyrieux AF, Wilson VG: In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the hacat cell line. *Cytotechnology* 2007;54:77-83.
- 126 Bikle DD, Xie Z, Tu CL: Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2012;7:461-472.
- 127 Wells SI, Francis DA, Karpova AY, Dowhanick JJ, Benson JD, Howley PM: Papillomavirus e2 induces senescence in hpv-positive cells via prb- and p21(cip)-dependent pathways. *EMBO J* 2000;19:5762-5771.
- 128 Horne GA, Stewart HJ, Dickson J, Knapp S, Ramsahoye B, Chevassut T: Nanog requires brd4 to maintain murine embryonic stem cell pluripotency and is suppressed by bromodomain inhibitor jq1 together with lefty1. *Stem Cells Dev* 2015;24:879-891.

- 129 Helfer CM, Yan J, You J: The cellular bromodomain protein brd4 has multiple functions in e2-mediated papillomavirus transcription activation. *Viruses* 2014;6:3228-3249.
- 130 Centeno F, Ramirez-Salazar E, Garcia-Villa E, Gariglio P, Garrido E: Taf1 interacts with and modulates human papillomavirus 16 e2-dependent transcriptional regulation. *Intervirology* 2008;51:137-143.
- 131 Yang HM, Do HJ, Oh JH, Kim JH, Choi SY, Cha KY, Chung HM, Kim JH: Characterization of putative cis-regulatory elements that control the transcriptional activity of the human oct4 promoter. *J Cell Biochem* 2005;96:821-830.
- 132 Jang MK, Kwon D, McBride AA: Papillomavirus e2 proteins and the host brd4 protein associate with transcriptionally active cellular chromatin. *J Virol* 2009;83:2592-2600.
- 133 Miyanari Y, Torres-Padilla ME: Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of nanog. *Nature* 2012;483:470-473.
- 134 Li X, Li L, Pandey R, Byun JS, Gardner K, Qin Z, Dou Y: The histone acetyltransferase mof is a key regulator of the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell Stem Cell* 2012;11:163-178.
- 135 Kovacevic Grujicic N, Mojsin M, Krstic A, Stevanovic M: Functional characterization of the human sox3 promoter: Identification of transcription factors implicated in basal promoter activity. *Gene* 2005;344:287-297.
- 136 Zhao KN, Masci PP, Chen J, Lavin MF: Calcium prevents retinoic acid-induced disruption of the spectrin-based cytoskeleton in keratinocytes through the src/pi3k-p85alpha/akt/pkcdelta/beta-adducin pathways. *Cell Calcium* 2013;54:151-162.
- 137 Prabhavathy D, Subramanian CK, Karunakaran D: Re-expression of hpv16 e2 in siha (human cervical cancer) cells potentiates nf-kappab activation induced by tnf-alpha concurrently increasing senescence and survival. *Biosci Rep* 2015;35
- 138 Annab LA, Bortner CD, Sifre MI, Collins JM, Shah RR, Dixon D, Karimi Kinyamu H, Archer TK: Differential responses to retinoic acid and endocrine disruptor compounds of subpopulations within human embryonic stem cell lines. *Differentiation* 2012;84:330-343.

