



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE**

**GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Análisis del efecto de E2 del VPH16 sobre la vía  
de p53 en respuesta a daño inducido por  
doxorrubicina”**

**T E S I S**

Que presenta

**Q.F.B. María de los Ángeles Ramírez Venegas**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE  
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Director de tesis:

**Dr. José Efraín Garrido Guerrero**

Ciudad de México

OCTUBRE, 2020

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación en Biología Molecular

y Celular del Cáncer del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Durante el desarrollo de este trabajo, fui becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de registro 925182, por lo que manifiesto mi más sincero agradecimiento a esta Institución por el apoyo económico que me permitió realizar mis estudios de maestría.

# CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>VPH.....</b>	<b>3</b>
Infección viral .....	4
Infección viral y el desarrollo de cáncer cervical .....	6
Genoma viral.....	7
Región de expresión temprana .....	8
Región de expresión tardía .....	10
Región larga de control.....	11
<b>Proteína viral E2 .....</b>	<b>12</b>
<b>Proteína p53.....</b>	<b>15</b>
Funciones de la proteína p53 .....	18
La proteína p53 en la respuesta a daño celular .....	19
Arresto del ciclo celular .....	20
Apoptosis.....	21
Regulación de p53 en la respuesta a daño .....	23
<b>Interacción de p53 con E2 .....</b>	<b>25</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>29</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>32</b>
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
Cultivo celular.....	34
Tratamiento con doxorrubicina .....	34
Western Blot .....	35

Lisado celular .....	35
Cuantificación de proteínas .....	35
Detección por WB .....	36
<b>Ensayo de proliferación celular.....</b>	<b>37</b>
<b>Ensayo de expresión relativa .....</b>	<b>37</b>
Extracción de RNA .....	37
Cuantificación de RNA .....	38
Tratamiento con DNasa I.....	39
PCR de punto final para excluir contaminación con DNA .....	39
Síntesis de cDNA .....	41
qPCR .....	42
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>Determinación de los niveles de la proteína p53 .....</b>	<b>45</b>
<b>La presencia de E2 aumenta la proliferación de las células RKO .....</b>	<b>46</b>
<b>Ensayos de expresión relativa .....</b>	<b>46</b>
Extracción de RNA .....	46
Expresión relativa de genes responsivos a p53.....	48
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>Evaluación de la expresión constitutiva de E2 sobre la vía de p53 .....</b>	<b>55</b>
<b>Evaluación del efecto de la expresión constitutiva de E2 sobre la vía de p53 después de un estímulo de daño con doxorubicina .....</b>	<b>57</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>66</b>

## RESUMEN

El producto del gen E2 de VPH16 es una proteína multifuncional que está involucrada en procesos como regulación de la transcripción, replicación y segregación del genoma viral. Sin embargo, también se ha demostrado que es capaz de activar o reprimir la transcripción de genes celulares, lo cual se propone que ocurre a través de la interacción con múltiples proteínas celulares, entre las cuales destaca p53. La proteína supresora de tumores p53 es un factor de transcripción que funciona como un sensor importante de estabilidad y transformación celular. Cuando la célula recibe señales de estrés tales como daño al DNA, p53 se estabiliza e incrementa su abundancia total para efectuar una respuesta transcripcional inmediata. Dentro de estas respuestas se incluyen: la activación de una gran variedad de vías de señalización, el arresto del ciclo celular, angiogénesis, apoptosis, reparación de DNA, senescencia celular, entre otras.

Debido a la importancia que para el proceso de infección viral podría tener la interacción entre E2 del VPH tipo 16 con la proteína celular p53, en este trabajo se evaluó el efecto de la expresión constitutiva de E216 a través de un sistema lentiviral en un modelo celular en el que el gen p53 se encuentra en estado silvestre (+/+).

Los resultados mostraron que los niveles de la proteína p53, se encuentran disminuidos en células con expresión constitutiva de E216, lo que de algún modo correlaciona con el aumento observado en su proliferación celular. Además, cuando se evaluó la respuesta transcripcional de p53 posterior a un estímulo de daño con doxorubicina, mediante la evaluación de los niveles de mRNA de algunos de sus genes de respuesta, como p21 y Mdm2, se observó una respuesta disminuida en las células que contienen a E216.

Estos resultados indican que la expresión constitutiva de la proteína E2 del VPH16, afecta procesos celulares fundamentales, como la proliferación y la respuesta a daño al DNA, y que estos efectos pueden ser debidos a la disminución de los niveles proteicos de p53. Aunque los mecanismos mediante los cuales sucede esta disminución se desconocen, diversas evidencias indican que puede deberse a un incremento en su tasa de degradación proteosomal, ya sea mediada por su

interacción directa con E2, o bien mediante su interacción con algunas otras proteínas de importancia celular.

## ABSTRACT

The HPV16 E2 gene product is a multifunctional protein involved in processes such as regulation of transcription, replication, and segregation of the viral genome. However, it has also been shown that it is capable of activating or repressing the transcription of cellular genes, which is proposed to occur through interaction with multiple cellular proteins, p53 among others. For its part, the tumor suppressor protein p53 is a transcription factor that functions as an important sensor of cell stability and transformation. When the cell receives stress signals such as DNA damage, p53 stabilizes and increases its total abundance to effect an immediate transcriptional response. These responses include: the activation of a wide variety of signaling pathways, cell cycle arrest, angiogenesis, apoptosis, DNA repair, cell senescence, among others.

Due to the importance that the interaction between E2 of HPV type 16 with the cellular protein p53 could have for the viral infection process, in this work we evaluated the effect of the constitutive expression of E216 through a lentiviral system, in a cellular model where the p53 gene is found in wild-type status (+/+).

The results showed that the levels of the p53 protein are decreased in cells with constitutive expression of E216, which in some way correlates with the observed increase in cell proliferation. In addition, when the transcriptional response of p53 was evaluated after a damage stimulus with doxorubicin, by evaluating the mRNA levels of some of its response genes, such as p21 and Mdm2, a decreased response was observed in cells containing E216.

These results indicate that the constitutive expression of HPV16 E2 protein affects fundamental cellular processes, such as proliferation and response to DNA damage, and that these effects may be due to the decrease in protein levels of p53. Although the mechanisms by which this decrease occurs are unknown, various evidences indicate that it may be due to an increase in its proteosomal degradation rate, either

mediated by its direct interaction with E2, or by its interaction with some other proteins of cellular importance.

## INTRODUCCIÓN

### VPH

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus icosaédrico no envuelto, de aproximadamente 55 nm de diámetro con DNA circular de doble cadena que pertenece a la familia taxonómica *Papillomaviridae* (1).

Este grupo de virus infecta mamíferos incluyendo humanos y existen alrededor de 200 genotipos, los cuales difieren entre sí por al menos 10% de su secuencia en el gen L1. Estos genotipos han sido clasificados en 5 grupos o géneros ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ ) de los cuales, el grupo más grande es el  $\alpha$  e incluye a los genotipos llamados de alto riesgo, el grupo  $\beta$  contiene algunos genotipos asociados con tumores humanos y los grupos  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\nu$  normalmente causan sólo lesiones benignas (2).

El VPH tiene afinidad por epitelio escamoso o membranas mucosas. Específicamente en humanos, 40 tipos de VPH están relacionados con infecciones de transmisión sexual, manifestándose como verrugas u otras lesiones anogenitales, algunas de las cuales han sido identificadas en el cérvix, ano, vulva y vagina en mujeres y en el caso de los hombres en pene y ano, siendo éstas últimas menos caracterizadas. Las infecciones genitales persistentes con este virus pueden causar cáncer cervical en mujeres y otros tipos de cáncer anogenital, cabeza y cuello tanto en mujeres como en hombres (3). Dependiendo del genotipo de VPH que infecte, la siguiente tabla muestra algunas lesiones que pueden ser observadas en el hospedero:

<b>Genotipo de VPH</b>	<b>Tipo de lesión</b>
<b>1,2,3,4,7,10,26,27,28,29,41,48,50,57,60,63, 65,75,76,77,88,95</b>	Lesiones benignas, principalmente verrugas.
<b>6,11</b>	Genotipos de bajo riesgo oncológico, causan verrugas genitales.
<b>5,8,9,12,14,15,17,19,20,21,22,23,24,25,36,37,38,46,47,49,75,76,80,92,93,96</b>	Lesiones benignas asociadas a <i>epidermodysplasia verruciformis</i> .
<b>16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,73,82</b>	Genotipos de alto riesgo oncológico, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado con posibilidades de progresión, cáncer de cabeza y cuello.

Modificado Celewicz A, Celewicz M; 2020, Graham S; 2017(1,4).

Como lo muestra la tabla, sólo algunos genotipos de VPH han sido asociados con la formación de lesiones malignas y el desarrollo de cáncer, de estos, el VPH16 fue definido en 1995 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un agente viral promotor de tumores, ya que es responsable de aproximadamente el 55% de los casos de cáncer cervical, en tanto que el VPH18 se estima que causa el 15% y el resto de los casos que causan cáncer corresponden a los denominados VPHs de alto riesgo (3).

A pesar de que la vacuna contra infecciones de VPH de alto riesgo ha estado disponible desde 2006, esta es de tipo profiláctica y ha sido aplicada principalmente a niñas de entre 10 y 12 años, además es una de las vacunas de más alto costo de producción, lo que hace difícil su distribución por todo el mundo (1). De esta manera, el cáncer cervical asociado con VPH continúa siendo el cuarto tipo de cáncer más común en mujeres y la causa más común de muerte relacionada a cáncer en esta misma población. Se estiman 266 000 muertes y 560 000 nuevos casos registrados por año, de los cuales aproximadamente el 80% ocurren en regiones desarrolladas; siendo la mayoría de los diagnósticos en mujeres de entre 30 y 55 años (5,6).

## Infección viral

El virus del papiloma humano se transmite por contacto de piel a piel o de mucosa a mucosa y entra a través de una microlesión del tejido, infectando principalmente queratinocitos primarios de las capas basales del epitelio escamoso estratificado. La infección se da por la interacción de la proteína de la cápside L1 del virus con

receptores celulares localizados en la membrana basal o en la superficie de las células de la capa basal. Entre los receptores conocidos están heparán sulfato, integrina- $\alpha_6$ , vimentina, lamininas, el factor de crecimiento epidermal y la anexina-A2 (1,7,8).

Los virus infectan de manera inicial en un bajo número de copias a queratinocitos primarios de la piel o mucosa en las capas basales del epitelio escamoso estratificado; el genoma viral es depositado en el núcleo celular y comienza la expresión de proteínas virales tempranas, lo que conlleva a una primera ronda de replicación de DNA que parece ser independiente del ciclo celular y que amplifica el número de copias virales a aproximadamente 50-100 copias por célula (2,9).

Posteriormente, en las células infectadas, la mayoría de los genomas del VPH permanece en estado episomal, donde la expresión genética es mínima y particularmente la expresión de los oncogenes E6 y E7 se encuentran bajo estricto control y de manera importante por la proteína E2. De esta forma no hay un efecto citolítico en las células, lo que causa una ausencia de respuesta inmune en esta fase temprana de la infección, permitiendo así la persistencia de la misma y la posibilidad de una progresión cancerosa (2,4,9).

Si la infección no es resuelta por el sistema inmune, las células basales infectadas comienzan a dividirse y los genomas virales se replican y se segregan en las células hijas, las cuales se convierten en una célula transitoriamente amplificada que está destinada a completar la diferenciación del epitelio y desplazarse a través de las capas epiteliales. Durante este proceso, existe un patrón de expresión viral que responde a la diferenciación del queratinocito, lo que lleva a una amplificación del genoma viral de por lo menos 1000 copias por célula y la expresión de proteínas virales de expresión temprana y tardía las cuales son requeridas para lograr una productiva amplificación del genoma viral y la producción de viriones. Los eventos de expresión tardía ocurren específicamente en las últimas capas más diferenciadas del epitelio (Figura 1)(9). El ciclo viral toma aproximadamente 2-3 semanas *in vivo*, el tiempo que toma el queratinocito basal para moverse a través del epitelio y diferenciarse (3).

## Infeción viral y el desarrollo de cáncer cervical

El cáncer cervical está caracterizado por una fase premaligna bien definida que es detectable mediante examinación citológica. Estos cambios representan un espectro de anomalías histológicas que se denominan neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) que van desde el tipo 1 (displasia leve), tipo 2 (displasia moderada) y tipo 3 (displasia severa/carcinoma *in situ*). Evidencia epidemiológica, muestra claramente que las infecciones por VPH son la causa de las NIC de todos los grados y que el punto de inicio más común en el proceso oncogénico es el desarrollo de infección persistente. La mayoría de las lesiones NIC1 mantienen al virus en forma episomal, lo que le confiere la capacidad para completar su ciclo de replicación y producir nuevas partículas virales, por otro lado, en las lesiones NIC2 y NIC3 que están asociadas con genotipos de alto riesgo y que están caracterizadas por defectos en la diferenciación celular, la expresión de los genes tardíos está reducida de forma significativa y el genoma viral se integra en la célula hospedera (3,10).

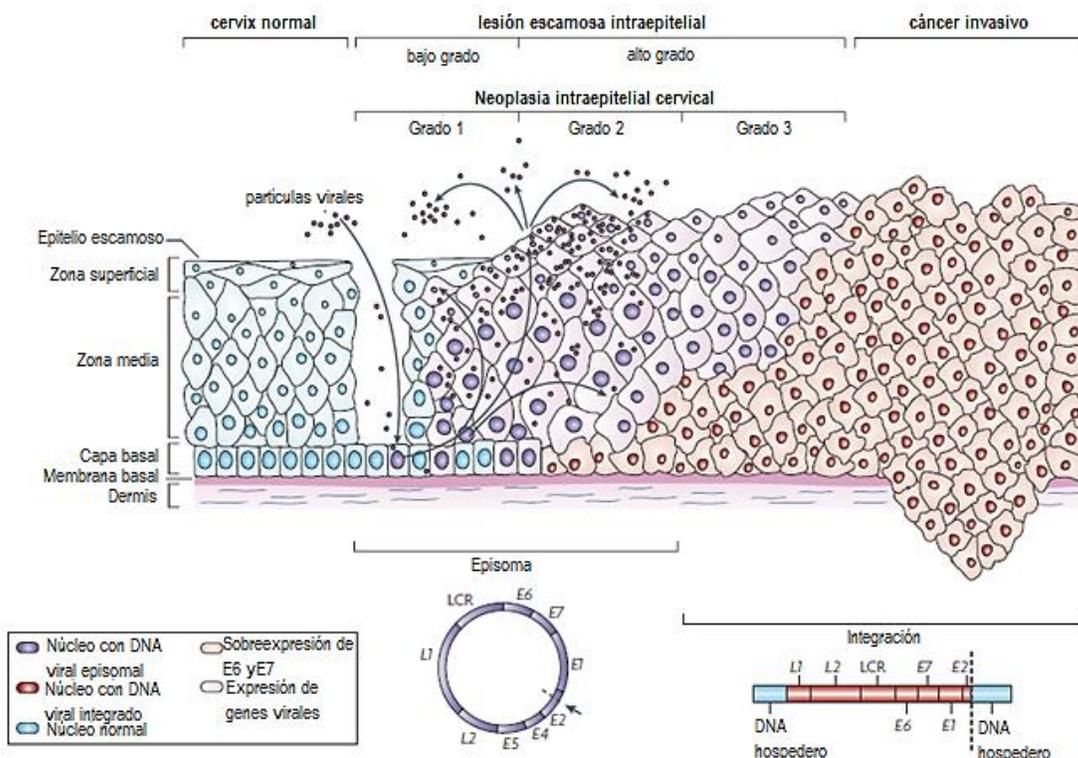


Figura 1. Ciclo infeccioso del VPH. Modificado de Woodman C, Collins S, Young L; 2007(10).

Se ha visto que este evento de integración depende del genotipo, por ejemplo, en el VPH16 aproximadamente el 30% de los cánceres cervicales contienen formas episomales del virus, mientras que en otros genotipos como el VPH 18 casi siempre se encuentran solo formas integradas en mujeres con NIC3 y cáncer invasivo. Durante la integración del genoma viral, generalmente se rompe el marco de lectura en la región del gen E1 o E2, lo cual detiene la transcripción de estos genes generando una expresión incontrolada de las proteínas E6 y E7 que tienen un papel muy importante en la carcinogénesis cervical. Si el evento de integración por sí mismo es crucial para el desarrollo de cáncer es aún motivo de investigación (4,10).

## Genoma viral

El genoma de los papilomavirus comprende aproximadamente 8 Kb de DNA circular de doble cadena que se ha dividido en 3 regiones principalmente; una región de expresión temprana (E) que ocupa aproximadamente 50% del genoma viral y contiene marcos de lectura abiertos (ORFs) para al menos 7 proteínas reguladoras, una región de expresión tardía (L) que ocupa el 40% del genoma y codifica para dos proteínas estructurales y una región larga de control (LCR) que ocupa el 10% restante del genoma y contiene el origen de replicación y secuencias para el control de la transcripción. Las tres regiones están separadas por dos sitios de poliadenilación (pA); temprano (A<sub>E</sub>) y tardío (A<sub>L</sub>) (11).

El genoma está encapsulado en una cápside icosaédrica formada por 360 copias de la proteína L1 organizadas en 72 capsómeros que contienen una copia de la proteína L2 en el centro (Figura 2)(9).

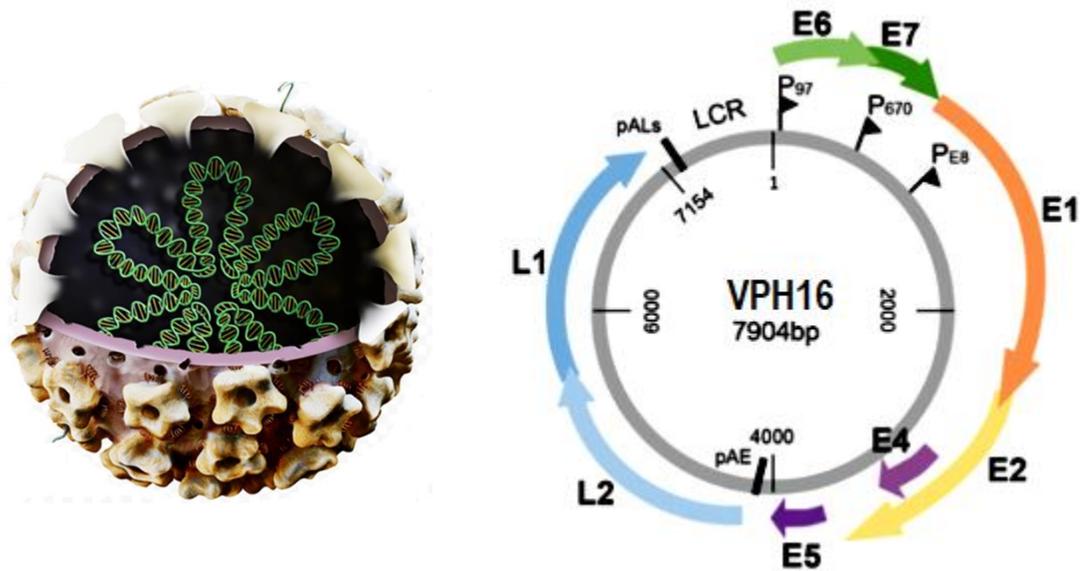


Figura 2. Estructura ilustrativa de la cápside (izquierda) y genoma del VPH16 (derecha). Tomada de Ginecoweb [Internet], Graham S, 2017 (1,12).

### Región de expresión temprana

Esta región incluye 7 marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican para las proteínas virales E1, E2, E4, E5, E6, E7 las cuales están involucradas en procesos de replicación y transcripción principalmente. El promotor P97 se encuentra río arriba del ORF del gen E6 y es responsable de casi toda la expresión de la región temprana (13).

#### E1

La proteína más conservada codificada por los papilomavirus es E1, codifica para una DNA helicasa dependiente de ATP de 68 kD que puede unirse a regiones ricas en AT como el origen de replicación, esta unión es débil y se estabiliza gracias a la proteína E2. Estudios celulares han demostrado que E1 es requerida para la amplificación del genoma que ocurre debido a la diferenciación celular, además, ha mostrado unirse a otras proteínas celulares incluyendo H1, SW1/SNF5, ciclina E, Hsp40/Hsp70 entre otras (13,14). E1 junto con la proteína E2 son las primeras proteínas expresadas durante la infección, debido a que el objetivo principal de los primeros virus es iniciar la replicación del genoma.

## E2

E2 es una proteína de unión a DNA que se une a secuencias blanco en la LCR conocidas como sitios de unión a E2 (E2BSs). Dos de estos sitios están próximos al promotor temprano P97, un tercero cerca del origen de replicación del DNA y un cuarto en la región enhancer (Figura 3). Cuando se une alrededor del origen de replicación, recluta a la helicasa E1 la cual forma un complejo di-hexamérico que replica el genoma viral a través de la interacción con proteínas del hospedero.

A través de la unión de E2 a sitios próximos al promotor temprano constitutivo P97, se sabe que puede regular de forma negativa la expresión de las proteínas virales E6 y E7, inhibiendo el acceso de factores de transcripción al promotor y alterando la conformación de la cromatina (15). De esta manera, el virus es capaz de mantener a las proteínas virales expresadas a niveles bajos en los tiempos tempranos de infección y por un tiempo significativo para evadir la respuesta inmune local.

## E4

E4 es una proteína que está incrustada en el gen E2 y es expresada en primera instancia como una proteína de fusión E1<sup>E4</sup> durante las etapas tardías del ciclo viral. Se une a filamentos de citoqueratina interrumpiendo su estructura y se cree que desempeña un papel en el escape viral de las capas epiteliales cornificadas; E4 puede potenciar la amplificación del genoma directamente a través de la regulación del arresto del ciclo celular y activando cinasas principalmente (16).

## E5

Otra proteína codificada por la región de expresión temprana es E5, una proteína pequeña de 83 aminoácidos altamente hidrofóbica transmembranal que forma dímeros, interactúa y activa receptores tirosina cinasa incluyendo EGFR (Receptor del Factor de crecimiento Epidermal) que de acuerdo a diferentes estudios ha sugerido que ejerce un efecto transformante en la célula a través de la interacción con esta vía de señalización. También se ha reportado que estas proteínas juegan un papel importante en apoptosis y en la evasión de la respuesta inmune (16,17).

## E6 y E7

A pesar de su designación como oncoproteínas, se ha visto que la actividad biológica de estas proteínas es importante en la replicación viral del ciclo infeccioso. Por ejemplo; se ha demostrado que E6 es requerida para el mantenimiento del genoma episomal, mientras que, la expresión de E7 en la infección temprana, activa el punto de control G1-S en queratinocitos, expandiendo así la cantidad de células epiteliales activas en la replicación del DNA, el cual es un paso importante para completar la segunda fase de replicación productiva del genoma viral en las células de las capas epiteliales medias y superiores que normalmente salen del ciclo celular. Además, E7 puede activar o inhibir factores de transcripción como STAT1, NF-Kb, SMAD2/3, TBP, c-Myc, c-Jun, E2F1; lo que sugiere el potencial de esta proteína viral para promover cambios transcripcionales en las células infectadas. Se sabe que como oncoproteína se une y degrada al supresor de tumores retinoblastoma (pRB), contribuyendo de esta forma a la progresión maligna a través de la inducción de inestabilidad genómica (1,16).

La función más estudiada y conocida de E6 es su unión a la proteína celular p53, llevándola a su degradación y por tanto la inhibición de su actividad transcripcional. E6 también es capaz de cambiar la conformación de p53 o secuestrarla directamente en el citoplasma, permitiendo a las células infectadas sobrevivir y continuar la replicación viral (9).

E7 está siempre presente con E6 en las células infectadas debido a la naturaleza bicistrónica en la región codificante del genoma, de esta manera las actividades de una serán afectadas por la otra, o incluso potenciadas, por ejemplo, en la evasión del sistema inmune.

## Región de expresión tardía

Los genes de transcripción tardía incluyen a L1 y L2, los cuales codifican proteínas estructurales de la cápside viral; la proteína básica de mayor proporción (L1) y la proteína básica de menor proporción (L2).

La infección viral productiva se completa cuando la célula sale del ciclo celular y la expresión de L1 y L2 permiten el empaquetamiento del genoma viral. El ensamblado del virión ocurre en el núcleo de queratinocitos diferenciados. Cada cápside contiene 72 capsómeros pentaméricos cada uno hecho de 5 proteínas L1 por 1 de L2. El ORF para L1 es el más conservado entre los papilomavirus y es usado para la organización filogenética y clasificación de los papilomavirus humanos.

La proteína L1 se autoensambla en las partículas virales, mientras que L2 tiene un papel menos conocido, pero se sospecha que debe incrementar la eficiencia de esta reacción o estar involucrada con la producción de viriones (7,18).

### Región larga de control

La región larga de control también llamada URR (región reguladora río arriba) o NCR (región no codificante), comprende un segmento de aproximadamente 850 pb y no tiene una función codificante.

Está físicamente dividida en 3 regiones; la región 5' que contiene un sitio de unión a E2 (E2bs), además de los sitios de terminación de la transcripción y el sitio de poliadenilación tardía (pAL) para los transcritos L1 y L2; la región central que está flanqueada por dos E2bs se ha demostrado que funciona como un enhancer transcripcional específico de epitelio, además contiene algunos motivos que son sitios de unión para AP1, NF1, OCT1, YY1, entre otros que son importantes para estimular o suprimir la actividad transcripcional del virus, por lo que la activación o represión de los promotores tempranos y tardíos de los papilomavirus humanos involucra un sinergismo entre estas proteínas, las cuales varían su afinidad por los diferentes elementos reguladores en la LCR de los diferentes genotipos de VPH. Finalmente la región 3' contiene 2 sitios E2bs y un sitio de unión a E1 que sobrelapa el origen de replicación (ori) (19).

Esta región del genoma, como se mencionó previamente contiene las secuencias cis-reguladoras que controlan la replicación y transcripción viral, además del control post-transcripcional vía LRE (Elemento regulador tardío). La figura 3 muestra a

detalle los elementos de importancia tales como el origen de replicación (círculo morado) y cuatro sitios de unión a E2 (cuadros verdes)(1,4).

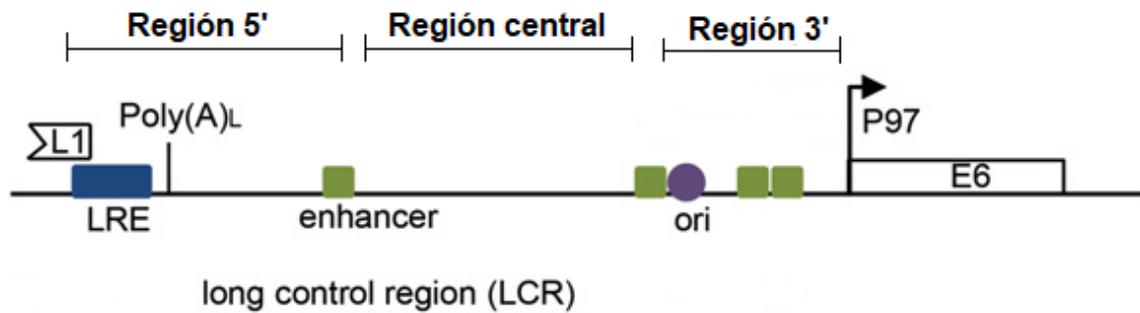


Figura 3. Estructura de la región larga de control del VPH16. Modificada de Graham S; 2017(1).

### Proteína viral E2

E2 es una proteína multifuncional de 350 a 500 aa que está involucrada en muchos procesos virales, principalmente regulación de la transcripción y replicación del genoma viral. Es expresada en etapas tempranas e intermedias del ciclo infeccioso.

Estructuralmente, E2 posee un dominio N-terminal de transactivación/transrepresión de aproximadamente 200 aa y un dominio C-terminal de unión a secuencia específica de DNA (ACCGN<sub>4</sub>CGGT) de aproximadamente 100 aa, ambos dominios están conectados por una región llamada bisagra que es rica en serina y arginina que varía en su tamaño y secuencia entre los papilomavirus (figura 4).

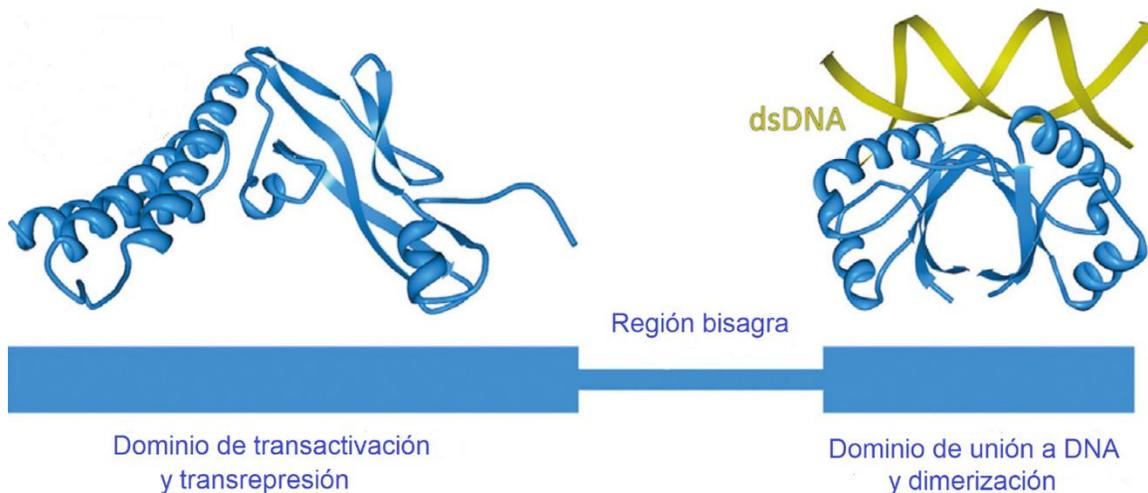


Figura 4. Estructura de la proteína E2 del VPH16. Modificada de Iftner T, 2017 (20).

La proteína E2 tiene un tiempo de vida corto que es regulado por múltiples factores, la proteína completa dura 40 minutos desde que es traducida y las formas pequeñas de E2 resultantes del proceso de procesamiento de su RNA (splicing) duran apenas entre 10 y 15 minutos (21).

En células no diferenciadas, E2 se transcribe desde el promotor temprano y termina en el sitio de poliadenilación temprano, posteriormente las células se van diferenciando en el epitelio y el promotor tardío se activa y transcribe usando aún la señal de poliadenilación temprana, lo que continúa favoreciendo la presencia de la proteína E2, la cual es requerida para la amplificación del genoma viral. (20,21).

El papel más estudiado de la proteína E2 es su participación como auxiliar en la replicación viral, ya que en el origen de replicación interactúa y recluta a la helicasa E1 que a su vez recluta a la maquinaria de replicación de DNA. Además, E2 desplaza nucleosomas del origen de replicación para aliviar la represión. Por otra parte, dentro de las proteínas virales con las que es capaz de interactuar se encuentran la helicasa E1, E4, E6, E7, L1 y L2; en particular la unión con L2 se ha visto que no es absolutamente necesaria para el empaquetamiento de las nuevas partículas virales, pero es probable que pueda favorecer el proceso (22).

E2 ejerce sus funciones a través de su interacción directa con diferentes factores celulares, ya sea para la expresión del genoma viral, segregación o replicación del mismo o para proveer condiciones celulares favorables para el virus. La recolección en tres diferentes bases de datos, señaló al menos 57 proteínas celulares que se unen a una o varias proteínas E2; un análisis posterior más fino determinó cuatro familias de proteínas con base en los procesos biológicos celulares donde participan y que tienen mayor interacción con E2, siendo estos procesos: la regulación de la transcripción, procesamiento de RNA, apoptosis y ciclo celular (figura 5). Estas interacciones fueron detectadas con los tres dominios de E2, aunque la mayoría compromete el dominio N-terminal de transactivación (23).

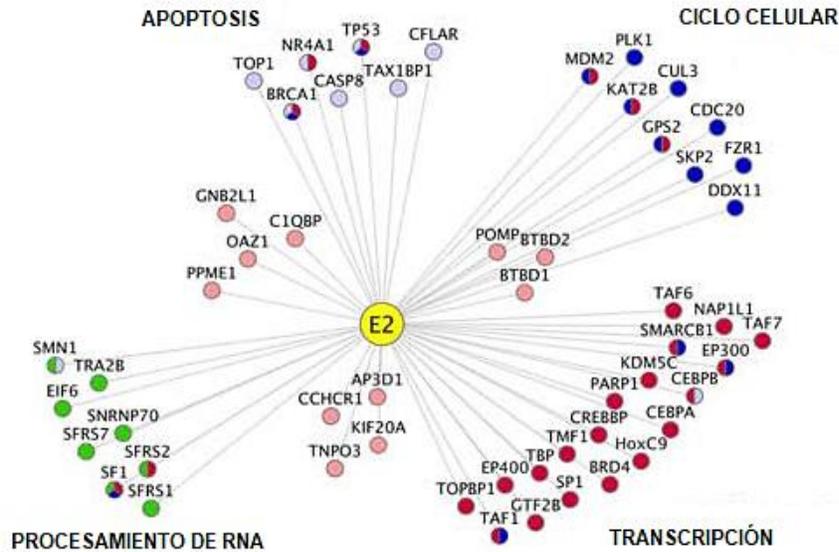


Figura 5. Representación de cuatro familias de proteínas que interactúan con la proteína viral E2. Modificada de Muller M, 2012 (23).

En cuanto a su papel como principal regulador transcripcional de los papilomavirus, E2 interactúa y recluta factores celulares que, de acuerdo a su naturaleza, pueden activar o reprimir la transcripción. Una de las interacciones más estudiadas de la proteína E2 es con la proteína 4 que contiene bromodominio (Brd4) que pertenece a la familia BET (Bromodomain and extra-terminal domain) y tiene la capacidad de unirse a histonas acetiladas e interactuar con p-TEFb para estimular a la RNA Polimerasa II, reclutando a su vez una variedad de factores de transcripción y reguladores de la cromatina. Se sabe que la unión de Brd4 a E2 previene la degradación de la proteína E2, ayuda a la modulación de la transcripción que es mediada por E2 y la mantiene sujeta y estable a los cromosomas del hospedero durante la mitosis para prevenir la pérdida de los genomas virales (20,24). Además, la modulación de la transcripción por parte de la proteína E2 puede ser a través de la modificación del código de histonas, interactuando directamente con acetiltransferasas de histonas como PCAF, EP300 o CBP y algunos miembros de complejos remodeladores de la cromatina como Hsnf5 y NAP1L1 (23).

En cuanto a la interacción de E2 con proteínas que participan en apoptosis, cabe mencionar que la actividad pro-apoptótica de esta proteína es una de las funciones independientes a la unión con el genoma viral que se describieron primero. Se sabe

actualmente que las interacciones responsables de este evento son principalmente con p53, CASP8 y C-FLAR, sin embargo, se sugiere que E2 puede impactar en múltiples pasos a través de su interacción con más participantes tanto de la vía intrínseca como extrínseca, para regular la muerte celular dependiendo el contexto (23,25).

En el ciclo celular, se ha visto que las proteínas E2 de los VPH de alto riesgo 16 y 18 interactúan con CDC20 y FZR1 que son subunidades que reconocen sustratos del complejo promotor de anafase (APC/C). Este complejo es responsable de la transición hacia la etapa de anafase en la división celular a través de la degradación de sustratos específicos como la ciclina B, por lo que la unión de las subunidades CDC20 y FZR1 con E2 inhibe la degradación de ciclina B llevando a un arresto en metafase e inestabilidad genómica, impactando fuertemente en el ciclo celular (26).

El análisis del interactoma de E2 provee un panorama de las funciones y por tanto el impacto que tiene en los procesos celulares del hospedero. Es de interés la interacción con reguladores tanto positivos como negativos del mismo proceso, ya que indica la dualidad de sus funciones que ayudarán a la supervivencia del virus en diferentes etapas de su ciclo viral.

### Proteína p53

La interacción principal que es motivo de estudio en este trabajo es la de E2 con la proteína celular p53, la cual es un factor de transcripción y supresor de tumores, además, debido a su participación principal en la respuesta a daño de DNA es conocida como “el guardián del genoma”.

Es una proteína de 53 kD que en humanos es codificada por el gen TP53, que está ubicado en el brazo corto del cromosoma 17, específicamente en la posición 17p1.3. Contiene 393 aminoácidos y cuenta con 5 dominios funcionales (figura 6) que participan de manera coordinada para llevar a cabo las funciones requeridas por la célula en un momento específico (27).

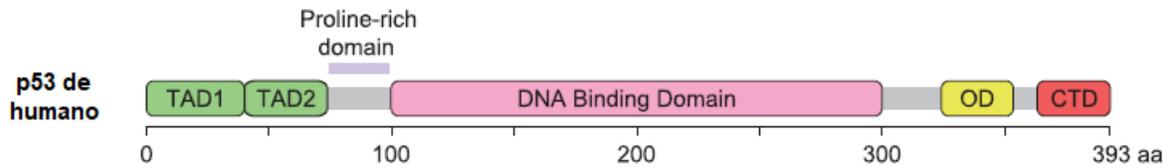


Figura 6. Dominios estructurales de la proteína p53. Modificada de Sullivan KD, 2018.

El dominio N-terminal de transactivación (TAD) dividido en dos subdominios (TAD1 y TAD2) que van de los residuos 1-40 y 40-61 respectivamente y que son requeridos para la actividad transcripcional e interacción con muchas proteínas, incluyendo los factores de transcripción TFIID, TFIIH y algunos TAFs. Es importante señalar que cada subdominio es requerido para la transactivación de diferentes genes blanco, por ejemplo, TAD1 tiene un papel predominante en genes que participan en el arresto celular en G1 y apoptosis, además se ha visto que mutaciones en el TAD1 muestra efectos más graves en las funciones de p53 comparado con mutaciones en el TAD2 (28,29).

El siguiente es un dominio rico en prolina (PRD) que va del residuo 64-92; es importante para la actividad apoptótica, la estabilidad de la proteína, la actividad transcripcional y es necesaria para la restricción del crecimiento celular (28,30).

Uno de los dominios de mayor extensión es el central de unión a DNA (DBD). Implica del residuo 100 al 300 y es el sitio cuyas mutaciones están más asociadas a cáncer. Este dominio puede reconocer y unirse directamente a los elementos de respuesta a p53 (p53RE) en el genoma, los cuales consisten de dos copias del motivo de 10 pb 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' (figura 7); cada motivo de 10pb se divide a la mitad, resultando en cuatro partes, permitiendo que cada monómero de la proteína p53 pueda unirse a una cuarta parte del motivo. Cada parte adopta una orientación canónica "cabeza a cabeza", sin embargo, pueden formar diferentes arreglos según su orientación, dando la posibilidad de que exista un rango de afinidades para su unión. Un escaneo en el genoma identificó entre 14000 y 21000 sitios posibles de unión a p53, pero menos del 50% de estos se confirmaron en experimentos de CHIP-seq, lo que señala que el tipo de unión con el sitio consenso, el estatus de la cromatina y la cantidad de moléculas de p53 en un determinado momento celular determinan la interacción de la proteína con sus genes blanco (28,29). El DBD

contiene además algunos aminoácidos electropositivos y un átomo de zinc los cuales hacen posible la interacción con la molécula de DNA (31).

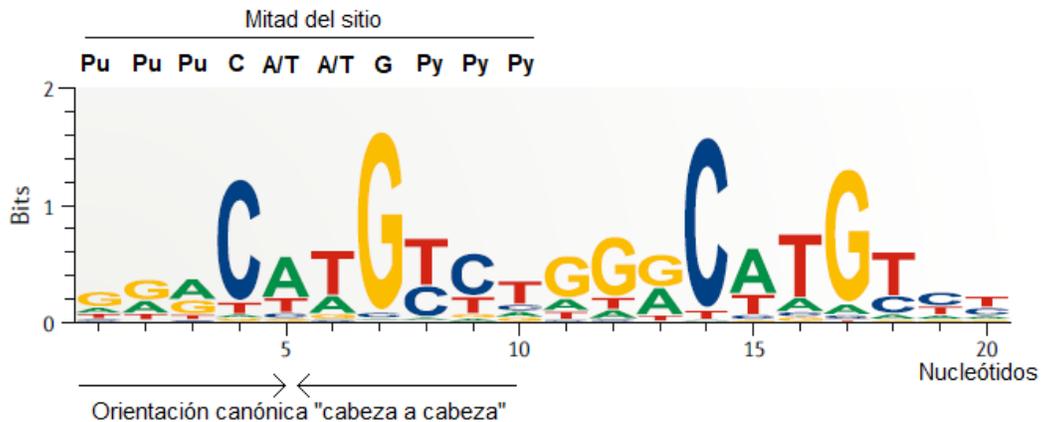


Figura 7. Sitio consenso de unión a p53. Pu: Purina, Py: Pirimidina. Modificada de Hafner A, 2019 (29).

El dominio de oligomerización (OD) o también llamado dominio de tetramerización (TD), va del residuo 326 al 356 y es responsable de la formación del tetrámero de p53 que es esencial para la unión sitio específica al DNA, modificaciones post-traduccionales y las interacciones proteína-proteína.

Mutaciones en este dominio afectan la unión de p53 al DNA, ya que cada monómero se une a una cuarta parte del sitio consenso en los genes blanco, por lo que se ha visto que resulta en la pérdida de su actividad transcripcional. En cuanto a las modificaciones post-traduccionales, por ejemplo, se ha visto que la fosforilación de la serina 20 de p53 que inhibe su interacción con MDM2, requiere de la tetramerización. Por otro lado, muchas proteínas se unen directamente a este dominio o sus interacciones con p53 se ven afectadas por el estatus oligomérico, tal es el caso de la proteína pro-apoptótica BAK cuya interacción principal con p53 es a través de este dominio, también el transporte de p53 es mediado por una señal de exportación rica en leucina (NES) localizada en el dominio TD, lo que hace que la formación del tetrámero evite el transporte nuclear de la proteína (29,30).

Finalmente, el dominio regulador C-terminal (CTD) (residuos 363-393) es un sitio altamente desestructurado y modificado post-traduccionalmente, en particular, sirve como sitio primario de acetilación. Actúa como una región flexible e influye

positivamente en el escaneo a lo largo del DNA y la estabilidad de la unión con este para el reconocimiento de los elementos de respuesta a p53. Se ha visto que dependiendo del contexto y disponibilidad de factores que se unen a él, puede adoptar diferentes cambios conformacionales, afectando la función de p53 tanto de forma positiva como negativa; en resumen, es un fuerte modulador de la función de p53 como factor de transcripción, además se ha visto involucrado como mediador en la tetramerización (28,29).

### Funciones de la proteína p53

La proteína p53 fue inicialmente reconocida como un supresor de tumores en 1989 y actualmente se sabe que es el gen más frecuentemente mutado en todos los cánceres humanos (32). Sus mutaciones resultan en la pérdida de sus funciones fisiológicas, principalmente su actividad transcripcional, la cual es capaz de controlar diferentes genes blanco involucrados en una alta variedad de vías de señalización celulares, tales como arresto del ciclo celular, angiogénesis, apoptosis, reparación del DNA y senescencia celular (figura 8). Para extender esta idea, un perfil transcripcional demostró que había entre 100 y 1500 genes afectados por p53 dependiendo del contexto celular (29,33).

Como factor de transcripción, p53 se ensambla como un tetrámero y el DBD reconoce los elementos de secuencia específica para p53 que se encuentran en los genes blanco y es a través de los dominios TAD, los cuales interactúan con un rango muy amplio de cofactores transcripcionales que determinarán la vía de señalización que se activará dependiendo del contexto celular (34).

Es un hecho que p53 regula de forma directa la activación transcripcional, sin embargo, sus funciones como represor directo han sido motivo de debate. Estudios recientes han dejado claro que la represión por parte de esta proteína es de forma indirecta y encabezada por efectores río abajo como p21 (CDKN1A), E2F7 y miRNAs. Es posible que p53 actúe como represor en situaciones únicas, por ejemplo en ciertos tipos de células, en respuestas específicas de daño o en cinéticas definidas (28).

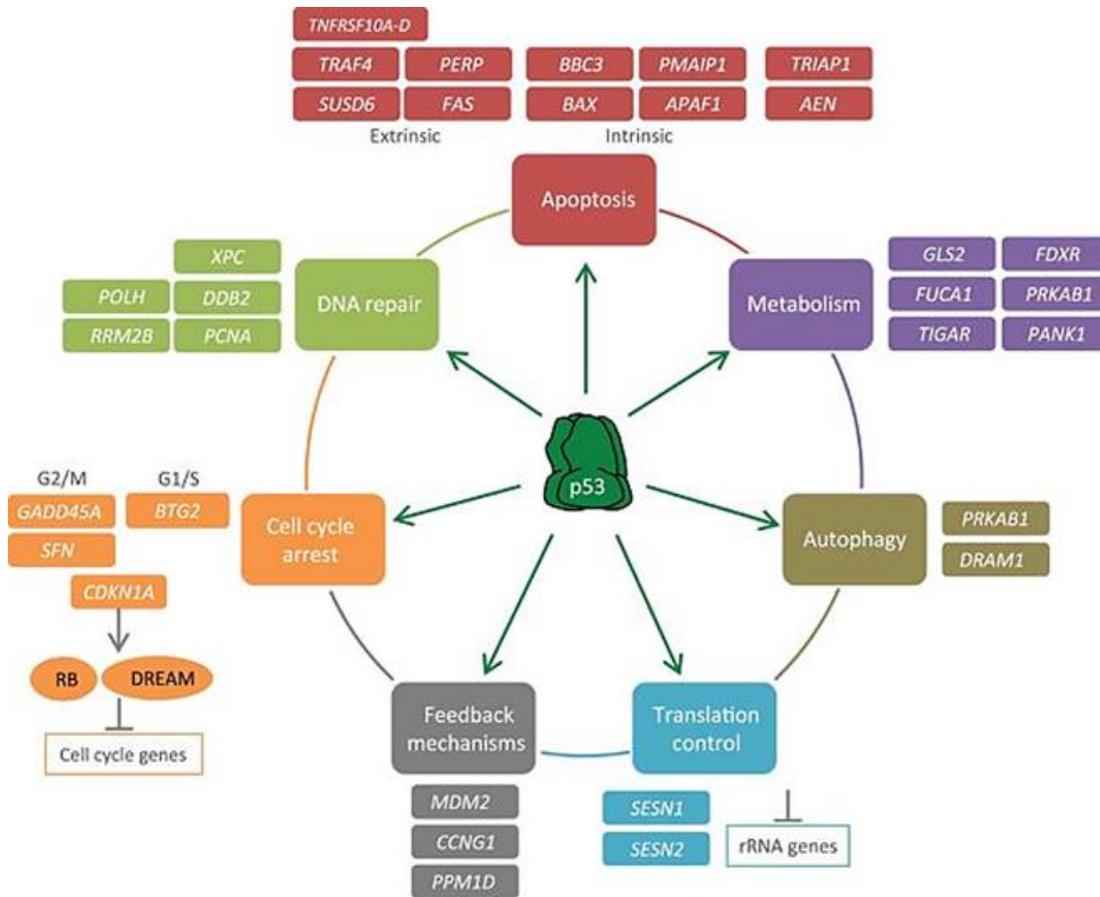


Figura 8. Procesos celulares y genes blanco activados transcripcionalmente por p53. Tomada de Fischer M, 2017 (33).

### La proteína p53 en la respuesta a daño celular

Bajo condiciones normales de crecimiento, p53 es mantenido en niveles bajos por la ubiquin-ligasa E3 MDM2, que en complejo con MDM4 llevan a cabo su degradación proteolítica. Debido a su capacidad de funcionar como un sensor importante de estabilidad y transformación celular, cuando la célula recibe señales de estrés tales como daño al DNA, activación oncogénica, hipoxia, depleción de nutrientes o estrés ribosomal, p53 se estabiliza e incrementa su abundancia total para efectuar una respuesta transcripcional inmediata. En respuesta al estrés, puede llevar a la célula al arresto del ciclo celular, apoptosis, reparación de daño, cambios metabólicos o senescencia. La elección de la vía que se activará está basada en la magnitud, tipo de daño al DNA y tipo celular en donde se encuentre el daño (29,32).

Daños leves normalmente inducen arresto del ciclo celular, mientras que daños severos pueden activar programas de senescencia o muerte, en estos últimos se incluyen apoptosis, autofagia y necrosis (35).

### Arresto del ciclo celular

El arresto en el ciclo celular es de los eventos más evidentes generados por p53 como respuesta a daño y es mediado por la activación transcripcional del gen CDKN1A que codifica para la proteína p21, acto seguido p53 se une a dos sitios río arriba del promotor de este gen, siendo el sitio más próximo al 5' uno de los más fuertes (36). Análisis genómicos recientes atribuyen un papel muy importante al complejo DREAM en la vía canónica de arresto del ciclo celular por parte de p53. La inhibición de la cinasa dependiente de ciclina (CDK) mediada por p21 resulta en la hipofosforilación de p107 y p130, lo que permite su incorporación al complejo DREAM para reprimir genes que promueven la mitosis, tales como CCNB1 (codifica ciclina B1), CCNB2 (codifica ciclina B2) y CDC25A, resultando en el arresto del ciclo celular en G2/M (figura 9), mientras que la unión de p21 a la ciclina E/CDK2 y ciclina D/CDK4 provoca el arresto en la fase G1 del ciclo celular (29,36,37).

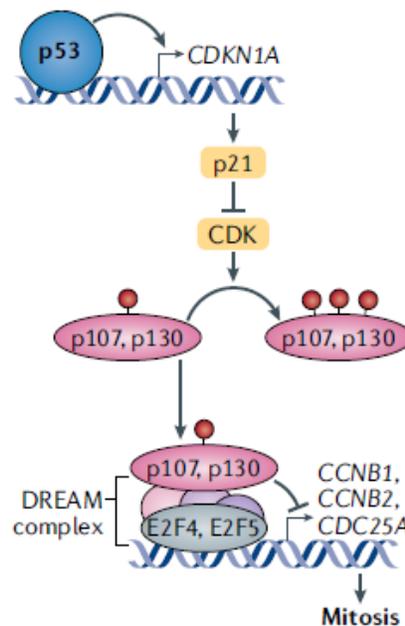


Figura 9. Vía de señalización mediante la cual p53 estimula el arresto celular. Tomada de Hafner A, 2019 (29).

El arresto del ciclo celular es consecuencia del daño al DNA y es reversible después de que se activan los mecanismos de reparación y la regulación por parte de p53. Sin embargo, se ha visto que la activación constante de p53 debido al acortamiento de los telómeros y la señalización activada por el daño, puede conducir a un estado único de arresto del ciclo celular altamente estable que no es completamente reversible, el cual es conocido como senescencia (36). La senescencia puede ser vista como una respuesta adaptativa de las células cuando se exponen a condiciones ambientales desfavorables, los cuales incluyen factores intrínsecos como daño oxidativo, hiperproliferación, luz UV, radiaciones tipo gamma y agentes quimioterapéuticos. Un factor crucial para la activación de este efecto biológico parece ser un estímulo estable, mientras que un estímulo transitorio induce arresto del ciclo celular reversible que permite la reparación del daño; por otro lado, un estímulo más severo lleva a cambiar la respuesta celular a apoptosis (35).

## Apoptosis

Después de la activación de p53, algunos tipos celulares se someten de forma predominante a apoptosis en lugar de arresto del ciclo celular, sin embargo, bioquímicamente los blancos de p53 involucrados en ciclo celular y reparación de DNA regularmente tienen mayor afinidad en sus sitios de unión. Por ejemplo, se ha visto que el pico de inducción más alto de p21 y GADD45 por p53 sucede entre 2-6 horas posterior a un estímulo de daño por irradiación, mientras que los blancos involucrados en apoptosis son más variables en cuanto a su afinidad; tal es el caso del gen pro-apoptótico Bax cuya inducción máxima sucede entre 12-24 horas posterior al estímulo de daño. Esto parece indicar que los blancos de apoptosis tienden a ser inducidos de forma más lenta comparados con los de ciclo celular. De esta manera se piensa que la decisión celular está basada en la duración del estrés y la activación de p53 principalmente (36,38).

El mecanismo de apoptosis es caracterizado por la condensación de la cromatina, fragmentación de DNA en el núcleo, contracción de la célula y pérdida de adhesión a la matriz extracelular; algunas alteraciones bioquímicas también incluyen

externalización de fosfatidilserina y la activación de caspasas. Hay dos vías principales de apoptosis: intrínseca y extrínseca (figura 10) (36,39).

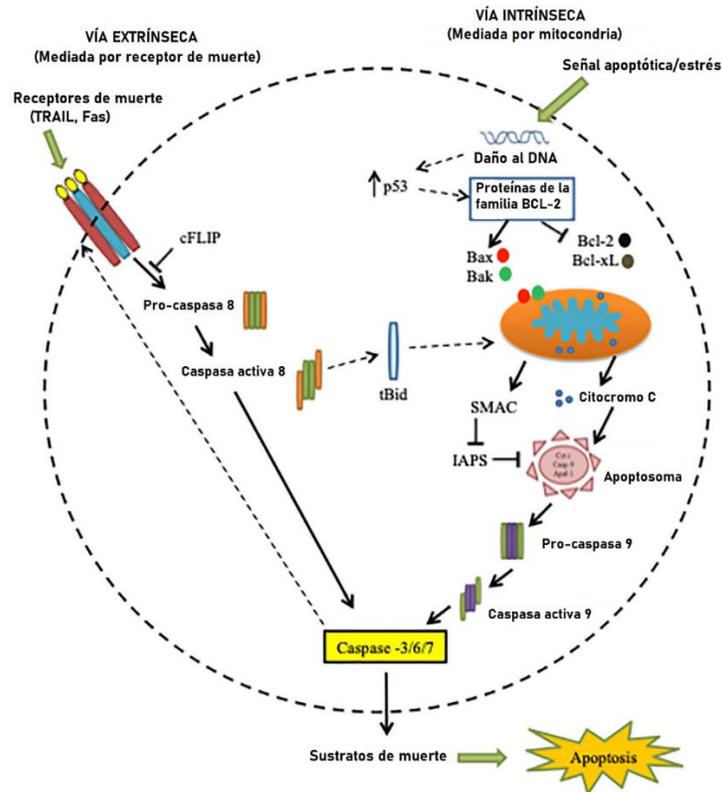


Figura 10. Vía intrínseca y extrínseca de apoptosis celular. Modificada de Jan R, 2019 (39). La vía extrínseca se activa cuando ligandos extracelulares como TNF (factor de necrosis tumoral), Fas-L (ligando para Fas) y TRAIL (ligando TNF relacionado a la inducción de apoptosis) se anclan a los dominios extracelulares de los receptores de muerte TNFR1, Fas y receptores TRAIL. La unión ligando-receptor resulta en la formación del complejo inductor de muerte DISC que contiene al dominio DD como una molécula adaptadora, procaspasa-8, procaspasa-10 y las proteínas c-FLIPs; posteriormente la caspasa 8 activa se disocia del complejo para iniciar la cascada de activación de caspasas que finalmente llevará a muerte celular (39).

La vía intrínseca, mitocondrial o regulada por BCL-2, es activada por condiciones de estrés como el daño al DNA, lo que aumentará los niveles de p53 quien a su vez estimulará a los miembros de la familia de proteínas pro-apoptóticas BIM, PUMA, BID, BMF, BAD, BIK, NOXA, HRK. Estas proteínas tienen la capacidad de unirse e

inhibir a las proteínas anti-apoptóticas BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W y BFL1, liberando así a los efectores de muerte celular BAX y BAK que causarán permeabilización de la membrana externa mitocondrial con la consecuente activación de caspasas, iniciada por caspasa-9 y el activador APAF-1 que formaran el apoptosoma y terminarán con la célula (40).

## Regulación de p53 en la respuesta a daño

Existen múltiples mecanismos que controlan la decisión de p53 sobre el destino que tomará la célula a partir de una señal de daño al DNA. Dentro de estos mecanismos, se incluye la secuencia de DNA y la estructura de la cromatina en cada sitio donde se une la proteína. En este punto, la participación de cofactores que interactúan con p53, por ejemplo, reguladores de la cromatina para la activación de genes blanco, como la acetiltransferasa p300 que se demostró es requerida para la activación dependiente de p53 de *CDKN1A in vitro*, sugiere que el reclutamiento de este cofactor, contribuye a la activación de genes específicos por p53 (41).

Las modificaciones post-traduccionales son otro mecanismo que es crucial para la regulación de los niveles y actividad de p53. Se han detectado más de 300 modificaciones post-traduccionales por espectrometría de masas en la proteína p53. Un ejemplo bien conocido es la regulación de p53 a través de su poliubiquitinación en el carboxilo terminal por parte de MDM2, mientras que la fosforilación de p53 en los residuos de serina y treonina en el amino terminal como respuesta al daño a DNA, debilita la interacción p53-MDM2, estabilizando así a p53. Es importante señalar que las modificaciones post-traduccionales pueden ser específicas al tipo de daño y de esta manera repercutir en el destino de la célula (42).

Se han observado un rango de afinidades de p53 para los diferentes motivos de unión o sitios responsivos a p53 presentes en los genes que responden a esta proteína. De esta manera, se ha visto en diversos análisis de promotores que son blanco para p53, que genes involucrados en la regulación del ciclo celular tienen sitios de unión de alta afinidad, mientras que aquellos involucrados en apoptosis tienen un amplio rango de afinidades y/o desviaciones del sitio consenso, lo que

resulta en una unión reducida. Estas observaciones permitieron establecer el “modelo de afinidad”, el cual postula que las concentraciones de p53 pueden determinar la elección entre arresto del ciclo celular y apoptosis (43–45).

La regulación de los niveles de p53 a través del tiempo (dinámica de expresión) está emergiendo como un modulador adicional que afecta la decisión celular a partir de un estímulo de daño al DNA. Por ejemplo, se ha visto que la radiación ionizante induce pulsos en los niveles de la proteína p53, lo que le permite a la célula reparar el daño, mientras que la activación sostenida de la proteína usando el mismo estímulo de daño con un inhibidor de MDM2 lleva a senescencia. De esta manera, la regulación temporal de los niveles de la proteína p53 tiene un papel importante en la decisión del destino celular.

Un inconveniente para el estudio de la dinámica de expresión es la heterogeneidad que se observa a nivel de una sola célula, a pesar de ello se ha logrado determinar que existe una diversidad en la dinámica de expresión de genes blanco para p53, los cuales tienen diferentes tiempos, niveles y patrones de inducción. Por ejemplo, algunos genes blanco como CDKN1A muestran picos en los niveles de mRNA siguiendo los picos de p53, mientras que otros genes como DDB2 alcanzan un máximo de expresión que es continuamente acumulado. De esta manera, se ha propuesto que la decisión que tomará la célula está coordinada entre la dinámica relativa de múltiples genes y abundancia de las proteínas, que de hecho varían con la dinámica de expresión de p53 (46,47).

El rol de p53 en el control de la respuesta específica a daño aún sigue siendo motivo de investigación, debido al extenso número de mecanismos reguladores que se conocen hasta ahora por parte del guardián del genoma.

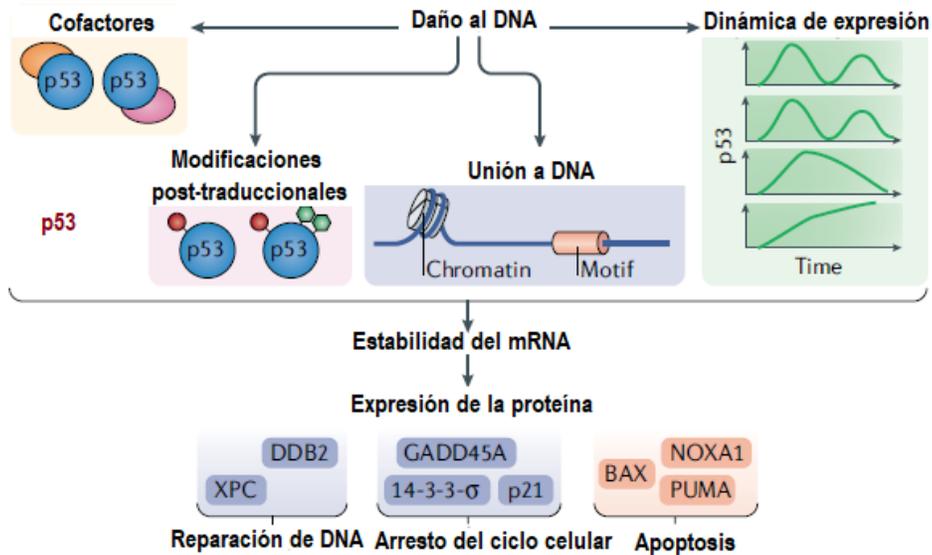


Figura 11. Regulación del destino celular mediado por p53 como respuesta al daño de DNA. Modificada de Hafner A, 2019.

## Interacción de p53 con E2

Desde hace varios años, se han descrito actividades de E2 relacionadas con la inducción de apoptosis a través de mecanismos dependientes e independientes de p53. Además se ha visto que p53 puede inhibir específicamente la replicación viral del DNA del VPH, por lo que no es inconcebible que algunas de estas actividades de E2 estén mediadas por su asociación con p53 (21,48).

Se demostró a través de estudios *in vitro* e *in vivo*, que existe una interacción física entre la proteína p53 y la proteína E2 del VPH16 mediante residuos en el dominio carboxilo terminal de p53; además en este mismo trabajo, un análisis mutacional de p53 indicó que las secuencias en el dominio de unión a DNA y de oligomerización son esenciales para la interacción (48).

Aunque p53 ha sido encontrado en centros de replicación viral, el papel preciso no es bien conocido, sin embargo, se sugiere que puede estar implicado en la replicación del DNA y/o procesos de reparación en células transformadas por VPH, esto a pesar de que la proteína p53 se encuentra en niveles bajos en este tipo de células, ya que es degradada por la proteína viral E6. En contraste, se ha visto que p53 puede inhibir la replicación del VPH 11 y 16 a través de la interacción con la

proteína E2. De forma interesante, el dominio C-terminal de la proteína E2 del VPH 11 no puede unirse a p53 y no induce apoptosis en células tanto transformadas como no transformadas, lo que sugiere que p53 debe inhibir la replicación del VPH 11 por otro mecanismo. La represión de la replicación del VPH a través de p53 debe ser un mecanismo celular que actúa para limitar la infección viral, sin embargo, es posible que tenga algún beneficio sutil en la viabilidad del virus (49,50).

La asociación E2-p53 debe ser considerada relevante para algunas de las actividades conocidas de E2 que no están relacionadas con la expresión viral, tales como la inducción de apoptosis. A pesar de que el mecanismo es controversial, la inducción apoptótica está bien documentada en células que sobre-expresan E2, interesantemente se ha demostrado que en el VPH 16 la inducción de apoptosis por E2 involucra la activación de la caspasa 8 a través de la vía extrínseca. Este posible mecanismo parece ser específico de los genotipos de alto riesgo, pues los genotipos de bajo riesgo como el 6 y 11 no inducen muerte celular en experimentos comparables (50,51).

Se tiene la hipótesis que existen dos mecanismos independientes mediante los cuales E2 induce muerte celular. Uno dependiente de p53 que necesita la unión de esta proteína con el C-terminal de E2 y puede ocurrir sólo en células positivas para p53, mientras que el otro posible mecanismo es independiente de p53, pero dependiente de caspasa 8 que puede ser mediado por el dominio amino terminal de E2 y que sucede en líneas celulares positivas y negativas para p53 (50).

Aún permanecen siendo hipótesis las razones por las que la proteína viral E2 favorece la inducción de apoptosis de forma dependiente e independiente de p53, aunque por su relevancia fisiológica en la apoptosis *in vivo*, se puede especular que E2 ayuda a liberar las nuevas partículas virales a través de este proceso biológico. Sin embargo, no debe olvidarse las diferencias entre los genotipos de alto y bajo riesgo para estimular apoptosis, siendo las proteínas E2 de los genotipos de bajo riesgo incapaces de inducirla (50,51).

Por otra parte, el efecto mejor caracterizado de E2 en el ciclo celular ha sido el arresto del crecimiento, esto debido a la represión de los transcritos E6/E7 y la

reactivación de las vías de p53 y RB. Se piensa que p53 está involucrado en la inducción del punto de control mitótico y que E2 suprime la acción de p53, permitiendo así la re-replicación (50).

Como ya se ha mencionado, el impacto que tiene E2 sobre la expresión de genes involucrados en procesos como proliferación, diferenciación, apoptosis y senescencia, es gracias a la capacidad que tiene E2 de interactuar con proteínas celulares.

En cuanto a diferenciación, es conocido que E2 es uno de los primeros genes expresados en la capa basal epitelial durante la infección, sus efectos en diferenciación temprana fueron estudiados en queratinocitos humanos inmortalizados, donde a través de la detección de receptores de membrana se demostró la presencia de tres subpoblaciones celulares, una de las cuales, es pequeña y posee características de células progenitoras. Al expresar a la proteína E2 del VPH16 en esta línea celular se observó un cambio significativo en la proporción de las subpoblaciones celulares, disminuyendo drásticamente la población con características progenitoras, por lo tanto, favoreciéndose la diferenciación temprana en las células (52). Los mecanismos implicados en este fenómeno probablemente involucren a la proteína p53, por su conocida interacción con E2.

Avances recientes como el perfil genómico de células troncales embrionarias han descubierto algunos mecanismos sobre las funciones de p53 en diferenciación y desarrollo celular. Se ha demostrado que en ausencia de p53 e incluso con niveles bajos de ella, se favorece la formación y proliferación de las células madre, mientras que altos niveles promueven diferenciación y la pérdida de células madre (53). Cabe mencionar que las actividades transcripcionales de p53 en el arresto del ciclo celular y reparación del DNA están apagadas en las células progenitoras, sin embargo, tras la inducción de la diferenciación, p53 se activa, MDM-2 lo autoregula y la división celular se detiene al ritmo en el que p21 se transcribe. Aunque no se sabe quién inactiva a p53 en las células madre, se cree que una deacetilasa de histonas puede estar involucrada (53).

En este sentido, se han descrito diversas vías reguladas por p53 que son específicas para células somáticas y que son activadas bajo condiciones de estrés como son: la ferroptosis y la autofagia. En cambio, p53 en las células madre regula la pluripotencia y diferenciación (54) (figura 12), en cuyo caso no es de sorprender que en el contexto de una infección por VPH en las células epiteliales basales, la interacción de E2 con p53 pueda estar implicada en la diferenciación temprana.

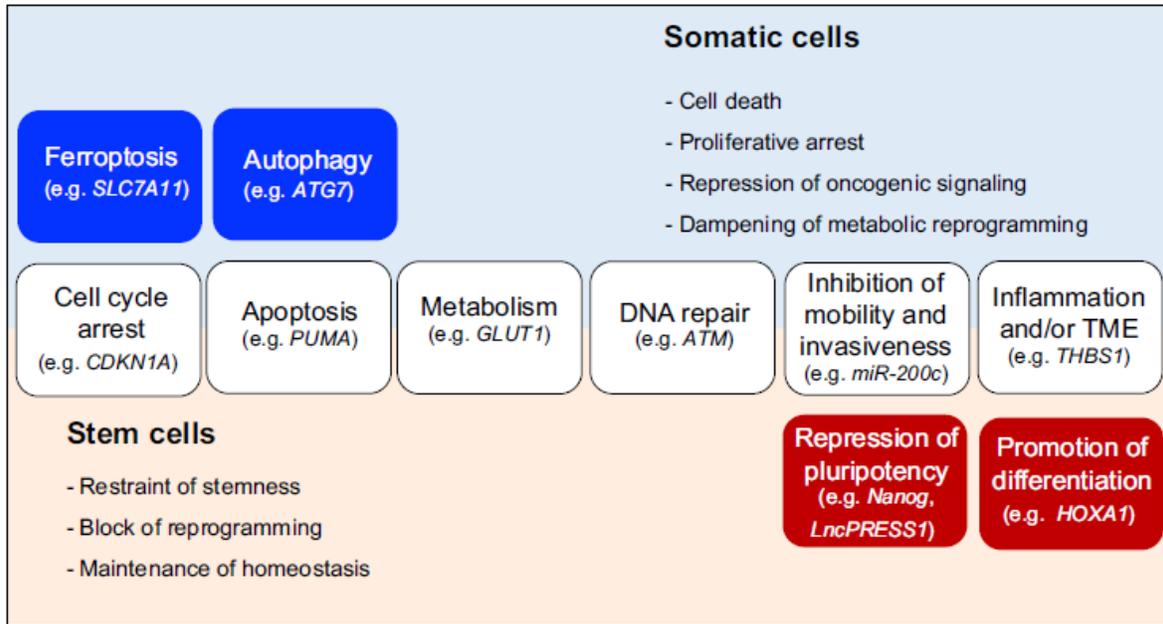


Figura 12. Mecanismos regulados por p53 en células somáticas y células madre. Tomado de Jain A, 2018 (54)

Otro mecanismo relacionado en la diferenciación es la vía WNT, la cual es altamente expresada en células progenitoras y es requerida para la división y diferenciación celular. De forma interesante, esta vía también converge en genes involucrados en procesos celulares como apoptosis y proliferación celular, lo que no descarta nuevamente la participación de p53 (53). Por otro lado, un perfil de expresión en células C-33A indicó que la presencia de E2 del VPH16 modifica vías importantes de señalización como WNT, siendo esta vía la más afectada ya que se encontraron en ella 28 genes afectados a la baja y 15 genes regulados a la alza (55).

## ANTECEDENTES

La proteína viral E2 del VPH es de suma importancia para el ciclo productivo y el desarrollo de infecciones persistentes. El ciclo productivo puede causar lesiones hiperproliferativas benignas o en algunos casos tener el potencial para desarrollar cáncer. Descifrar el papel específico de E2 de los papilomavirus de alto riesgo como el 16 y 18 en la conversión carcinogénica ha sido motivo de estudio desde hace algunos años (21,23).

Se sabe que E2 es una proteína de expresión temprana que tiene actividad multifuncional, capaz de ejercer sus funciones a través de la interacción con diferentes blancos, dentro de los que se incluyen factores virales y celulares que son necesarios para la expresión genómica viral, segregación y replicación o para proveer condiciones celulares favorables (23).

La recolección en tres diferentes bases de datos, señaló al menos 57 proteínas celulares que se unen ya sea a la proteína E2 prototipo, o a versiones trunca de ella. Un análisis posterior más fino determinó cuatro familias de proteínas con base en los procesos biológicos celulares donde participan y que tienen mayor interacción con E2, siendo estos procesos; la regulación de la transcripción, procesamiento de RNA, apoptosis y ciclo celular.

En nuestro grupo de trabajo, se han analizado los genes y procesos biológicos que son regulados por la proteína E2 del VPH16. A través de un perfil de expresión génica generado por microarreglos en células C-33A en las que se expresó mediante un vector adenoviral al transcrito E216, se determinó que 581 genes modificaron su expresión a la alza y 1048 genes a la baja, de los cuales 12 pertenecen a la vía de p53 (55).

Una de las proteínas con las que interactúa E2 es con p53, ya que se ha demostrado su interacción *in vitro* e *in vivo* involucrando los dominios de oligomerización y de unión al DNA de p53 con el dominio C-terminal de E2 (48). La proteína p53 tiene relevancia a nivel celular debido a su extensa participación en la decisión que toma la célula en respuesta a diferentes estímulos, incluyendo daño (49).

En nuestro grupo, se ha estudiado el efecto que la proteína E2 del VPH-16 expresada de forma estable ejerce sobre promotores regulados por p53 en ambientes celulares que presentan diferente estado de este gen (silvestre, mutado o nulo). Se encontró que en un ambiente celular de p53 silvestre, la presencia de E2 del VPH16 provoca una activación transcripcional en promotores de genes de respuesta a daño como GADD45A de hasta un 50% más que su control correspondiente. Por otro lado, las células que presentaban un ambiente carente de p53 o con p53 mutado presentaron represión del gen GADD45A, sugiriendo interacciones dinámicas entre la proteína viral E216 y p53 que favorecen la actividad transcripcional (56).

Además, dentro del grupo también se ha estudiado el efecto de la proteína E2 del VPH16 sobre la respuesta transcripcional de p53 frente a un estímulo de daño por doxorubicina en ambientes p53 silvestre y nulo. Los resultados más destacados indican que en presencia de E2-16, la expresión de algunos genes de respuesta temprana a daño se incrementa de manera considerable, al igual que la unión de p53 a su promotor, mientras que para algunos genes de respuesta tardía existe una disminución en su expresión en presencia de daño. Se sugiere entonces que hay una regulación específica dependiente de E2 para los promotores de algunos genes que son responsivos a p53.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a que el VPH 16 es un agente viral de alto riesgo, promotor de tumores y responsable de alrededor del 55% de los casos de cáncer cervical (cuarto tipo de cáncer más común en mujeres y la causa más frecuente de muerte relacionada a cáncer en esta misma población), se vuelve necesario entender los mecanismos moleculares que conllevan a la transformación cancerígena de la célula por este virus.

La proteína E2 es una de las proteínas de expresión temprana del genoma viral que es esencial para la persistencia del virus. Se sabe que regula la replicación viral y la transcripción tanto del virus como de su célula huésped a través de la interacción

con diferentes proteínas de importancia transcripcional. Una de estas proteínas es p53, conocida como el *guardian del genoma*, responsable de la respuesta celular decisiva en situaciones de estrés a través de la regulación principalmente transcripcional de múltiples genes involucrados en procesos como apoptosis, reparación del DNA, arresto del ciclo celular, entre otros.

De esta manera y con base en los estudios realizados en el grupo de trabajo, se propone que el estudio de la interacción de la proteína E2 del VPH16 con la proteína p53 que es esencial en la respuesta a daño mediante la activación transcripcional de genes asociados a diversos procesos celulares, ayudará a entender los mecanismos en los que está involucrada la proteína E2 y que la hace importante para la persistencia viral, la cual representa un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer.

## HIPÓTESIS

La respuesta de p53 generada por el estímulo de daño con doxorubicina es afectada por la expresión prolongada del gen E2 del VPH16.

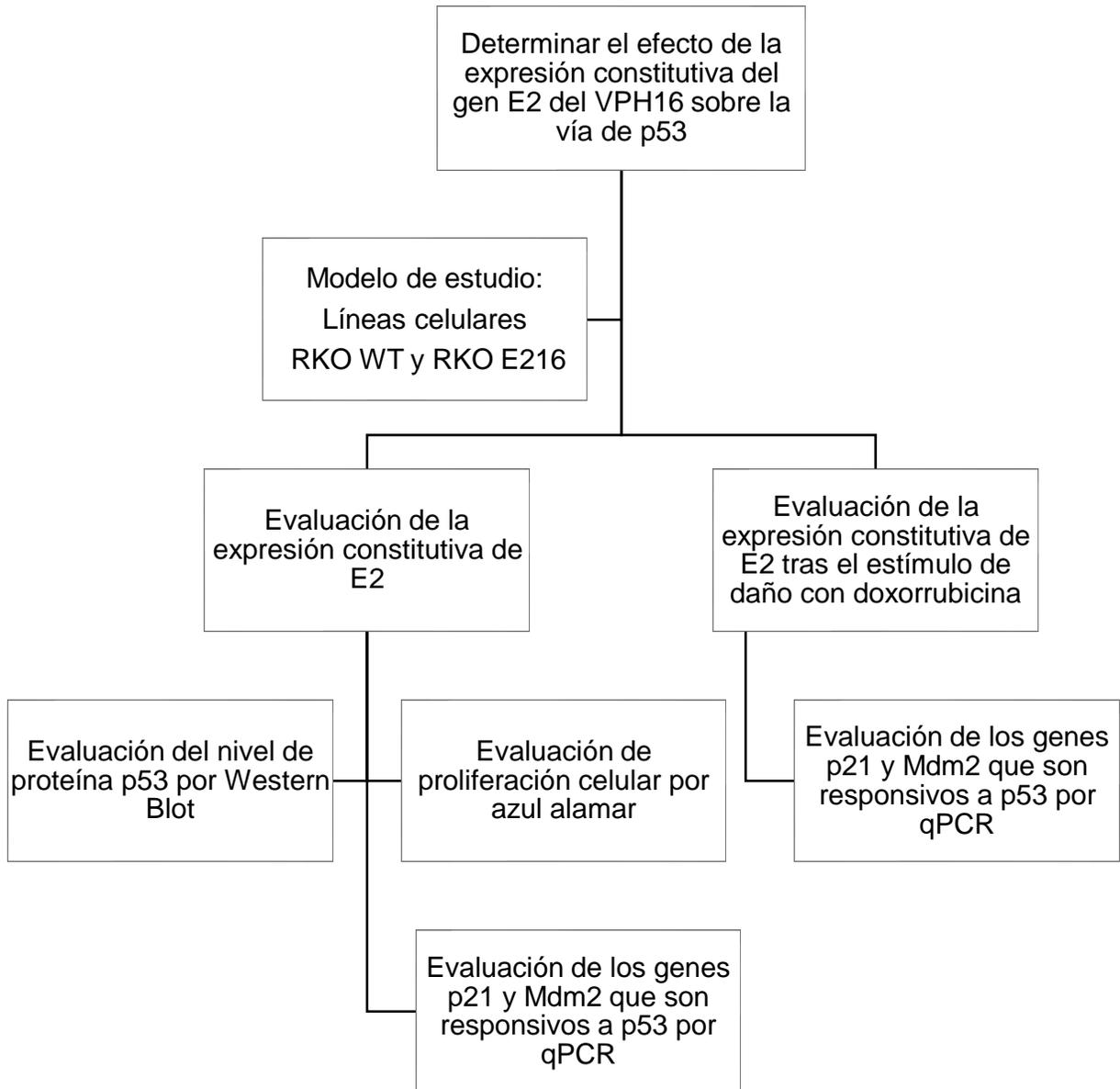
## OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la expresión constitutiva del gen E2 del VPH16 sobre la vía de p53 en respuesta a daño inducido por doxorubicina.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Evaluar los posibles cambios en los niveles de la proteína p53 tras la expresión constitutiva del gen E2 del VPH16 en la línea celular RKO (p53wt).
- ✚ Evaluar los posibles cambios en la respuesta transcripcional de genes implicados en la respuesta de p53 tras la expresión constitutiva del gen E2 del VPH16 en la línea celular RKO.
- ✚ Evaluar los posibles cambios en la respuesta transcripcional de genes implicados en la respuesta de p53, generados como respuesta al estímulo de daño por doxorubicina en las líneas celulares RKO WT y RKO E216.

# ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



# MATERIALES Y MÉTODOS

## Cultivo celular

Las células RKO y RKO E216, estas (generadas previamente en el laboratorio), conservadas en crioviales a  $-70^{\circ}\text{C}$  se descongelaron en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto. Se crecieron en cajas de cultivo p100 en medio DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) (Invitrogen, CA, USA) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco, NY, USA), L-glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1mM), penicilina (50U/mL) y estreptomina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Ambas líneas celulares se incubaron en un ambiente húmedo con  $\text{CO}_2$  al 5% y  $37^{\circ}\text{C}$  de temperatura hasta que alcanzaron la fase de crecimiento exponencial.

## Tratamiento con doxorrubicina

Para activar la respuesta de p53, a las células se les indujo daño usando el fármaco doxorrubicina o también llamado adriamicina, la cual es una molécula plana del grupo de las antraciclinas derivada de bacterias del género *Streptomyces peuceitius*. Este fármaco es un agente citotóxico usado ampliamente a nivel clínico como tratamiento para eliminar tumores líquidos y sólidos. Los mecanismos moleculares mediante los cuales causa daño y posteriormente muerte celular permanecen siendo inciertos, sin embargo, se han propuesto algunos, entre los cuales se incluye el bloqueo de la topoisomerasa II, la formación de aductos en el DNA, estrés oxidativo y sobreproducción de ceramida (57).

A partir de células RKO y RKO E2 crecidas a una confluencia aproximada del 80%, las monocapas celulares se lavaron con PBS (Phosphate Buffered Saline pH 7.2) y posteriormente se agregó doxorrubicina (solubilizada en agua) (Santa Cruz, CAS 23214-92-8) a una concentración final de 1  $\mu\text{M}$  en 3mL de medio DMEM suplementado.

Las células se cosecharon transcurridas 0, 4, 8, 12 y 24 horas posterior al tratamiento, se resuspendió la pastilla celular en 1mL de PBS y se centrifugó a 1500 rpm por 6 minutos. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de TRIzol™

(Invitrogen, CA, USA), se resuspendió la pastilla celular y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Como control negativo, se cosecharon células sembradas bajo las mismas condiciones, pero sin agregar doxorubicina.

## Western Blot

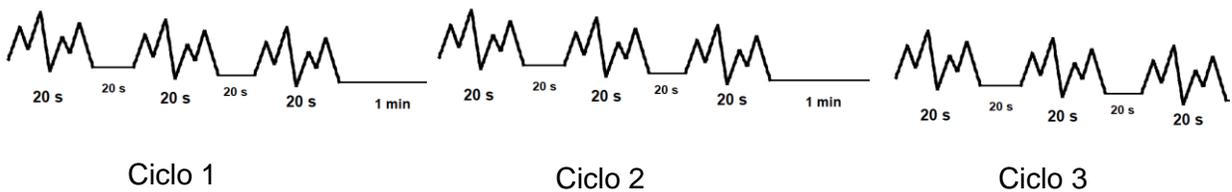
### Lisado celular

Las células RKO y RKO E2 se crecieron hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80% en cajas p100. Se lavaron las células una vez con PBS y se cosecharon con micropipeta en un tubo cónico de 1.5 mL; se retiró el sobrenadante y se agregaron directamente a la pastilla celular 150  $\mu\text{L}$  de RIPA suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas. Se resuspendió con la punta de la pipeta y se dejó reposar en hielo para proceder a sonicar la muestra.

Para el sonicado se ajustaron los siguientes parámetros:

Duty cycle	10%
Output control	2

A cada muestra se le dieron 3 ciclos de 3 pulsos de 20s con descansos de 20s entre pulsos y además descansos de 1 min. entre cada ciclo como lo muestra el diagrama.



Una vez concluida la sonicación de las muestras, se centrifugaron a 10000 rpm por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , se recuperó el sobrenadante y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### Cuantificación de proteínas

Las proteínas fueron cuantificadas usando el método de Lowry, para lo cual se preparó una curva estándar a partir de una solución *stock* de albúmina a una

concentración de 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  con buffer de lisis. Se prepararon diluciones seriadas a partir de esta solución y se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). En el anexo se muestra una curva de cuantificación representativa de la cuantificación.

## Detección por WB

Para la detección de p53 en las líneas celulares RKO WT y RKO E2 se usaron 40  $\mu\text{g}$  de proteína total. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturizante al 8% con SDS, la electroforesis se llevó a cabo a 90 V por 2.5 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.45  $\mu\text{m}$  con una corriente de 0.22 mA a 4°C por 1 hora con metanol al 20%.

Luego, la membrana se bloqueó a temperatura ambiente por 1 hora con leche al 5% (leche descremada en polvo baja en grasa, Svelty, Nestle®) con Tris Buffer Salino al 1X preparado con Tween 20 al 0.1%. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario anti-p53 DO-1 (sc-126, Santa Cruz Biotechnology) a una concentración 1:500 en leche al 5% con TBS/Tween al 0.1% toda la noche a 4°C con agitación suave.

Se realizaron 3 lavados suaves por 10 minutos cada uno con TBS/Tween al 0.1% y se incubó con el anticuerpo secundario peroxidado anti-Ig de ratón (65-6120, Molecular Probes Thermo Fisher Scientific) a una concentración de 1:5000 con leche al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente; posteriormente se lavó la membrana suavemente (3 veces por 5 minutos) y se reveló agregando luminol y peroxidasa directamente en la membrana para que la señal se revele en placas fotográficas.

Finalmente se tiñó la membrana con rojo de Ponceau para la detección de las proteínas totales. El nivel de expresión relativa se determinó con ayuda del programa ImageJ.

## Ensayo de proliferación celular

Para medir la proliferación celular, se empleó el colorante azul alamar, también llamado resazurina, el cual es un importante indicador redox que es usado para evaluar la función metabólica en las células. El azul alamar es reducido por las células formando un compuesto rosa llamado resorufina que es altamente fluorescente y se detecta a 590 nm (58).

En una placa de 24 pozos se sembraron 50 000 células RKO WT y RKO E2 (12 pozos para cada línea celular). Pasadas 24 horas, se observaron las células al microscopio para asegurar que estuvieran bien adheridas y morfológicamente íntegras. Se retiró el medio de los 6 primeros pozos y se lavaron las células con 450  $\mu$ L de PBS; posteriormente se agregaron 450  $\mu$ L de Opti-MEM®, se homogenizó la placa suavemente y enseguida se agregaron 50  $\mu$ L de azul alamar.

Transcurridas 3 horas, se colocaron 150  $\mu$ L del sobrenadante de cada pozo en donde se encuentra la población celular que se está evaluando y se transfirieron en una placa oscura para leerse mediante fluorimetría a 590 nm. De forma simultánea, se tomó lectura del control negativo (450  $\mu$ L de Opti-MEM® y 50  $\mu$ L de azul alamar).

El proceso se repitió cada 24 horas por 4 días.

## Ensayo de expresión relativa

### Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó usando el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research, CA, USA). El fundamento de esta técnica es la separación del ácido nucleico usando una columna de sílice, que por atracción de cargas y favorecida por altas concentraciones de sales retienen al RNA en la matriz hasta su elución. Para descartar la presencia de DNA se hace un tratamiento con DNasa I directamente en la columna.

Las muestras resuspendidas previamente en TRIzol™ que se almacenaron a -70°C se colocaron a temperatura ambiente por aproximadamente 15 min para

atemperarse; transcurrido el tiempo se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto frío a cada muestra y se homogenizó por inversión.

La mitad del volumen de cada muestra se transfirió a una columna de sílice (Zymo-Spin™ Column) y se centrifugó a 9300 rpm, 4°C por 2 minutos; se descartó el sobrenadante y se agregó el resto del volumen de la muestra para posteriormente centrifugarse bajo las mismas condiciones y desechar el sobrenadante.

Se agregaron 400  $\mu\text{L}$  del buffer de lavado Direct-zol™ RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó a 9300 rpm, 4°C por 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron directamente a la columna 5  $\mu\text{L}$  de DNasa I (6 U/ $\mu\text{L}$ ) previamente diluida con 75  $\mu\text{L}$  de DNA digestion buffer y se incubó a temperatura ambiente por 50 minutos. Transcurrido el tiempo se agregaron 400  $\mu\text{L}$  del buffer de lavado Direct-zol™ RNA PreWash buffer a la columna y se centrifugó a 9300 rpm, 4°C por 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron nuevamente 400  $\mu\text{L}$  del buffer de lavado Direct-zol™ RNA PreWash buffer a la columna y se centrifugó a 9300 rpm, 4°C por 2 minutos.

Se agregaron 700  $\mu\text{L}$  de Direct-zol™ RNA Wash buffer a la columna y se centrifugó a 9300 rpm, 4°C por 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se transfirió la columna a un tubo cónico de 1.5 mL para eluir el RNA. Se agregaron directamente a la columna 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 9300 rpm, 4°C por 2 minutos. Las muestras se almacenaron a -70°C.

## Cuantificación de RNA

Las muestras de RNA se cuantificaron por espectrofotometría con un equipo NanoDrop™ 2000, el cual detecta la absorbancia de las muestras a las longitudes de onda 260 nm, 280 nm y 230 nm para determinar la concentración del RNA en ng/ $\mu\text{L}$  y su pureza a través de los índices 260/280 y 260/230. Cuando el primer índice tiene un valor aproximado a 2.0 se considera como un RNA puro, si este índice es menor a 1.8 se infiere la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben a 280 nm. Por otro lado, el índice 260/230 es usado como una segunda medida de pureza y estos valores son ligeramente más altos

que el primer índice. De esta forma se considera que el ácido nucleico está puro cuando los valores se encuentran entre 2.0 y 2.2, de modo que valores menores a estos son predictores de impurezas.

Una vez que se determinó la concentración de la muestra, se hicieron diluciones a 100 ng/μL usando agua libre de nucleasas.

### Tratamiento con DNasa I

Para quitar los posibles remanentes de DNA genómico en las muestras de RNA se realizó un tratamiento post-purificación con RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Wisconsin, USA) como a continuación se describe:

	<b>Volumen por reacción</b>
<b>RNA (100 ng/μL)</b>	8 μL
<b>RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer</b>	1 μL
<b>RQ1 RNase-Free DNase</b>	1 μL
<b>Volumen final</b>	10 μL

Una vez completadas las reacciones, se colocaron en el termociclador a 37°C por 1 hora y media. Al concluir el tiempo, fue necesario inactivar a la DNasa por lo que se agregó 1 μL de solución de paro RQ1 DNase Stop Solution a cada reacción y se incubó a 65°C por 10 minutos.

### PCR de punto final para excluir contaminación con DNA

Con el fin de garantizar que el tratamiento con DNasa fuera efectivo y que las muestras no estuvieran contaminadas con DNA genómico que pudiera interferir en los análisis posteriores, se realizó una reacción de PCR en punto final usando oligonucleótidos que amplifican el gen β2-microglobulina que por su diseño hibridan entre exones consecutivos permitiendo detectar contaminación con DNA genómico. De esta forma, el producto específico es de 102 pb, mientras que un producto de 762 pb indica contaminación (figura 13).

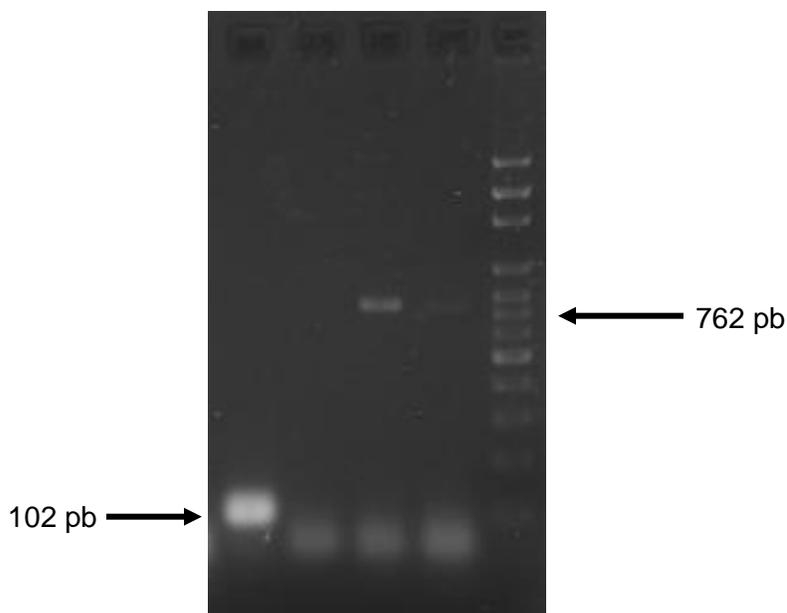


Figura 13. Productos de amplificación de PCR que ilustran a  $\beta$ 2-microglobulina como marcador de contaminación con DNA genómico. Gel de agarosa al 1.5%.

La secuencia de los oligonucleótidos es la siguiente:

<b><math>\beta</math>2-microglobulinaE</b>	Fw 5' ACCCCCACTTGAAAAAGATGAGTA 3'
	Rv 5' ATGATGCTGCTTACATGTCTCGA 3'

La mezcla de reacción para la PCR en punto final comprende los siguientes elementos:

	<b>Volumen por reacción</b>
<b>5X GoTaq® Flexi buffer</b>	5 $\mu$ L
<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)*</b>	1.5 $\mu$ L
<b>dNTPs (10 mM)*</b>	1 $\mu$ L
<b>Primer (2.5 <math>\mu</math>M) *</b>	
<b>Forward</b>	1 $\mu$ L
<b>Reverse</b>	1 $\mu$ L
<b>Muestra (RNA)</b>	2 $\mu$ L
<b>GoTaq® DNA polimerasa (5 u/<math>\mu</math>L)</b>	0.2 $\mu$ L
<b>Agua libre de nucleasas</b>	13.3 $\mu$ L

---

**Volumen final**

---

25  $\mu$ L

---

\*Concentración final en la reacción.

Una vez preparada la mezcla de reacción, las muestras se amplificaron en un termociclador donde se sometieron a las siguientes temperaturas:

<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
1	94°C	4:00 min
	94°C	1:00 min
30	60°C	0:45 min
	72°C	0:45 min
	72°C	7:00 min
2	4°C	$\infty$

Cuando concluyeron los ciclos de amplificación, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% el cual se preparó pesando 0.6 g de agarosa que se diluyeron posteriormente en 40 mL de TAE 1X y se tiñe con 1.5  $\mu$ L de bromuro de etidio (5 mg/mL). En el gel se cargaron 5  $\mu$ L del producto de PCR y se mezclaron con 1  $\mu$ L de buffer de carga para posteriormente correrlo a 70 V por 50 minutos. Los productos de amplificación se observaron con luz UV en un fotodocumentador.

### Síntesis de cDNA

Una vez comprobado que las muestras de RNA no contuvieran DNA genómico contaminante, se realizó la síntesis de DNA complementario (cDNA) usando como molde las muestras de RNA de una sola cadena, en una reacción que es catalizada por la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Wisconsin, USA). Es de importancia señalar que el cDNA es derivado de RNA mensajero maduro, es decir que sólo contiene exones por lo que servirá para medir la expresión relativa de los genes de interés.

Se prepararon mezclas de reacción directamente en los tubos del RNA tratado con DNasa como a continuación se describe:

	<b>Volumen por reacción</b>
<b>M-MLV RT 5X Reaction buffer</b>	5 µL
<b>dNTPs (10mM)</b>	5 µL
<b>RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40u/µL)</b>	0.6 µL
<b>M-MLV Reverse Transcriptase (200 u/µL)</b>	1 µL
<b>Oligo(dT)15 Primer</b>	1 µL
<b>Agua libre de nucleasas</b>	2.4 1 µL

Es importante mencionar que primero se agregó el Oligo(dT)15 Primer y el agua libre de nucleasas directamente en el tubo en donde se tiene el RNA previamente tratado con DNasa, calentando en el termociclador a 70°C por 5 min. Posteriormente se agregaron los demás componentes de la mezcla de reacción y se incubó a 42°C por 1 hora y 30 minutos. Concluido el tiempo, las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

## qPCR

Para medir la expresión relativa de los genes de interés, se usó la técnica de PCR en tiempo real cuantitativa con el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) el cual contiene el intercalante fluorescente SYBR Green I, que tiene la capacidad de unirse a DNA de doble cadena y es entonces cuando emite fluorescencia. De esta forma, mientras más DNA dúplex esté presente, la señal fluorescente incrementa proporcionalmente, dando así la concentración de la muestra. Para cada reacción se usa cDNA como molde, el cual no contiene DNA genómico contaminante.

Para determinar la expresión de cada gen, se usa el método de comparación relativa o  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . De esta forma, se mide la expresión de un gen específico respecto a un gen

de referencia o *housekeeping* el cual no modifica su expresión de forma importante en el modelo de estudio que se esté usando.

Se preparó una mezcla de reacción como a continuación se describe:

	<b>Volumen por reacción</b>
<b>Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)</b>	7.5 µL
<b>Forward Primer (0.13 µM) *</b>	0.2 µL
<b>Reverse Primer (0.13 µM)*</b>	0.2 µL
<b>cDNA</b>	2.5 µL
<b>Agua libre de nucleasas</b>	4.6 µL
<b>Volumen final</b>	15 µL

\*Concentración final en la reacción

Las secuencias de los oligonucleótidos son las siguientes:

<b>Gen</b>	<b>Secuencia</b>
<b>β2-microglobulina (Gen de referencia)</b>	Fw 5' ACCCCCACTTGAAAAAGATGAGTA 3'
	Rv 5' ATGATGCTGCTTACATGTCTCGA 3'
<b>Cip/p21</b>	Fw 5' AAGACCATGTGGACCTGTCA 3'
	Rv 5' GGCTTCCTCTTGGAGAAGAT 3'
<b>Mdm2</b>	Fw 5' GTCTGTACCTACTGATGGTGCTGT 3'
	Rv 5' GTGCACCAACAGACTTTAATAACTTCA 3'
<b>E2</b>	Fw 5' TGCGGGTGGTCAGGTAAT 3'
	Rv 5' TGGTCGCTGGATAGTCGT 3'

Una vez que las mezclas estuvieron preparadas, se centrifugaron los tubos para asegurar que todo el líquido estuviera en el fondo y que no hubiera burbujas, ya que estas interfieren con la detección de fluorescencia. A continuación, se colocaron en el termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, California, USA) bajo las siguientes condiciones:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	15:00 min
40	95°C	00:15 min
	60°C	1:00 min
1 (Curva melting)	95°C	00:15 min
	60°C	01:00 min
	95°C	00:15 min
1	4°C	∞

Las curvas de disociación o curvas *melting* ayudan a distinguir los productos de amplificación de acuerdo a su  $T_m$ , ya que ésta es afectada principalmente por la longitud, contenido de GC y presencia de *mismatch*. Analizando las gráficas resultantes de la cinética de disociación de los fragmentos resultantes, se pueden identificar productos inespecíficos tales como dímeros de oligonucleótidos.

Para el análisis de la expresión relativa una vez obtenidos los valores de Ct para cada muestra, se usó el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  el cual señala cuántas veces más o cuántas veces menos se expresa un gen respecto al gen de referencia (Fold Change). A continuación, las formulas:

$$\Delta Ct = \text{Gen de estudio} - \text{Gen de referencia}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{condición a estudiar}} - \Delta Ct_{\text{condición control}}$$

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

## RESULTADOS

### Determinación de los niveles de la proteína p53

Lo primero que se evaluó para determinar el efecto de la expresión constitutiva de E2 del VPH16 fue a la proteína p53 en la línea celular RKO a través de la técnica de Western Blot. Los resultados y la cuantificación de la proteína se muestran en la figura 14.

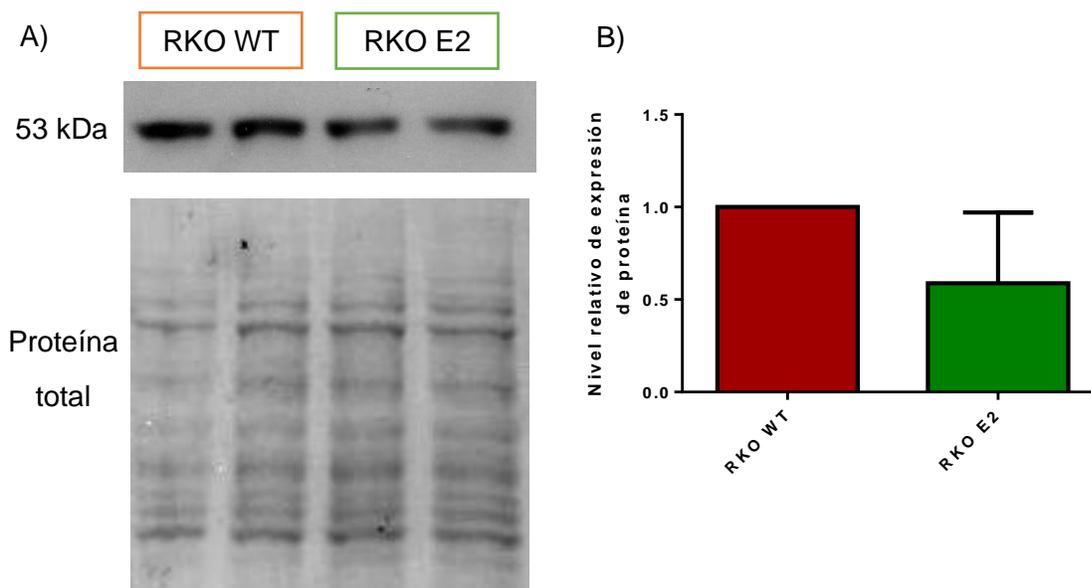


Figura 14. Nivel de expresión de la proteína p53. A) Western Blot para p53 en las células RKO WT y RKO E2 normalizado con proteínas totales. B) Densitometría para la cuantificación de la proteína p53 en ambas líneas celulares. Los datos representan los resultados de un duplicado técnico.

Como se puede observar en la figura 14, al evaluar la expresión de la proteína p53 sólo tras la expresión constitutiva de E2, es decir sin ningún estímulo de daño, la cantidad relativa de p53 es ligeramente menor. Los resultados se comprueban al realizar la cuantificación de la cantidad de proteína a través de una densitometría, en donde se aprecia que la cantidad de p53 en las células RKO E2 es aproximadamente 0.4 veces menor respecto a las células control.

## La presencia de E2 aumenta la proliferación de las células RKO

El hecho de que la presencia de E2 en la línea celular RKO provoque cambios en la expresión de la proteína p53 y sabiendo la importancia que tiene esta proteína en procesos principalmente de cáncer, donde su ausencia favorece la proliferación celular, se midió este proceso biológico. El ensayo se realizó a través del uso de azul alamar y sembrando de forma inicial el mismo número de células (figura 15).

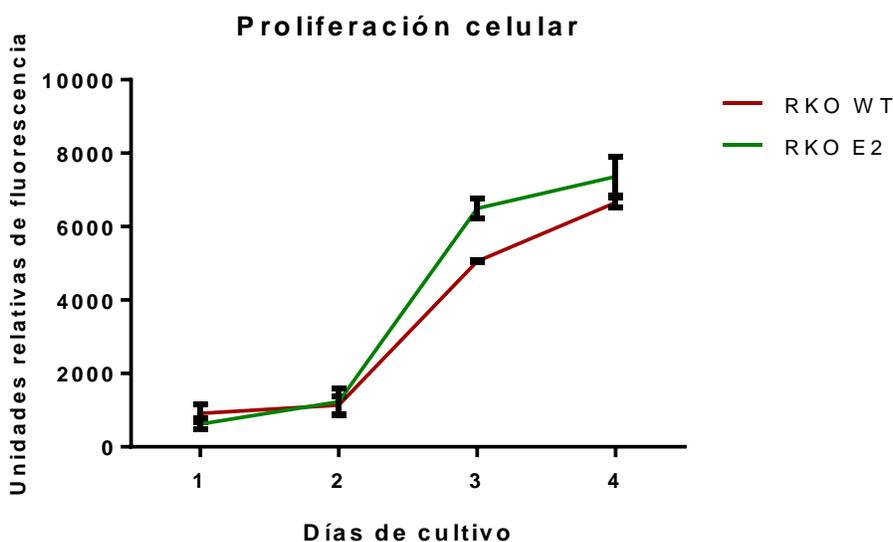


Figura 15. Ensayo de proliferación celular en las líneas celulares RKO WT y RKO E2 durante 4 días de cultivo. Los datos representan la media y SD de tres réplicas técnicas.

Los resultados de proliferación celular indican que la línea celular que expresa la proteína viral E2 del VPH16 prolifera ligeramente más rápido a partir del segundo día de cultivo en comparación con la línea celular control. De este modo, se corrobora que E2 ejerce funciones importantes en la célula que modifican su comportamiento y que se relacionan probablemente con su interacción con la proteína p53.

## Ensayos de expresión relativa

### Extracción de RNA

Posteriormente, se evaluó la respuesta de p53 a través de la evaluación de genes responsivos a esta proteína, p21 y Mdm2. Primero se evaluaron estos genes tras la

expresión constitutiva de E2 y posteriormente frente al estímulo de daño con doxorubicina.

Después de que se extrajo el RNA de ambas líneas celulares, se midió la concentración, así como los índices de pureza por espectrofotometría. Algunas de las muestras que se usaron se encuentran en la siguiente tabla:

Muestra	Concentración	260/280	260/230
<b>RNA RKO WT</b>	161.5 ng/ $\mu$ L	2.03	2.23
<b>RNA RKO WT T4</b>	121.4 ng/ $\mu$ L	2.03	2.03
<b>RNA RKO E2</b>	111.5 ng/ $\mu$ L	2.04	2.22
<b>RNA RKO E2 T4</b>	112.3 ng/ $\mu$ L	2.02	2.19

RKO WT T4: Células Wild Type 4 h después del tratamiento con doxorubicina, RKO E2 T4: Células RKO transducidas con E2 4 h después del tratamiento con doxorubicina.

Como se puede observar, los índices indican que la pureza obtenida del material genético es buena y así fue con el resto de las muestras que se emplearon. Posteriormente, se corroboró que las muestras no tuvieran DNA contaminante a través de una PCR de punto final (figura 16).

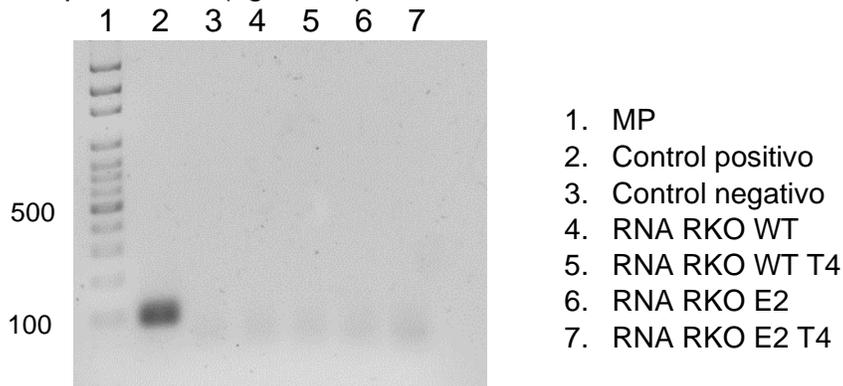


Figura 16. PCR de punto final para  $\beta$ 2-microglobulina. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Una vez que se corroboró que se tenía RNA de buena calidad y libre de contaminación con DNA, se procedió a sintetizar cDNA y se corroboró la expresión de E2 en cada línea celular y de esta manera validar el modelo de estudio.

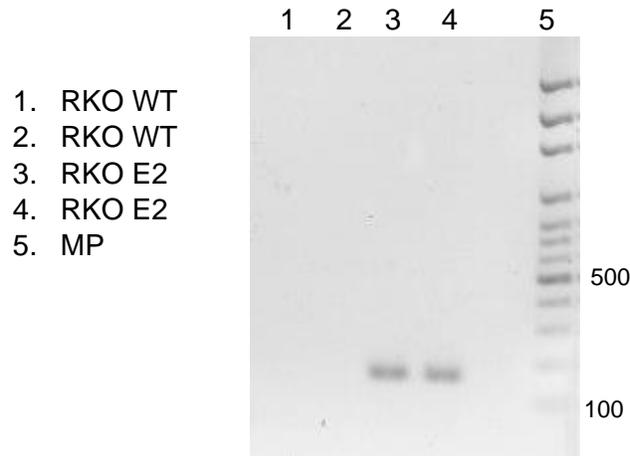


Figura 17. PCR de punto final para E2. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

### Expresión relativa de genes responsivos a p53

Posteriormente, se midió la expresión relativa de los genes responsivos a p53 mediante qPCR. En primera instancia, se midió la expresión relativa de p21 y Mdm2 con el fin de evaluar la respuesta de estos genes tras la expresión constitutiva de E2 en la línea celular RKO. Primero se evaluó la formación de dímeros de *primers* en los ensayos de qPCR a través del análisis de las curvas de disociación que se muestran a continuación.

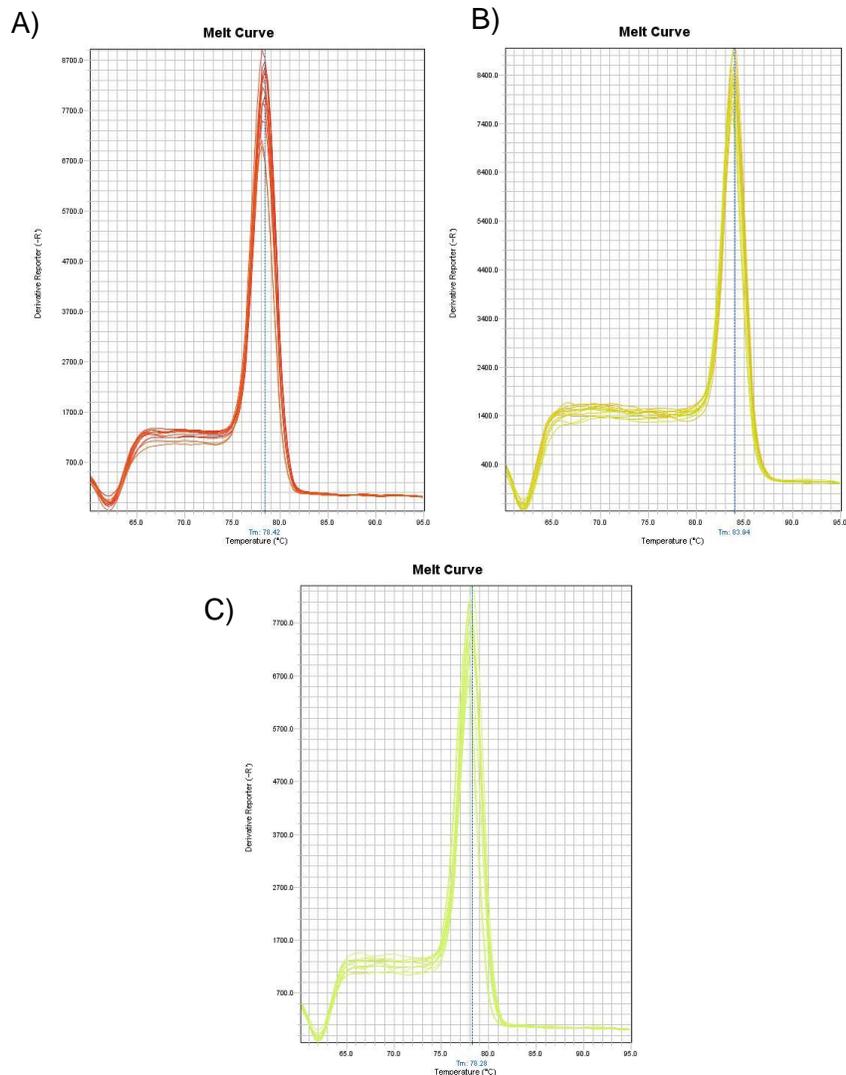


Figura 18. Curvas de disociación de A)  $\beta$ 2-microglobulina, B) p21 y C) Mdm2 que muestran la especificidad de los productos de amplificación.

Sabiendo que los productos de amplificación son específicos, se procedió a medir la expresión relativa de p21 y Mdm2 en las líneas celulares RKO WT y RKO E2 (figura 19). Se observa que en el caso del gen p21 existe un ligero aumento en la expresión en las células RKO E2, mientras que el gen Mdm2 tiende a disminuir ligeramente para estas mismas células. Los resultados sugieren que aunque la presencia de E2 en las células RKO afecta la expresión de los genes p21 y Mdm2, estos efectos no suceden de manera drástica.

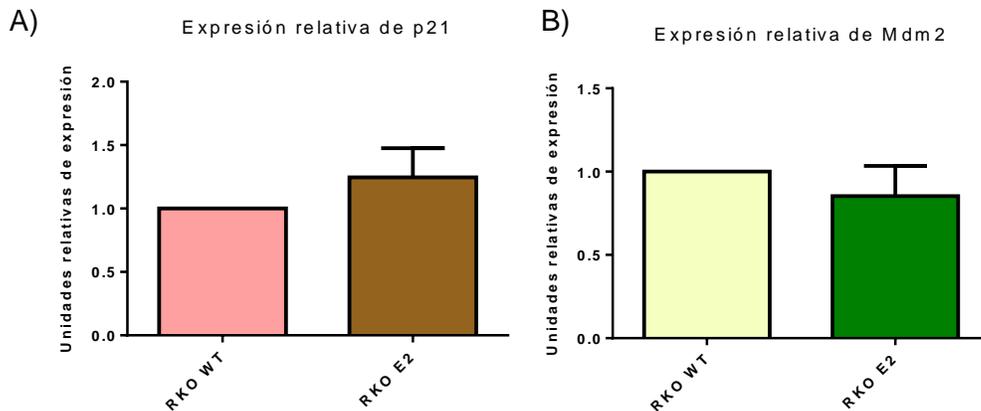


Figura 19. Expresión relativa de A) p21 y B) Mdm2 en células RKO WT y RKO E2. Los resultados representan la media y SD de dos experimentos independientes.

Debido a que no se observaron cambios drásticos en la expresión de los genes responsivos a p53 sólo tras la expresión constitutiva de E2, se procedió a estimular la respuesta a daño de p53 mediante tratamientos con doxorubicina y se midió la expresión de estos mismos genes.

Se midió en primer lugar la expresión de p21 en las células RKO WT a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas posteriores al estímulo de daño con doxorubicina 1  $\mu$ M. De forma simultánea se midió la expresión de células RKO WT sin estímulo a los mismos tiempos como control negativo al tratamiento. Se puede observar en la gráfica (figura 20) que la expresión del gen p21 aumenta de forma ascendente hasta las 24h en las células estimuladas al daño con doxorubicina. En contraste y de forma esperada, las células que no recibieron el estímulo no cambiaron la expresión de p21 a través del tiempo y se mantuvieron de forma similar a lo observado al tiempo cero.

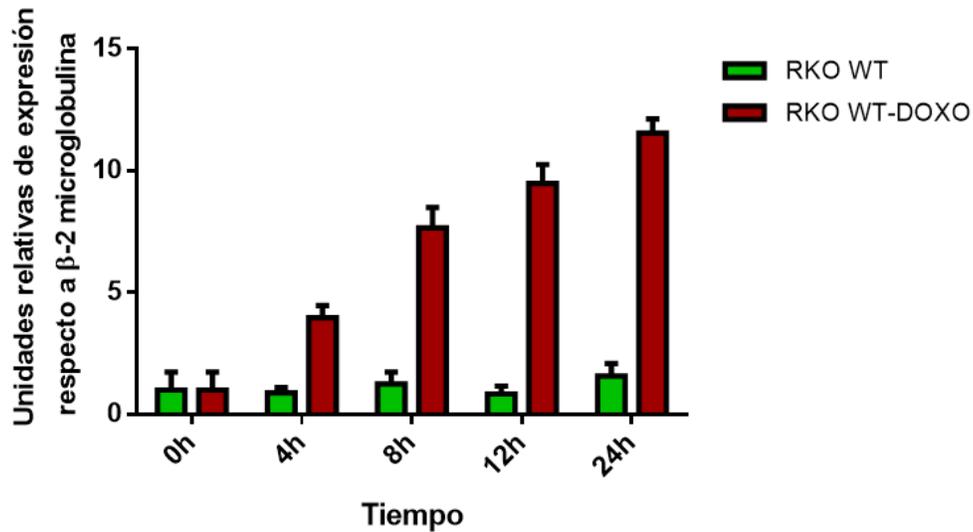


Figura 20. Expresión relativa de p21 en células RKO WT a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas posterior al estímulo de daño con doxorubicina 1  $\mu$ M (barras rojas) en comparación con células RKO WT no estimuladas (barras verdes). Los resultados representan la media y SD de dos experimentos independientes.

Por otro lado, cuando se mide la expresión relativa de este mismo gen en las células que expresan constitutivamente E2 del VPH16, se observa el mismo comportamiento que las células RKO WT, es decir, la expresión se mantiene en todos los tiempos medidos. Sin embargo, cuando se estimula el daño con doxorubicina, a pesar de que también se observa un aumento gradual hasta las 12 horas, éste es menor en comparación con las células WT (figura 21).

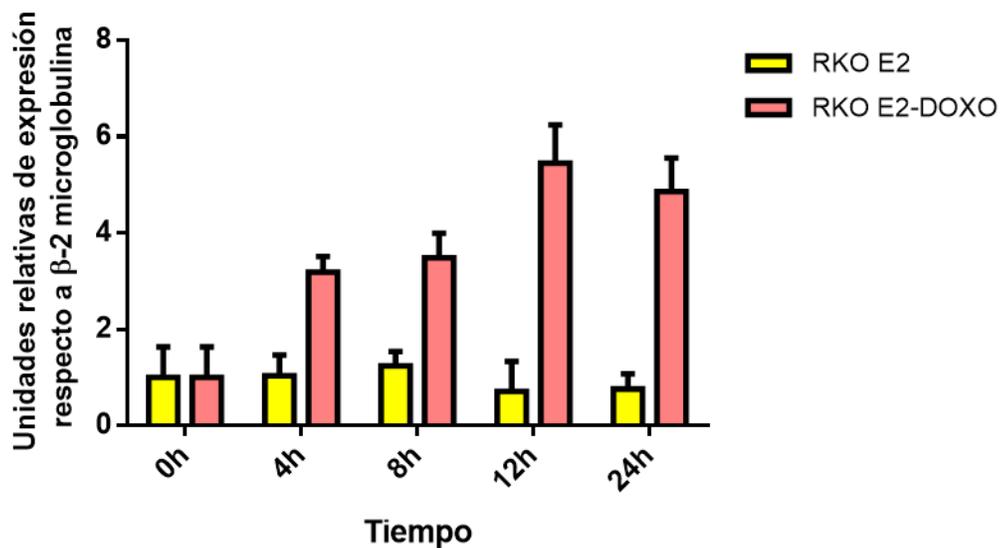


Figura 21. Expresión relativa de p21 en células RKO E2 a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas posterior al estímulo de daño con doxorrubicina 1  $\mu$ M (barras rosas) en comparación con células RKO E2 no estimuladas (barras amarillas). Los resultados representan la media y SD de dos experimentos independientes.

Cuando se compara la respuesta de las células RKO WT con las células RKO E2 al daño inducido por doxorrubicina (figura 22) se puede observar que la respuesta máxima de expresión de las células RKO WT se da a las 24 horas, aumentando la abundancia del mRNA de p21 aproximadamente 12 veces respecto al tiempo cero. Por otro lado, en la línea celular RKO E2 la respuesta máxima se alcanza a las 12 horas después del estímulo de daño, siendo este aumento de aproximadamente 5 veces respecto al tiempo inicial.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la presencia de E2 del VPH16 en las células RKO (p53 +/+) disminuye la respuesta al daño por doxorrubicina del gen p21 a través del tiempo.

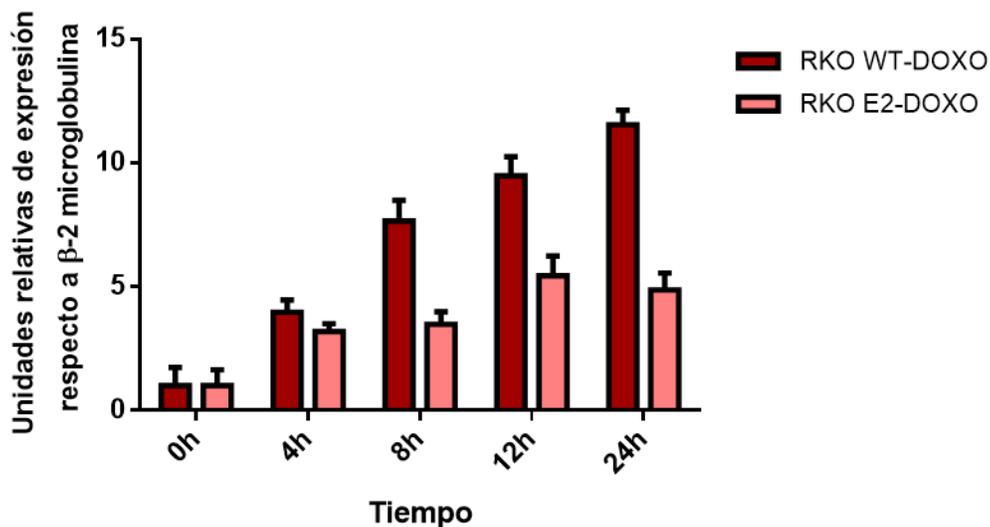


Figura 22. Comparación de la expresión relativa de p21 en células RKO WT (barras rojas) y RKO E2 (barras rosas) a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas posterior al estímulo de daño con doxorrubicina 1  $\mu$ M. Los resultados representan la media y SD de dos experimentos independientes.

Posteriormente, se midió la expresión del gen Mdm2, para lo cual se siguió la misma estrategia que para el gen p21. Se midió la expresión relativa en las células RKO WT sin estimular a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas observando que mantenían la expresión de forma similar que el control de las cero horas. Mientras que cuando se les agrega

el estímulo de daño con doxorubicina, la expresión de Mdm2 comienza a aumentar desde las primeras 4 horas, alcanzando la expresión máxima a las 8 horas posterior al daño y después desciende de forma gradual hasta las 24 horas (figura 22).

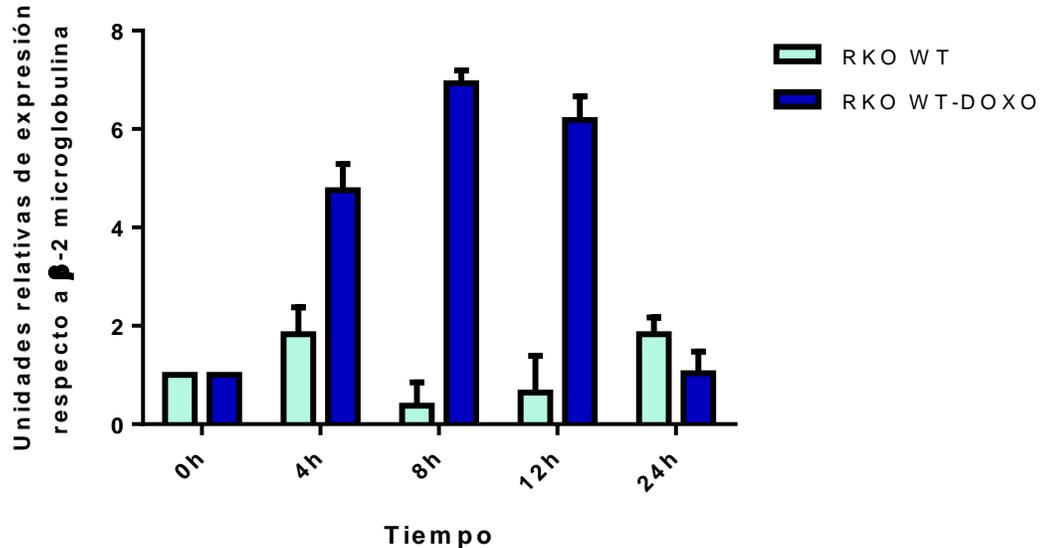


Figura 23. Expresión relativa de Mdm2 en células RKO WT a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas posterior al estímulo de daño con doxorubicina 1  $\mu$ M (barras azules) en comparación con células RKO WT no estimuladas (barras celestes). Los resultados representan la media y SD de dos experimentos independientes.

Al medir la expresión relativa de Mdm2 en las células RKO que contienen el transgen para E2 y que fueron tratadas con doxorubicina (figura 23), se observa que no existe respuesta transcripcional en las primeras 8 horas como ocurre en las células RKO WT. El efecto máximo ocurre a las 12 horas y posteriormente desciende a las 24 horas.

De forma esperada, las células que no fueron tratadas con el estímulo de daño no cambiaron la expresión de este gen al paso del tiempo y se mantuvieron de forma similar al tiempo cero.

Los resultados de expresión para Mdm2 obtenidos, sugieren que la presencia de E2 en las células RKO (p53 +/+) retrasan la respuesta transcripcional de este gen frente a un estímulo de daño. Lo anterior se observa con más claridad cuando se comparan los resultados de la línea celular RKO WT vs RKO E2 (figura 24).

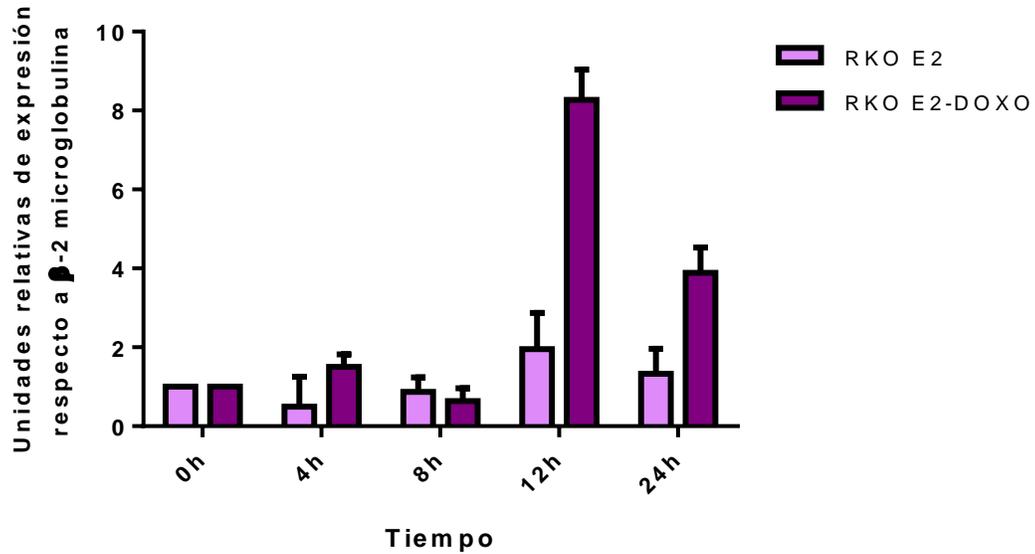


Figura 24. Expresión relativa de Mdm2 en células RKO E2 a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas posterior al estímulo de daño con doxorubicina 1  $\mu$ M (barras moradas) en comparación con células RKO E2 no estimuladas (barras lilas). Los resultados representan la media y SD de dos experimentos independientes.

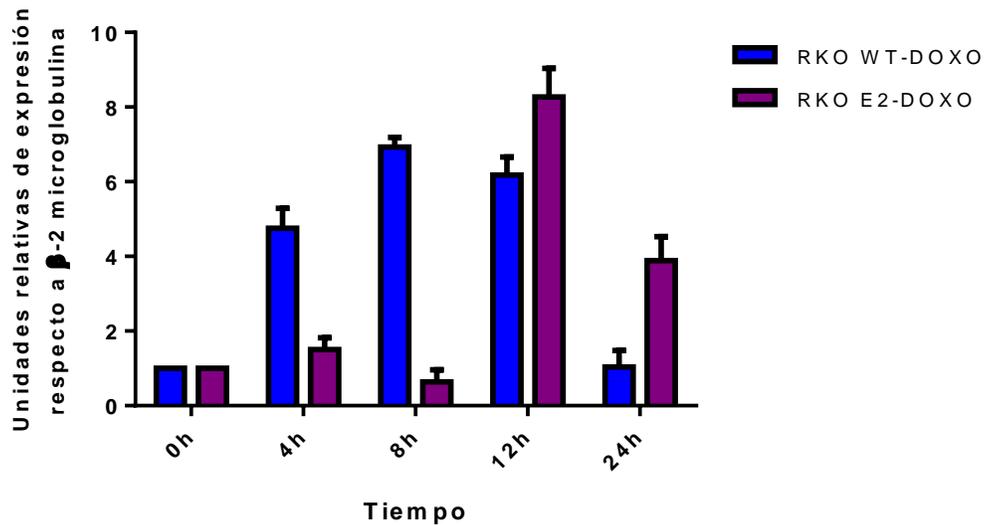


Figura 25. Comparación de la expresión relativa de Mdm2 en células RKO WT (barras azules) y RKO E2 (barras moradas) a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas posterior al estímulo de daño con doxorubicina 1  $\mu$ M. Los resultados representan la media y SD de dos experimentos independientes.

## DISCUSIÓN

### Evaluación de la expresión constitutiva de E2 sobre la vía de p53

La proteína de expresión temprana E2, juega un papel crucial en el ciclo replicativo del virus. Se ha demostrado que es capaz de activar o reprimir la transcripción celular en diferentes sistemas experimentales, lo cual se propone que ocurre a través de la interacción con múltiples proteínas de tipo celular entre las que destaca p53 (22).

Por su parte, la proteína supresora de tumores p53 es un factor de transcripción que es capaz de inducir una gran variedad de vías de señalización que son importantes para la supervivencia de la célula, tales como el arresto del ciclo celular, angiogénesis, apoptosis, reparación de DNA, senescencia celular, entre otras (59). La interacción que tiene p53 con otras proteínas y el DNA es crucial para que desempeñe sus funciones. De esta manera, desde hace algunos años se conoce que existe interacción *in vitro* e *in vivo* entre p53 y E2 (48), sin embargo, no se conocen las consecuencias a nivel celular de esta interacción.

Los resultados de este trabajo, demuestran que al medir la expresión de la proteína p53 en un modelo celular p53 silvestre (+/+) que expresa de forma constitutiva al gen E2 del VPH16, los niveles de p53 tienden a disminuir ligeramente respecto al sistema celular que no expresa al transgen (figura 14). De esta forma, se sugiere que la presencia de E2 podría promover la degradación de p53.

Se sabe que algunas de las proteínas con las que interactúa E2 del VPH 16 y 18 también incluyen elementos del sistema ubiquitina proteosoma que corresponden a adaptadores de sustrato de complejos a base de cullina. Entre estos se incluyen CDC20 y FZR1 que son dos subunidades de reconocimiento de sustrato del complejo ubiquitin ligasa APC/C, que se encarga de la degradación de sustratos específicos como la ciclina B (23). De esta manera, se ha sugerido que E2 no sólo podría modificar la acción de las ubiquitin ligasas hacia sus sustratos naturales, sino que podría actuar como un adaptador de nuevos sustratos.

Bajo este contexto, E2 podría tener consecuencias similares a la oncoproteína viral E6, que induce a la proteína ligasa asociada a E6 (E6AP) hacia la ubiquitinación y subsecuente degradación de sustratos como p53 (60). En este caso, E2 estaría llevando a p53 como sustrato para su degradación mediante estos complejos y de esta forma disminuiría la cantidad de proteína p53 en las células que expresan de forma constitutiva a E2.

Como se ha mencionado, la proteína p53 juega un papel primario en la regulación de múltiples procesos celulares, uno de ellos es controlar la proliferación de células que presentan cambios en su genoma o presentan algún tipo de daño, como ocurre en los procesos oncogénicos. De hecho, se conoce desde hace varios años su actividad como supresor de tumores, de tal forma que la falta de la proteína p53 activa provoca aproximadamente el 50% de la mutación del gen TP53 y es el origen de muchos cánceres (61). Siguiendo con la premisa de que E2 de algún modo promueve la degradación de la proteína p53, se midió la proliferación celular en la línea celular RKO con y sin E2, observando que cuando E2 se expresa, las células tienden a proliferar ligeramente más rápido (figura 15), lo que puede explicarse por la reducción de la proteína p53 observada en estas células y por tanto la reducción de un control celular importante.

Debido a que este trabajo se enfoca en saber los efectos de la expresión constitutiva de E2 sobre la vía de p53, una parte importante de esta son los genes responsivos a p53, es decir, aquellos que son activados principalmente por esta proteína y mediante los cuales ejerce la mayoría de sus funciones en los procesos biológicos donde participa. Se conocen más de 100 blancos transcripcionales directos de p53, sin embargo, los más conocidos son p21 y Mdm2. La activación transcripcional por p53 es bastante entendida e involucra el reclutamiento de tetrámeros de p53 a los elementos de respuesta específicos (p53RE) presentes en los promotores de los genes blanco (62).

Al medir la expresión de p21 y Mdm2 tras la expresión constitutiva de E2 del VPH16, se observan cambios mínimos (figura 19), que, si bien pueden ser propios del sistema, se atribuyen a que no hay un estímulo suficiente para que estos genes

sean activados, ya que la proteína p53 es estimulada por señales de estrés tal como daño al DNA. La consecuencia es la transactivación de sus genes blanco que resulta en eventos como el arresto del ciclo celular, senescencia o apoptosis para prevenir la proliferación del daño (29,62).

### Evaluación del efecto de la expresión constitutiva de E2 sobre la vía de p53 después de un estímulo de daño con doxorrubicina

Con el propósito de activar rutas dependientes de p53, se aplicó un tratamiento con doxorrubicina a las líneas celulares RKO que expresan o no E2, induciendo rompimientos de doble cadena a través de la inhibición de la topoisomerasa II (57). Estos tratamientos ayudaron a entender cómo la presencia de E2 del VPH16 afectaba la respuesta de p53 sobre la activación de p21 y Mdm2.

Por una parte, p21 es un miembro de la familia Cip/Kip, un grupo de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, induce arresto del ciclo celular a través de la unión e inhibición de los complejos CDK4 y CDK6/Ciclina D. La activación de este gen permite que la célula active mecanismos de reparación necesarios para su supervivencia (29,62). De forma interesante, al medir la expresión de p21 en las células que expresan E2 y que son tratadas con doxorrubicina, la activación transcripcional es menor cuando se compara con las células que no lo expresan (figura 22).

Con los resultados anteriores, se sugiere que el retraso en la respuesta transcripcional de p21 podría estar relacionado con la disminución en los niveles de la proteína p53 en las células que expresan E2 que se observaron en este mismo trabajo. Sin embargo, no son descartables otros niveles de regulación en los que podría intervenir E2, por ejemplo; la tetramerización de p53, la cual es esencial para que esta proteína se establezca y se una específicamente a los sitios de respuesta en sus genes blanco, o incluso, inhibir o favorecer algunas modificaciones post-traduccionales necesarias para la estabilización de la proteína p53 (30).

Por otro lado, se determinaron los niveles relativos del gen Mdm2 que codifica para una E3 ubiquitin ligasa que, en condiciones ausentes de estrés celular, mantiene

los niveles celulares de p53 bajos a través de su poli-ubiquitinación y posterior degradación proteosomal. Sin embargo, en condiciones de estrés, la degradación proteosomal de Mdm2 es estimulada y p53 se estabiliza y se activa. Además, Mdm2 es uno de los blancos transcripcionales de p53, por lo que forman un *loop* de regulación negativo ampliamente estudiado (63,64). Como se mencionó, en condiciones de estrés Mdm2 es activado transcripcionalmente por p53 y a través del tiempo posterior al estímulo de daño, tiene una cinética de expresión en forma de campana debido al *loop* negativo de regulación p53-Mdm2.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, la respuesta máxima de expresión de Mdm2 se obtuvo a las 8 horas posteriores al estímulo de daño y posteriormente descendió de forma gradual (figura 23). Este comportamiento ya ha sido observado previamente por el trabajo de Purvis J, 2012 (38). Sin embargo, cuando se mide la expresión de este mismo gen en las células que expresan a E2, no existe una respuesta transcripcional en las primeras horas posteriores al estímulo de daño, siendo hasta las 12 horas cuando se observa un aumento en la expresión y 4 horas después decae (figura 24).

Es evidente que existen diferencias en la activación transcripcional de Mdm2 cuando se encuentra presente la proteína viral E2 en el sistema, y esto se puede observar de forma más clara cuando se comparan los resultados de ambas líneas celulares (figura 25). Nuevamente, estos resultados se pueden justificar con la disminución en los niveles de la proteína p53 por la presencia de E2.

Los efectos de la expresión constitutiva de la proteína viral E2 del VPH16 en un modelo celular p53 silvestre (+/+), sugieren que hay una disminución de la proteína p53 posiblemente a través de la degradación de esta, dirigida por E2 y un posible complejo ubiquitin proteosoma, lo que conlleva a una disminución en la activación transcripcional de los genes p21 y Mdm2 que son blancos de p53 y responden a daño. Aunque es necesaria más investigación al respecto, el hecho de que E2 promueva la degradación de p53 es un evento previamente sugerido e innovador, pero poco estudiado.

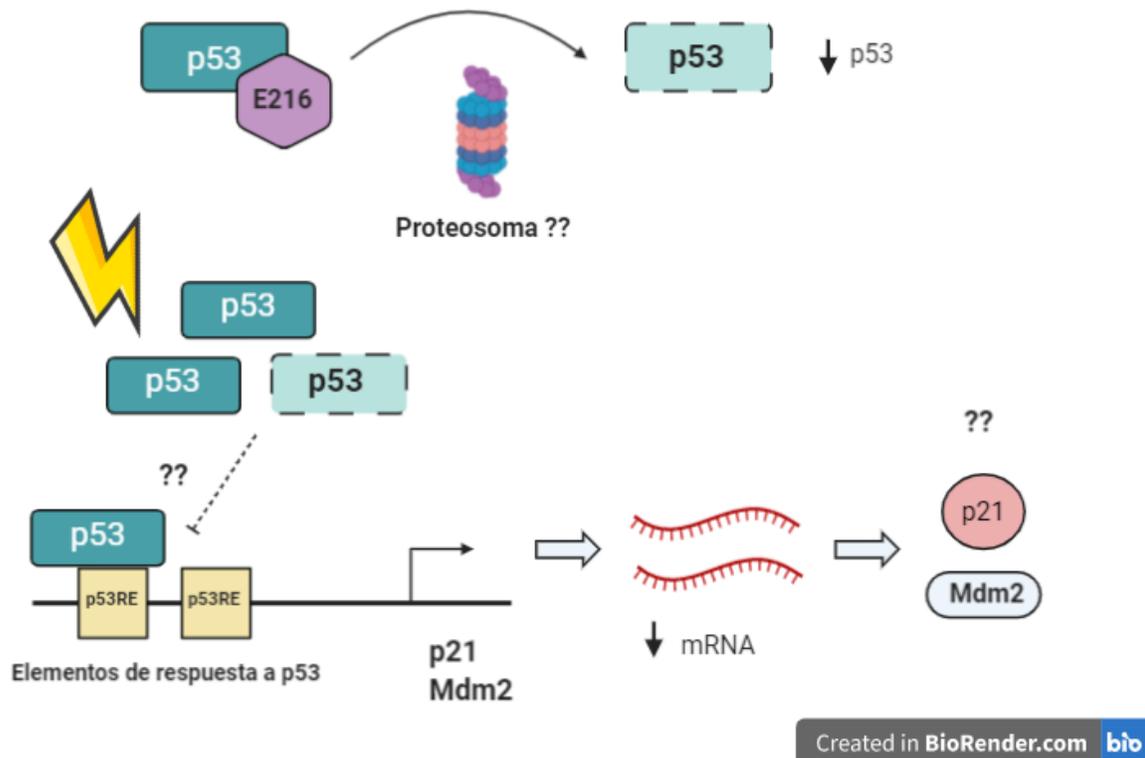


Figura 26. Modelo propuesto para la interacción E2 del VPH16 y p53. La proteína viral E2 del VPH16 de alguna forma disminuye la expresión de la proteína p53, probablemente favoreciendo su degradación mediante un complejo proteosoma. La reducción de la proteína p53 hace que, en presencia de un estímulo de daño, probablemente p53 no se una de forma eficiente a sus sitios responsivos y la activación transcripcional de p21 y Mdm2 disminuya. Es desconocido si esta disminución también se da a nivel de proteína.

## CONCLUSIONES

- ✚ La expresión constitutiva de E2 del VPH 16 en la línea celular RKO (p53 WT) disminuye los niveles de la proteína p53 y aumenta su proliferación celular.
- ✚ La expresión constitutiva de E2 del VPH 16 en la línea celular RKO (p53 WT) disminuye la activación transcripcional de p21 en respuesta a daño inducido por doxorubicina.
- ✚ La respuesta transcripcional de Mdm2 no se activa en tiempos tempranos posterior al estímulo de daño por doxorubicina en la línea celular RKO (p53 WT) que expresa a E2 de forma constitutiva.

## PERSPECTIVAS

- ✚ Evaluar el nivel de proteína de p53 en los tiempos 4,8,12 y 24 horas posterior al estímulo de daño con doxorubicina en la línea celular RKO E2 y WT.
- ✚ Evaluar el pegado de p53 a los genes p21 y Mdm2 en presencia y ausencia de E216 con y sin estímulo de daño por doxorubicina.
- ✚ Evaluar los procesos celulares regulados por p53 (ciclo celular y apoptosis) en presencia y ausencia de E216.

## REFERENCIAS

1. Graham SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci* [Internet]. 2017;131(17):2201–21. Available from: <http://www.clinsci.org/cgi/doi/10.1042/CS20160786>
2. Brianti P, De Flammineis E, Mercuri SR. Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiol*. 2017;40(2):80–5.
3. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2010;117(2 SUPPL.):S5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.01.024>
4. Celewicz A, Celewicz M, Michalczyk M, Rzepka R. Review Article Perspectives in HPV Secondary Screening and Personalized Therapy Basing on Our Understanding of HPV-Related Carcinogenesis Pathways. 2020;2020.
5. World Health Organization, WHO. Virus del papiloma humano (VPH) [Internet]. Inmunización, vacunas y productos biológicos. 2017 [cited 2019 May 6]. Available from: <https://www.who.int/immunization/diseases/hpv/es/>
6. WHO. GLOBOCAN 2018: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2018 [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 22]. Available from: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=1](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=1)
7. Handler MZ, Handler NS, Majewski S. Human papillomavirus vaccine trials and tribulations. *J Am Dermatology* [Internet]. 2018;73(5):743–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2015.05.040>
8. Wang W, Xia X, Wang S, Sima N, Li Y, Han Z, et al. Oncolytic adenovirus armed with human papillomavirus E2 gene in combination with radiation demonstrates synergistic enhancements of antitumor efficacy. *Cancer Gene Ther*. 2011;18(11):825–36.
9. Human KD, Graham S V. Keratinocyte Differentiation-Dependent Human Papillomavirus Gene Regulation. 2017;
10. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection : unresolved issues. 2007;7(January):11–22.
11. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005;32(SUPPL.):7.
12. Femenina G es S. Ginecoweb, VPH [Internet]. 2019 [cited 2020 Apr 23]. Available from: <https://ginecoweb.com/biologia-del-vph/vph-3d/>
13. Zheng, Zhi Ming, Baker CC. Papillomavirus Genome Structure, Expression,

- and Post-Transcriptional Regulation. *Front Biosci.* 2008;11:2286–302.
14. Bergvall M, Melendy T, Archambault J. NIH Public Access. *Virology.* 2014;445(0):1–47.
  15. Smith JA, Haberstroh FS, White EA, Livingston DM, Decaprio JA, Howley PM. SMCX and components of the TIP60 complex contribute to E2 regulation of the HPV E6 / E7 promoter. *Virology* [Internet]. 2014;468–470:311–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.022>
  16. Harden ME, Munger K. *Human Papillomavirus Molecular Biology. Mutat Res.* 2017;772:3–12.
  17. Kim M, Seung H, Kim S, Oh J, Yong J, Mook J, et al. Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2010;80(12):1930–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2010.07.013>
  18. Palefsky M, Holly A. *Molecular Virology and Epidemiology of Human Cervical Papillomavirus and CERVICAL.* 1995;4.
  19. Ribeiro AL, Caodaglio AS, Sichero L. Regulation of HPV transcription. 2018;(20):1–8.
  20. Iftner T, Haedicke-Jarboui J, Wu S-Y, Chiang C-M. Involvement of Brd4 in different steps of the papillomavirus life cycle. *Virus Res.* 2017;231(1):76–82.
  21. McBride A. The papillomavirus E2 proteins. *Virology* [Internet]. 2013;445(1–2):57–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.006>
  22. Graham S V. Human Papillomavirus E2 Protein: Linking Replication, Transcription, and RNA Processing. *J Virol.* 2016;90(19):8384–8.
  23. Muller M, Demeret C. The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions : A Complex Hijacking of the Cellular Network. *Open Virol J.* 2012;6:173–89.
  24. McBride AA. The Papillomavirus E2 proteins. *Virology* [Internet]. 2013;445(1–2):57–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.006>
  25. Singh N, Senapati S, Bose K. Insights into the mechanism of human papillomavirus E2-induced procaspase-8 activation and cell death. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(503):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep21408>
  26. Bellanger S, Blachon S, Mechali F, Bonne- C, Thierry F, Bellanger S, et al. High-Risk but not Low-Risk HPV E2 Proteins Bind to the APC Activators Cdh1 and Cdc20 and cause genomic instability. *Cell cycle.* 2005;4:1608–15.
  27. Gomez-Lazaro M, Fernandez-Gomez FJ, Jordán J. P53: Twenty Five Years Understanding the Mechanism of Genome Protection. *J Physiol Biochem* [Internet]. 2004;60(4):287–307. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15957248>

28. Sullivan KD, Galbraith MD, Andrysiak Z, Espinosa JM. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ* [Internet]. 2018;25(1):133–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.174>
29. Hafner A. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2019;20(April). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0110-x>
30. Kamada R, Toguchi Y, Nomura T, Imagawa T, Sakaguchi K. Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications. *Biopolymers*. 2016;106(4):598–612.
31. Kamaraj B, Bogaerts A. Structure and function of p53-DNA complexes with inactivation and rescue mutations: A molecular dynamics simulation study. *PLoS One*. 2015;10(8):1–16.
32. Pitolli C, Wang Y, Candi E, Shi Y, Melino G, Amelio I. p53-Mediated Tumor Suppression: DNA-Damage Response and Alternative Mechanisms. *Cancers (Basel)*. 2019;11:1–14.
33. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2017;36(28):3943–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2016.502>
34. Ho T, Tan BX, Lane D. How the Other Half Lives : What p53 Does When It Is Not Being a Transcription Factor. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13).
35. Mijit M, Caracciolo V, Melillo A, Amicarelli F, Giordano A. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules*. 2020;10:1–16.
36. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;1–16.
37. Engeland K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53 : I have a DREAM. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2017;25(1):114–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.172>
38. Purvis J, Karhohs K, Mock C, Batchelor E, Loewer A, Lahav G. p53 Dynamics Control Cell Fate. *Science (80- )*. 2012;336(June):1440–4.
39. Jan R, Chaudhry G. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull* [Internet]. 2019;9(2):205–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.15171/jcvtr.2015.24>
40. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression ? *Nat Publ Gr* [Internet]. 2018;25(1):104–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.169>
41. Espinosa JM, Verdun RE, Emerson BM. p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. *Mol Cell*. 2003;12(4):1015–27.
42. Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of

p53 by genotoxic stresses. 2001;2772:2764–72.

43. Weinberg RL, Veprintsev DB, Fersht AR. Cooperative Binding of Tetrameric p53 to DNA. 2004;1145–59.
44. Inga A, Storici F, Darden TA, Resnick MA. Differential Transactivation by the p53 Transcription Factor Is Highly Dependent on p53 Level and Promoter Target Sequence. 2002;22(24):8612–25.
45. Ko LJ, Jayaraman L, Prives C. p53 levels , functional domains , and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. 1996;2(Baserga 1994):2438–51.
46. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2019;20(4):199–210. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0110-x>
47. Hafner A, Stewart-ornstein J, Purvis JE, Forrester WC, Bulyk ML, Lahav G. p53 pulses lead to distinct patterns of gene expression albeit similar DNA-binding dynamics. 2017;24(10).
48. Massimi P, David P, Bertoli C, Bouvard V, Banks L. Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene*. 1999;18(54):7748–54.
49. Brown C, Kowalczyk AM, Taylor ER, Morgan IM, Gaston K. p53 represses human papillomavirus type 16 DNA replication via the viral E2 protein. *Virology*. 2008;5:1–9.
50. 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(3):373–89.
51. Parish JL, Kowalczyk A, Chen H-T, Roeder GE, Sessions R, Buckle M, et al. E2 Proteins from High- and Low-Risk Human Papillomavirus Types Differ in Their Ability To Bind p53 and Induce Apoptotic Cell Death. *J Virol*. 2006;80(9):4580–90.
52. Domínguez-Catzín V, Reveles-Espinoza AM, Sánchez-Ramos J, Cruz-Cadena R, Lemus-Hernández D, Garrido E. HPV16-E2 protein modifies self-renewal and differentiation rate in progenitor cells of human immortalized keratinocytes. *Virology*. 2017;14(1):1–13.
53. Levine AJ, Puzio-kuter AM, Chan CS, Hainaut P. The Role of the p53 Protein in Stem-Cell Biology and Epigenetic Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;1–23.
54. Jain AK, Barton MC. p53 : emerging roles in stem cells , development and beyond. *Development*. 2018;1–10.
55. Ramírez-Salazar E, Garrido E, Salcedo M, Nieto K, Valencia-Hernández A,

- Centeno F. HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. *Virology J* [Internet]. 2011;8(1):247. Available from: <http://www.virologyj.com/content/8/1/247>
56. Alejandra LV. Estudio de la relevancia del estado del gen p53 sobre los efectos regulatorios de E2 de VPH-16 en promotores celulares dependientes de TAF-1. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; 2016.
  57. Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2014;1845(1):84–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.002>
  58. Rampersad SN. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)*. 2012;12(9):12347–60.
  59. Rangel-Pozzo A, Booth S, Yu PLI, Singh M, Selivanova G, Mai S. p53 CRISPR Deletion Affects DNA Structure and Nuclear Architecture. *J Clin Med*. 2020;9(2):598.
  60. Ruttkay-nedecky B, Maria ANA, Jimenez J, Nejdil L, Chudobova D, Gumulec J, et al. Relevance of infection with human papillomavirus : The role of the p53 tumor suppressor protein and E6 / E7 zinc finger proteins ( Review ). *Int J Oncol*. 2013;1754–62.
  61. Wawryk-gawda E, Chyli P, Lis-sochocka M. P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma*. 2014;251:525–33.
  62. Benson EK, Mungamuri SK, Attie O, Kracikova M, Sachidanandam R, Manfredi JJ, et al. p53-dependent gene repression through p21 is mediated by recruitment of E2F4 repression complexes. *Oncogene*. 2014;(October 2013):3959–69.
  63. Urso L, Calabrese F, Favaretto A, Conte P, Pasello G. Critical review about MDM2 in cancer: Possible role in malignant mesothelioma and implications for treatment. *Crit Rev Oncol / Hematol* [Internet]. 2015; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.08.019>
  64. Sala-gaston J, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL, Vi F. Regulation of the MDM2-p53 pathway by the ubiquitin ligase HERC2. *Mol Oncol*. 2020;14:69–86.

# ANEXO

Curva estándar de BSA para la cuantificación de proteínas.

