



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN EXÓGENA DE SRSF1 EN APOPTOSIS EN  
CÉLULAS DERIVADAS DE CÁNCER CERVICOUTERINO**

**T E S I S**

Que presenta

**REMBERTO CONDE CAMPOS**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**BIOMEDICINA MOLECULAR**

Director de Tesis:

**DR. NICOLÁS VILLEGAS SEPÚLVEDA**

Co-director de Tesis:

**DR. ROBERTO EDUARDO LÓPEZ URRUTIA**

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio No. 1 del departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, y con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## **DEDICATORIAS**

Mi trabajo de tesis de doctorado es dedicado enteramente a mi mamá Ma. Guadalupe Campos Romero, quién me ha apoyado y me ha mantenido a flote a pesar de las adversidades. A mi papá Rafael Conde Campos (QEPD), a mis hermanos, Rafael Conde Campos y Alicia Conde Campos, quienes me han mostrado su apoyo incondicional todo este tiempo.

Al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, quién con sus enseñanzas, comentarios y apoyo durante mi estancia en el laboratorio 1 me ayudaron a crecer en el ámbito científico y la investigación biomédica. Le agradezco mucho permitirme estar trabajando en su laboratorio y confiar en mi para este proyecto.

A los integrantes del L1, el auxiliar Biólogo Raúl Bonilla Moreno y el técnico Víctor Manuel Ortiz Santiago, por soportarnos en nuestra estancia en el laboratorio, colaborar en las actividades del proyecto y siempre darnos una palabra de aliento para continuar con el doctorado. Mi compañero de laboratorio Norberto Iván Bautista Gaytán, por estar en las buenas y en las malas y la confianza depositada en mi cuando se necesitaba.

Mis amigos de toda la vida Víctor, Lizbeth, Amparo y Juana, quienes siempre me alentaron a culminar los proyectos incluso en mis peores momentos. Mis amigos Ada, Laura, Elim y David, que también estuvieron a pie de cañón en todo momento. Mis compañeros de la maestría y doctorado, principalmente Pao, Lourdes, Gio y Juve, que nos hicimos compañía cuando se necesitaba y nos apoyamos cuando los experimentos no salían bien.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer la construcción de esta tesis de doctorado a mi familia, por apoyarme en cada momento, por los ánimos y esfuerzos cuando me sentía que nunca podría avanzar.

Gracias al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su paciencia y confianza, enseñarme investigación en biomedicina y aplicarla en el futuro. Por sus comentarios y nunca perder la confianza en mí.

Agradezco a mi co-tutor el Dr. Eduardo López Urrutia, mis sinodales, Dra. Rosaura Hernández Rivas, Dra. Leticia Cedillo Barrón, Dr. Jesús Valdés Flores, Dr. Vianney Ortiz Navarrete y Dr. Leopoldo Santos Argumedo por sus comentarios, observaciones, sugerencias y apoyo en general durante la elaboración de esta tesis de doctorado.

Al Biólogo Raúl Bonilla Moreno y el técnico Víctor Manuel Ortiz Santiago, por apoyarme en el desarrollo de experimentos y preparación de reactivos, así como el apoyo emocional durante mi estancia en el L1.

A Paola Briseño, Juvenal Mendoza y Víctor Rosales, quienes me ayudaron en estandarizar muchos protocolos, acompañarme y siempre estar en la disposición de enseñarme los fundamentos de técnicas.

Agradezco el apoyo de CONACyT para el financiamiento de mis estudios y hacer posible este doctorado.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	II
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
I. ANTECEDENTES.....	1
1. CÁNCER CERVICOUTERINO.....	1
2. ESTRUCTURA GENÓMICA Y CICLO REPLICATIVO DEL VHP16 .....	1
3. ONCOPROTEÍNAS E6 Y E7.....	3
4. APOPTOSIS Y VÍAS APOPTÓTICAS.....	5
5. REGULACIÓN Y RESISTENCIA A LA APOPTOSIS .....	8
6. <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO DE VPH16.....	11
7. PROTEÍNAS REGULADORAS DEL <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO.....	13
8. LA PROTEÍNA SRSF1 .....	15
9. SRSF1 UN PROTO-ONCOGÉN .....	16
10. SRSF1 Y LA RESISTENCIA A LA APOPTOSIS.....	18
II. ANTECEDENTES DIRECTOS .....	19
JUSTIFICACIÓN.....	22
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS.....	23
Objetivo general .....	23
Objetivos específicos .....	23
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Líneas celulares y condiciones de cultivo .....	24
Construcción de plásmidos .....	24
Transfección con lipofectamina .....	25
Ensayo de inmunofluorescencia.....	26
Extracción de RNA y tratamiento con DNAsa .....	27
Retro-Transcripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) .	28
Ensayo de western blot.....	28

Ensayo de defosforilación con fosfatasa lambda .....	30
Ensayo de inmunoabsorbencia ligada a enzima (ELISA).....	30
RESULTADOS.....	32
Caracterización del factor de <i>splicing</i> SRSF1 en líneas celulares derivadas de Cáncer Cervicouterino.....	32
Construcción de pSB-GN-FLAG-SRSF1 y pSB-TET-FLAG-SRSF1 .....	35
Incremento de expresión de SRSF1 en las líneas celulares HaCaT y SiHa transfectadas con pSB-GN-FLAG-SRSF1 y pSB-TET-FLAG-SRSF1 .....	36
La sobreexpresión de SRSF1 incrementa los niveles de transcritos de E6/E7 en SiHa .....	41
La sobreexpresión de SRSF1 en HaCaT y SiHa incrementa los niveles de transcrito y proteína de algunos factores de <i>splicing</i> y clAPs.....	41
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIÓN .....	56
PERSPECTIVAS .....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS.....	67

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Niveles de expresión de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en las líneas celulares transfectadas derivadas de Cáncer Cervicouterino. ....	45
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados durante el proyecto de doctorado .....	67
Tabla 3. Anticuerpos utilizados durante el proyecto de doctorado .....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo replicativo durante la infección productiva por VPH y organización de su genoma .....	3
Figura 2. Principales dominios de las oncoproteínas E6 y E7, e interacciones con otras proteínas en el queratinocito infectado.....	5
Figura 3. Versión simplificada de las vías intrínseca y extrínseca de apoptosis .....	10
Figura 4. Representación esquemática de los principales transcritos producidos por AS en VPH 16 .....	12
Figura 5. Regulación de la fosforilación del tráfico intracelular de las proteínas SR.....	14
Figura 6. Esquema estructural de la proteína SRSF1.....	15
Figura 7. Modelo de las actividades que contribuyen a la transformación en cáncer de mama .....	17
Figura 8. Esquema representativo del probable papel de la proteína SRSF1 en la regulación de apoptosis y regulación de oncoproteínas E6 y E7 de VPH16 .....	21
Figura 9. Perfil de expresión de factores de <i>splicing</i> en líneas celulares derivadas de Cáncer Cervicouterino.....	21
Figura 10. Representación esquemática del vector pSBbi-GN y pSB-TET. .	25
Figura 11. Expresión heterogénea de SRSF1 en líneas derivadas de Cáncer Cervical.....	33
Figura 12. Expresión heterogénea de la proteína SRSF1 y de factores de <i>splicing</i> en líneas celulares derivadas de Cáncer Cervicouterino .....	35
Figura 13. Construcción del plásmido pSB-TET-Flag-SRSF1 .....	36
Figura 14. Sobreexpresión de SRSF1 en las líneas celulares HaCaT y SiHa transfectadas .....	38
Figura 15. Sobreexpresión de la proteína SRSF1 en las líneas transfectadas .....	39
Figura 16. Incremento de los transcritos de isoformas de E6/E7 de VPH16 detectados en la línea celular SiHa transfectada .....	41
Figura 17. Alteración en los niveles de expresión de factores de <i>splicing</i> en las líneas celulares transfectadas derivadas de Cáncer Cervicouterino.....	42
Figura 18. Alteración de la expresión de proteínas reguladoras de apoptosis en las líneas celulares transfectadas derivadas de Cáncer Cervicouterino ..	43
Figura 19. Alteración de los niveles de expresión de interleucinas y de reguladores de NFκB en las líneas celulares transfectadas derivadas de Cáncer Cervicouterino .....	44
Figura 20. Esquema propuesto de resumen de resultados .....	79

## ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ADA	Proteína de activación en alteración/deficiencia
AIF	Factor inductor de apoptosis
APAF-1	Factor activador de peptidasa apoptótica 1
ATM-ATR	Proteínas cinasas ataxia-telangiectasia mutada y relacionadas con ATM y Rad3
ASF/SF2	<i>Alternative Splicing Factor/Splicing Factor 2</i>
BCL-2	Proteína <i>B-cell lymphoma 2</i>
BAK	Proteína <i>Bcl-2 antagonist/killer 1</i>
BAX	Proteína asociada a Bcl-2 X
BID	Proteína <i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i>
BIR	Dominio <i>Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat</i>
CAD	Proteína carbamoilfosfato sintasa 2, aspartato transcarbamoilasa y dihidroorotasa
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasa conservado
CBP	Proteína de unión a CREB
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CIAP	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
Clk/Sty	<i>Cdc2-like kinase/Serine Threonine Tyrosine</i>
CMGK	Acrónimo: <i>cyclin-dependent kinases (CDKs), mitogen-activated protein kinases (MAP kinases), glycogen synthase kinases (GSK) and CDK-like kinase.</i>
CR	Regiones conservadas
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DED	Dominio efector de muerte
DISC	Complejo de señalización inducida por muerte
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNasa	Endonucleasa
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
dTT	<i>DL-Dithiothreitol</i>
E6-AP	Proteína asociada a E6
eIF4EBP1	Proteína de unión al factor de traducción eucarionte 4E 1
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ENSA	Endosulfina $\alpha$
ERK	Cinasa relacionada con señal extracelular
ESE	Elemento <i>enhancer</i> de <i>splicing</i>
FAS	Fas Cell Surface Death Receptor
FADD	Proteína de Dominio de Muerte Asociado a Fas
FLICE	<i>FADD-like ICE</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HDAC	Histona deacetilasa
hnRNP	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear
IFN	Interferón

IRF1/3	Factor regulatorio de interferón 1/3
LCR	Región Larga de Control
MAD	Proteína de la vía de degradación asociada a mitocondria
MAP	Proteínas asociadas a microtúbulo
MEM	Medio mínimo esencial
miRNA	Micro-RNA
MOMP	Permeabilización de membrana mitocondrial externa
mRNA	RNA mensajero
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
C-MYC	<i>Myelocytomatosis oncogene protein</i>
NETO2	<i>Neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2</i>
NFX123	<i>Nuclear transcription factor, X box-binding protein-123</i>
NMD	<i>Nonsense-mediated decay</i>
ORF	Marco Abierto de Lectura
PABPC1	<i>poly(A) binding protein, cytoplasmic 1</i>
pAE	Señal temprana de poliadenilación
PAK	Cinasa de proteína serina-arginina
pAL	Señal tardía de poliadenilación
pb	Pares de bases/nucleótidos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDZ	Acrónimo proteínas que comparten el dominio: <i>post synaptic density protein (PSD95)</i> , <i>Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1)</i> , y <i>zonula occludens-1 protein (zo-1)</i>
PFA	Paraformaldehído
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PRB	Proteína de Retinoblastoma
PTB1	Proteína de unión al tracto de polipirimidinas 1
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RBP	Proteínas de unión a RNA
RING	Dominio dedo de zinc " <i>Really Interesting New Gene</i> "
RIP	Proteína inactivadora de ribosomas
RIPA	Amortiguador para ensayo de radioinmunoprecipitación
RNA	Ácido Ribunucleico
RON	Cinasa <i>Recepteur d'Origine Nantais</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RRM	Motivo de unión a RNA
RT-PCR	Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa
S6K1	Proteína ribosomal cinasa S6 beta-1
Sam68	Src-Associated substrate in Mitosis of 68 kDa
SAS	Sitio aceptor de <i>splicing</i>
SDS*	Sitio donador de <i>splicing</i> /Duodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Suero Fetal Bovino
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SP1	Proteína de especificidad 1

SRPK	Cinasa de proteínas SR
SRSF	Factor de <i>splicing</i> rico en serina y arginina
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TAK	Cinasa del factor de crecimiento transformante $\beta$ activado
TBS	Tris amortiguador salino
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TERT	Transcriptasa Reversa de la Telomerasa
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TIA-1	Proteína antígeno intracelular de linfocitos T-1
TIAR	Proteína relacionada con TIA1 (Proteína de antígeno interno de célula T 1)
TRAIL	Proteína ligando inductor de apoptosis relacionada a TNF
TRAF	Proteína factor asociado al receptor de TNF
TRIF	Proteína adaptora que contiene un dominio del receptor Toll/interleucina-1
TNFR1	Receptor del factor de necrosis tumoral 1
UBA	Dominio asociado a Ubiquitina
UTR	Región no traducible
VPH	Virus de Papiloma Humano
VPH-AR	Virus de Papiloma Humano de alto riesgo
XIAP	<i>X-linked chromosome IAP</i>
WB	western blot

## RESUMEN

El Cáncer Cervicouterino es uno de los principales cánceres en mujeres a nivel mundial que impacta en países subdesarrollados y que, a pesar del gran progreso en los métodos de detección de lesiones y el conocimiento del genoma del VPH, se ha observado un incremento de nuevos casos y muertes anualmente. El VPH de alto riesgo se integra comúnmente en lesiones premalignas y carcinoma cervical, y a partir de la transcripción del bicistrón de E6/E7, se generan el pre-mRNA de E6/E7 y 3 isoformas de *splicing*, E6\*I, E6\*II y E6^E7. La expresión en el aumento de la concentración de algunos factores de *splicing* se ha relacionado con alteraciones celulares, como control del ciclo celular, proliferación y evasión de apoptosis, siendo catalogados como proto-oncogenes. En este trabajo se evaluó el efecto de la sobreexpresión de SRSF1 en los niveles de los transcritos de E6/E7, de factores de *splicing* y la regulación de apoptosis en células derivadas de Cáncer Cervicouterino. Con este fin, se utilizó el sistema inducible basado en transposones *Sleeping Beauty*, que permitió tener líneas celulares establemente transfectadas y el uso de doxiciclina para incrementar la expresión del gen de interés. Se transfectaron las líneas celulares HaCaT y SiHa con lipofectamina. Se llevó a cabo la validación del modelo de sobreexpresión de FLAG-SRSF1 y el efecto en otros factores de *splicing* y proteínas reguladoras de apoptosis. Los resultados mostraron un incremento en los transcritos de E6/E7, notablemente E6/E7<sup>pre-mRNA</sup> y E6\*I en la línea celular transfectada SiHa. Se mostraron incrementos del mRNA de CIAP1 y CIAP2 para la línea HaCaT transfectada. Se encontraron ligeros incrementos en los niveles de proteína de hnRNP I en ambas líneas celulares transfectadas, de p65 en la transfectante HaCaT e incremento de hnRNPA2/B1 en la transfectante SiHa. Nuestros datos sugieren que la sobreexpresión de SRSF1 altera los niveles de transcrito de isoformas de VPH16, así como los niveles de mRNA y de proteína de factores de *splicing* y proteínas reguladoras de apoptosis en las líneas celulares transfectadas HaCaT y SiHa.

## ABSTRACT

Cervical Cancer is one of the main cancers in women worldwide that impacts in underdeveloped countries and, despite great progress in detection methods of lesions and HPV genome, an increase in new cases and deaths has been observed annually. High-risk HPV is commonly integrated into premalignant lesions and cervical carcinoma, and from the transcription of E6/E7 bicistron, are generated the E6/E7 pre-mRNA and 3 splicing isoforms, E6\*I, E6\*II, and E6^E7. The expression in concentration increase of some splicing factors has been related to cellular alterations, such as cell cycle control, proliferation and apoptosis evasion, being classified as proto-oncogenes. In this work, we evaluated the effect of the SRSF1 overexpression on the levels of E6/E7 transcripts, splicing factors and the regulation of apoptosis in cells derived from Cervical Cancer. For this purpose, the Sleeping Beauty transposon-based inducible system was used, which allowed for stably transfected cell lines and the use of doxycycline to increase the expression of the gene of interest. HaCaT and SiHa cell lines were transfected with lipofectamine. It was carried out the validation of the FLAG-SRSF1 overexpression model and the effect on other splicing factors and apoptosis regulatory proteins. The results showed an increase in E6/E7 transcripts, notably E6/E7<sup>pre-mRNA</sup> and E6\*I in the SiHa transfected cell line. It was shown increased expression of CIAP1 and CIAP2 mRNA in transfected HaCaT line. It was also found light increases in protein levels of hnRNP I in both transfected cell lines, p65 in the HaCaT transfectant and increase hnRNPA2/B1 in the SiHa transfectant. Our data suggest that SRSF1 overexpression alters the transcript levels of HPV16 isoforms, as well as the mRNA and protein levels of splicing factors and apoptosis-regulating proteins in HaCaT and SiHa transfected cell lines.

## **I. ANTECEDENTES**

### **1. CÁNCER CERVICOUTERINO**

El Cáncer Cervicouterino a nivel mundial es el cuarto tipo de cáncer más común en mujeres. Se estiman más de 500,000 casos nuevos y de 250,000 muertes anuales (de Sanjosé, S., 2007; Jung, H. S., *et al.*, 2015; Zhang, S., *et al.*, 2020). Al Virus de Papiloma Humano (VPH) se le asocia como el principal factor de riesgo en el desarrollo de Cáncer Cervicouterino. En países subdesarrollados, hay una alta incidencia de cáncer de tipo anogenital con detección de VPH. La infección por este virus también está relacionada con el riesgo para el desarrollo de otros tumores malignos orofaríngeos y anogenitales (IARC, 2007; Lowy, D. R., 2016).

El VPH se ha clasificado con base en su potencial oncogénico, en dos tipos de virus: los de bajo y los de alto riesgo. Los tipos virales de alto riesgo (VPH-AR) como: VPH16, VPH18, VPH31, VPH33 y VPH35, son detectados en el 99% de los tumores (zur Hausen, H., 2002). Cuando un paciente exhibe una infección persistente con un VPH oncogénico, existe mayor riesgo de desarrollo de lesiones precancerosas y posteriormente, cáncer invasivo. El intervalo entre la adquisición de infección y cáncer es usualmente entre 15 a 25 años o más (Fernandes, J. V. & Araújo, T. A., 2012; Schiffman, M., 2013).

En el cáncer cervical, el VPH16 y VPH18 son los tipos virales más prevalentes, detectados en más del 70% del cáncer cervical (de Sanjosé, S., 2007; Saraiya, M., 2015).

### **2. ESTRUCTURA GENÓMICA Y CICLO REPLICATIVO DEL VHP16**

Los VPH son virus de DNA, icosaédricos y no envueltos; las partículas del virión miden 60 nm de diámetro y poseen una molécula de DNA circular de 8,000 pb y doble cadena, contenida en las proteínas virales de cubierta (cápside) L1 y L2 (Baker C. C., 1987; Doorbar, J., 2005). Todos los ORFs en los *Papillomavirus* se localizan en una sola cadena del DNA. La cadena codificante contiene 8 ORFs traducibles clasificados con base en su localización como tempranos (E) o tardíos (L). La región temprana codifica

proteínas regulatorias virales importantes para la iniciación de la replicación del DNA; genes exclusivamente tempranos como E6 y E7 y genes tempranos E1, E2, E4 y E5. La región tardía codifica las proteínas de la cápside viral y se expresan únicamente en células donde la infección es productiva. Contienen también una región regulatoria de aproximadamente 1 kb, llamada región larga de control (LCR), la cual contiene el origen de replicación del DNA viral y los elementos importantes para la regulación transcripcional (Francis, D. A., Schmid, S. I., & Howley, P. M., 2000; Bernad H. U., 2002; Doorbar, J., 2005).

El ciclo replicativo de VPH está estrictamente asociado al estadio de diferenciación del queratinocito. Comienza en el estrato basal del epitelio mucoso, hasta donde llega el virus a través de micro-lesiones, seguido del anclaje del virión a la membrana basal, mediante el proteoglicano heparán sulfato (Chow L. T., 2010). Una vez que la célula basal se infecta, las proteínas E1 y E2 favorecen la replicación viral en niveles bajos para evadir la respuesta inmune. Las oncoproteínas E6 y E7 favorecen el crecimiento celular y un aumento en expresión de los genes tempranos. Conforme la célula infectada se divide, una célula hija se mueve al estrato superior (suprabasal) y empieza su diferenciación. Consecuentemente, cuando se alcanzan niveles altos de E2, la expresión de E6 y E7 disminuye y da paso a un estadio dependiente de diferenciación, durante el ciclo replicativo. Adicionalmente, las proteínas L1 y L2 son producidas al final de la infección para ensamblar las partículas virales en el estrato más alto o diferenciado del epitelio. Finalmente, los niveles de E4 se incrementan y permite la liberación de la progenie viral. Las células mueren por descamación y la progenie viral se libera y pueden infectar a otras células del estrato basal (Doorbar J., 2005; IARC, 2007; Tommasino, M., 2014).

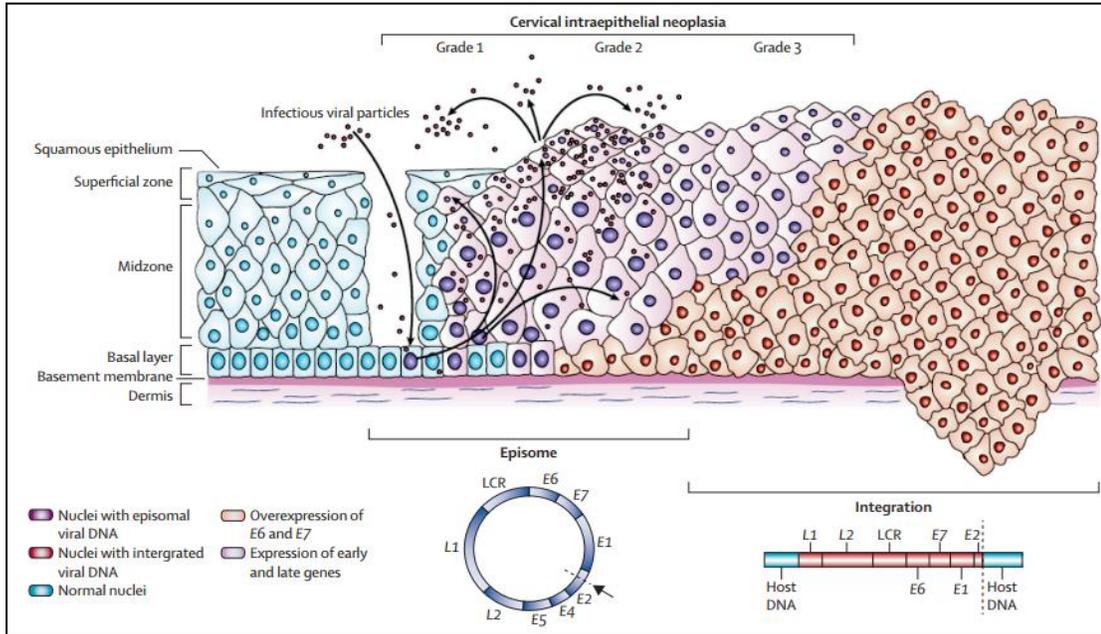


Figura 1. Ciclo replicativo durante la infección productiva por VPH y organización de su genoma (tomado de Crosbie E. J., 2013).

### 3. ONCOPROTEÍNAS E6 Y E7

La actividad de transformación de VPH-AR está dada principalmente por las oncoproteínas virales E6 y E7. Estas proteínas pequeñas actúan en colaboración durante el desarrollo de cáncer inducido por VPH. En células cancerosas, el genoma de VPH16 se encuentra integrado en el genoma y consecuentemente se rompe el marco de lectura del ORF de E2, el regulador negativo del promotor. Esto favorece a una mayor expresión de los oncogenes virales, lo que aparentemente contribuye a generar un fenotipo más agresivo de cáncer cervical (Francis D. A., *et al.*, 2000; Tommasino M., 2014).

La oncoproteína E6 es una proteína básica rica en cisteínas con aproximadamente 150 aminoácidos y un tamaño de 18 kDa, presenta dos regiones de unión a zinc (E6N y E6C); ambos dominios contienen motivos de cisteínas (CXXC) conservados entre las proteínas E6 en todos los VPHs (Tommasino M., 2014); E6 se caracteriza por inhibir el arresto de crecimiento y la apoptosis dependiente de P53, en respuesta a proliferación aberrante. Así mismo interactúa con la ubiquitin ligasa E6-AP formando un complejo trimérico

con P53, lo que conlleva a la degradación de P53 vía proteosomal. Por otra parte, interacciona con P300, CBP y ADA y previene la acetilación de P53, inhibiendo la transcripción de genes de respuesta a P53. La proteína E6 promueve la evasión de la apoptosis en respuesta a citocinas de supresión de crecimiento; a través de su interacción con TNFR1, FADD y caspasa 8 (CASP8), favorece la degradación de las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK. Mediante su interacción con SP1, C-MYC y NFX123, activa la telomerasa (subunidad TERT), la cual previene el acortamiento de los telómeros y favorece la proliferación e inmortalización celular. Además, promueve la degradación de proteínas con motivos PDZ, generando una pérdida de polaridad celular. La interacción con PAK, paxilina, fibulina previene anoikis y permite el crecimiento celular independiente de anclaje a matriz extracelular. Adicionalmente, altera la respuesta a IFN por medio de inhibición de actividad de P53 e IRF3 (Huibregtse, J. M., *et al.*, 1991; Howie, H. L., *et al.*, 2009; Moody C.A., *et al.*, 2010).

La oncoproteína E7 es una fosfoproteína ácida de aproximadamente 100 aminoácidos que posee motivos de unión a zinc. Dicha proteína está constituida por 3 dominios: regiones conservada 1-3 (CR1-3). Las CR2 de varias proteínas E7 incluyen un sitio de fosforilación por la cinasa de caseína II y un motivo de unión LXCXE que permite su interacción con el supresor de tumor PRB y proteínas relacionadas (P170 y P130); esto inhibe su función y favorece la liberación del factor de transcripción E2F, activando constitutivamente sus genes blanco, consecuentemente elimina el arresto del ciclo celular en la fase G1-S. Altera el ciclo celular al inhibir las proteínas P21 y P27 y estimular las ciclinas y por la activación directa de CDK2, que estimula la síntesis anormal del centrosoma y su interacción con proteínas de la vía ATM-ATR y  $\gamma$ -tubulina; como consecuencia, este efecto genera un mayor riesgo de inestabilidad genómica. E7 altera la expresión génica celular mediante su interacción HDACs y E2F6. La interacción con P600 evade la anoikis y la inhibición de componentes de la respuesta de IFN, como IRF1 y P48, favorecen a una infección persistente (McLaughlin-Drubin, M. E., *et al.*,

2009; Moody C.A., *et al.*, 2010; Roman, A., & Munger, K., 2013). En suma, ambas oncoproteínas promueven un incremento en la proliferación celular, desregulan el ciclo celular y producen resistencia a la apoptosis.

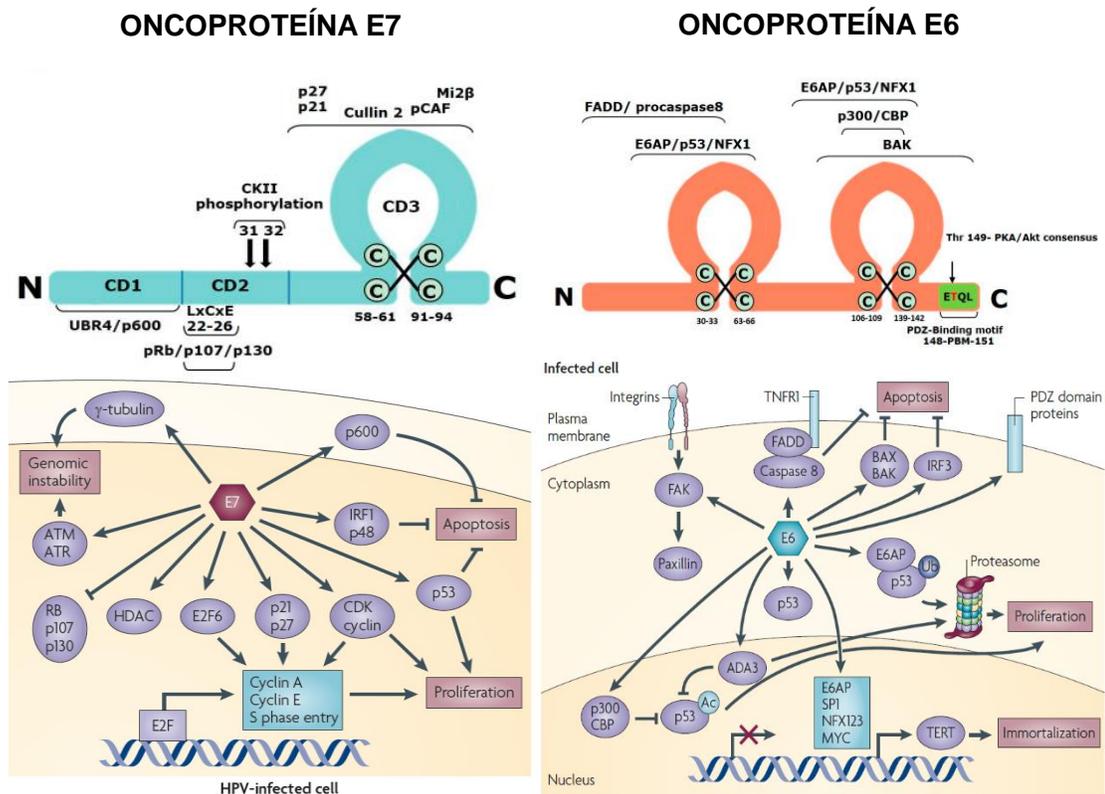


Figura 2. Principales dominios de las oncoproteínas E6 y E7, e interacciones con otras proteínas en el queratinocito infectado (tomado y modificado de Moody C.A., *et al.*, 2010; Roman, A., & Munger, K., 2013).

#### 4. APOPTOSIS Y VÍAS APOPTÓTICAS

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada altamente regulado. Es importante para la supervivencia de organismos multicelulares, al eliminar células infectadas o dañadas que interfieran con su función normal. Morfológicamente las células en apoptosis se caracterizan por fragmentación nuclear y fragmentación del DNA, daño mitocondrial, membrana protuberante y formación de cuerpos apoptóticos (Vicencio, J. M., 2008; Portt, L., 2011). Las proteínas que tienen un papel preponderante durante la apoptosis son las procaspasas (cisteinil-aspartato proteasas). Todas las procaspasas poseen

pro-dominios largos o cortos y dominios de reclutamiento (CARD) o dominios efectores de muerte (DED). Los dominios catalíticos se encuentran separados en una subunidad grande y una pequeña; durante la activación, ambos dominios son separados por proteólisis; las caspasas activas están constituidas por 2 fragmentos largos y 2 cortos, formando un hetero-tetrámero. Se clasifican en dos grupos: las procaspasas iniciadoras y las procaspasas efectoras. Las primeras poseen un pro-dominio largo, incluyen las procaspasas 2, 8, 9 y 10, y son auto-catalíticamente activadas por señales pro-apoptóticas. Las segundas poseen pro-dominios cortos, incluyen las procaspasas 3, 6 y 7, y son activadas por acción de las caspasas iniciadoras (Pop, C., & Salvesen, G. S., 2009; Parrish, A. B., et al., 2013; Creagh, E. M., 2014). Se han descrito dos vías principales para su activación: la intrínseca o mitocondrial y la extrínseca o de muerte mediada por receptor.

La vía intrínseca es regulada principalmente por la mitocondria y ocurre cuando su DNA está dañado, se pierde su potencial de membrana o se sobreexpresión algunos oncogenes. Otros estímulos que regulan positivamente la activación de la vía intrínseca incluyen a la radiación, toxinas, hipoxia, infecciones virales y radicales libres. Estas agresiones a la célula resultan en un incremento en la expresión de proteínas proapoptóticos con dominio BH3, que activan a las proteínas de la familia BCL-2, BAX y BAK (Elmore, S., 2007; Taylor, R. C., et al., 2008; Pfeffer, C. M., & Singh, A. T., 2018). Las proteínas BAX y BAK oligomerizan y promueven la permeabilización de membrana mitocondrial externa (MOMP), lo que permite la liberación de proteínas de la región intermembranal, como citocromo c, SMAC/Diablo y HTRA2/OMI. El apoptosoma se forma después de la liberación del citocromo c, en conjunto con la proteína APAF-1, dATP y la pro-caspasa 9 (Saelens et al., 2004; Chinnaiyan, 1999; Hill et al., 2004). Esta plataforma convierte la pro-caspasa 9, en caspasa 9, que a su vez activa las procaspasas efectoras 3 y 7. Otro grupo de proteínas pro-apoptóticas como el factor inductor de apoptosis (AIF), endonucleasa G y la proteína carbamoilfosfato sintasa 2, aspartato transcarbamoilasa y dihidro-ototasa (CAD) son liberadas

desde la mitocondria durante la apoptosis en un evento tardío cuando la célula está comprometida a morir. La proteína AIF se transloca al núcleo para causar fragmentación del DNA y condensación de cromatina; la endonucleasa G también se transloca al núcleo y escinde la cromatina nuclear que produce fragmentos de DNA oligonucleosomal. Por último, CAD transloca al núcleo lo que lleva a una condensación de la cromatina más pronunciada y avanzada y a la fragmentación del DNA en forma oligonucleosomal (Susin et al., 2000; Li et al., 2001).

La vía extrínseca es mediada por un subgrupo (7/28) de la superfamilia de receptores transmembranales del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) que incluyen: TNFR, FAS y TRAIL. La familia de receptores comparte dominios extracelulares ricos en cisteína y un dominio citoplasmático de 80 aminoácidos denominado dominio de muerte (Ashkenazi and Dixit, 1998; Locksley et al., 2001). Después de la unión de su ligando, proteínas adaptadoras citoplasmáticas son reclutadas al extremo intra-citoplasmático del receptor, mediante sus dominios de muerte. Por ejemplo, la unión de FASL a FASR resulta en unión de la proteína adaptadora FADD, pero la unión de TNF $\alpha$  al TNFR conlleva a la unión de la proteína adaptadora TRADD y al reclutamiento de FADD y RIP. LA proteína FADD se asocia con la pro-caspasa 8 mediante la dimerización del dominio efector de muerte (Hsu et al., 1996; Wajant, 2002). Este evento involucra la formación y activación de varios complejos que sirven como plataforma a proteínas reguladoras de la apoptosis, un ejemplo es el complejo de señalización inducida por muerte (DISC), que procesa autocatalíticamente a la pro-caspasa 8, la que a su vez activa la caspasa 3. Esta última es responsable de los cortes de la polimerasa poli (ADP-ribosa), laminina y gelsolina y fodrina, que inhiben la reparación del DNA, la rotura de la membrana nuclear, y promueve la reducción del citoplasma y la formación de cuerpos apoptóticos, respectivamente (Kischkel et al., 1995; Elmore, S., 2007; Taylor, R. C., et al., 2008; Pfeffer, C. M., & Singh, A. T., 2018). La activación de la vía mitocondrial también puede ocurrir seguido de la activación de la vía extrínseca. Esto ha sido demostrado, la escisión del amino terminal

del miembro pro-apoptótico BID por la caspasa 8, generara una forma activada de BID, llamada BID troncada o tBID. tBID promueve la oligomerización de BAX y BAK, y la vía intrínseca se activa (Portt, L., 2011).

## **5. REGULACIÓN Y RESISTENCIA A LA APOPTOSIS**

Existen tres familias de proteínas antiapoptóticas que participan en la regulación de la apoptosis, incluyendo proteínas inhibidoras como FLICE (FLIP), proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 y proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). De gran importancia en la regulación de la apoptosis, son la familia de proteínas que contienen el dominio BH (dominio de homología a Bcl-2). Esta familia contiene reguladores positivos y negativos de apoptosis, por ejemplo, la proteína BCL-2 antagoniza el efecto de BAX y previene la liberación de citocromo c. La proteína supresora de tumor, P53, juega un papel crítico en la regulación de proteínas de la familia BCL-2. En contraste con la vía intrínseca, la iniciación de la cascada de señalización apoptótica por la estimulación de receptores de muerte recuerda a la cascada de señalización tradicional de tipo citocina. Sin embargo, la vía extrínseca es regulada negativamente para prevenir una muerte celular inapropiada.

La familia de las proteínas FLIP representa sus inhibidores mejor conocidos. Esta familia contiene el mismo dominio DED que la procaspasa 8 y pueden prevenir su activación, interfiriendo con su reclutamiento en el receptor activado (Elmore, S., 2007; Taylor, R. C., *et al.*, 2008; Pfeffer, C. M., & Singh, A. T., 2018; Portt, L., 2011).

La tercera clase de proteínas inhibidoras más estudiadas durante mecanismos de supervivencia celular es la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). Las IAPs se definen por la presencia del dominio de repetidos IAP de baculovirus (BIR). El dominio BIR de unión a zinc de aproximadamente 70 aminoácidos, media interacciones proteína-proteína y es esencial para el funcionamiento de las IAPs en apoptosis (Birnbaum, *et al.*, 1994). En el humano se encuentran 8 IAPs, siendo CIAP1, CIAP2 y XIAP relacionadas principalmente en apoptosis. Contienen 3 dominios BIR en su

dominio N terminal, un dominio asociado a Ubiquitina (UBA) y un dominio RING que provee actividad E3 ligasa. Por último, CIAP1 y CIAP2 poseen un dominio de reclutamiento de caspasa conservado (CARD) que puede inhibir su actividad E3 ligasa (Dueber, *et al.*, 2011; Lopez, *et al.* 2011). Estos dominios no se unen a caspasas o antagonistas de IAPs, pero usan formas de interacción con un conjunto diferente de proteínas. Por ejemplo, el dominio BIR I de cIAPs promueve la unión del receptor del factor de necrosis tumoral asociado al factor 1 (TRAF1) y TRAF2, mientras que el dominio BIR I de XIAP media la interacción con el factor de crecimiento transformante (TGF $\beta$ ) con la proteína de unión cinasa (TAK1) (Uren, A. G., *et al.*, 1996; Lu, M., *et al.*, 2007).

Se ha descrito el papel de CIAP1, CIAP2 y XIAP en el control de una plataforma inductora de muerte denominada RIPtosoma (también llamada Complejo-II o necrosoma). El RIPtosoma se ensambla en respuesta a estímulos extrínsecos de muerte y contiene los componentes RIPK1, FADD y caspasa 8, y puede estimular la apoptosis dependiente de caspasa 8. Este complejo puede incluir proteínas adicionales como caspasa 10, CFLIPL, RIPK3 y TRIF, dependiendo del tipo celular y estímulo. CIAP1, CIAP2, XIAP y CFLIP regulan negativamente la formación de este complejo, siendo las cIAPs (1 y 2) las más críticas (Geserick, *et al.* 2009; Feoktistova *et al.* 2011). La escisión de CFLIPL mediada por caspasa 8 lleva a la formación de CFLIP (p43), el cual permite su unión con TRAF2 y formación de un complejo CFLIP (p43)-caspase-8-TRAF2. TRAF2 recluta a las cIAPs para mandar a ubiquitinación a CFLIP escindida y caspasa 8 (Micheau, *et al.*, 2002; Kataoka y Tschopp, 2004).

Además, el papel de las cIAPs en cáncer se ha explorado recientemente. Se ha postulado que CIAP1 coopera con MYC para mandar a degradación a su contraparte, MAD1. CIAP1 modula la respuesta celular a TNF $\alpha$  que es producida por el microambiente tumoral. Es de interés mencionar que C-MYC induce la expresión de numerosas citocinas, las cuales son atrayentes para células inflamatorias y favorecer el desarrollo de tumor por liberación de

factores de crecimiento y otras citocinas (Murdoch, C., *et al.*, 2008; Li, H., Fang, *et al.*, 2018). Dado que CIAP1 y CIAP2 participan como mediadores clave para la activación de NF- $\kappa$ B inducida por TNF $\alpha$  y protegen a las células de los efectos letales de TNF $\alpha$ , es probable que los incrementos en los niveles de las IAPs puedan ayudar a la supervivencia de la célula cancerosa modulando la respuesta a TNF $\alpha$ . Se ha observado que la sobreexpresión de XIAP eficientemente inhibe la activación de caspasas y la apoptosis estimulada por las vías intrínsecas y extrínsecas. Por el otro lado, las células que carecen XIAP son sensibilizados a muerte celular (Sasaki, H., *et al.*, 2000).

La habilidad de evadir apoptosis puede ser inducida por un diferente rango de alteraciones incluyendo cambios fisiológicos como la activación/inducción de vías de señales mitogénicas (ERK1/2, AKT), la inactivación/desregulación de ciertas moléculas apoptóticas (receptor FAS, BAX), la sobreexpresión de un número de genes antiapoptóticos como BCL-2 y CFLIP. Los defectos en la apoptosis son considerados un complemento importante de la activación de proto-oncogenes, ya que la pérdida de control de muchas proteínas que dirigen la división celular, también desencadena la apoptosis (ejemplos C-MYC, E1a y ciclina D1) (Adams, J.M. & Cory, S., 1998; Yip, K.W. & Reed, J.C., 2008).

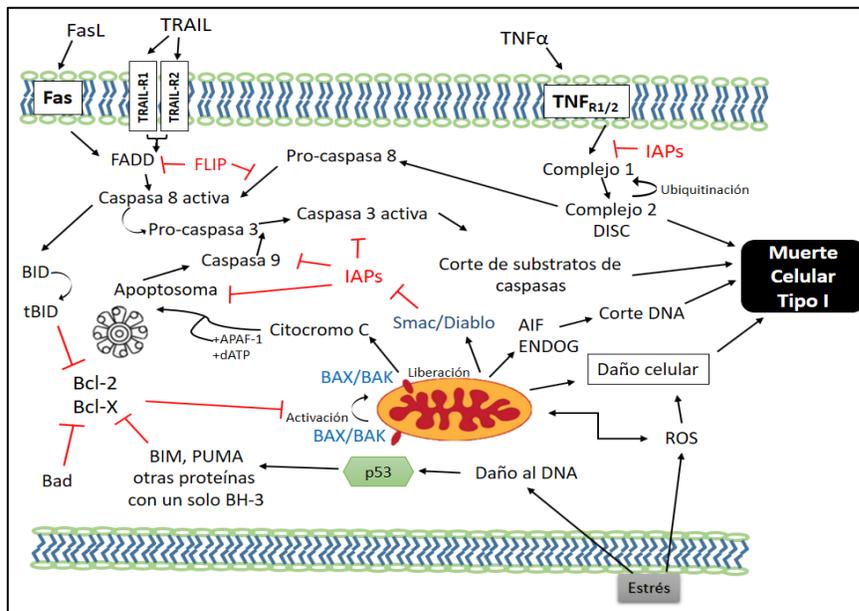


Figura 3. Versión simplificada de las vías intrínseca y extrínseca de apoptosis (tomado y modificado de Portt, L., *et al.*, 2011).

## 6. *SPLICING* ALTERNATIVO DE VPH16

El *splicing* es un mecanismo conservado y complejo que involucra la eliminación de intrones del pre-mRNA; para llevarse a cabo, es necesaria la selección de los exones mediante la definición del exón y el intrón. Como su nombre lo indica, el mecanismo de *splicing* alternativo consiste en el uso diferencial de los sitios de *splicing*, produciendo diferentes formas del transcrito maduro. Aproximadamente, 92-94% de los genes humanos sufren *splicing* alternativo, lo que permite una amplificación del transcriptoma y la diversificación del proteoma celular, la expresión específica durante el desarrollo celular y tisular (Black, D. L., 2003; Matlin, A. J., *et al.*, 2005).

El *splicing* alternativo es importante para la expresión de los transcritos de VPH16. En estadios tempranos del ciclo replicativo de VPH, la transcripción del promotor p97 genera transcritos policistrónicos que codifican para los genes tempranos, los cuales son RNAs poliadenilados por una señal temprana de poliadenilación (pAE). Estos transcritos policistrónicos son sujetos a *splicing* alternativo. Los mRNAs expresados desde el promotor p97 tienen el potencial de expresar las proteínas E6, E7, E1, E2, E4 y E5. El sitio donador de *splicing* (SDS) SDS226 y los sitios aceptores (SAS) de *splicing* SAS409, SAS5226 y SAS742 están enlazados exclusivamente al promotor p97, localizado en la LCR, y son procesados en los transcritos tempranos (Johansson, C., & Schwartz, S., 2013; Kajitani, N., & Schwartz, S., 2015). En los tumores positivos para VPH-16, se han observado 4 transcritos principales, generados en por el uso de 3 sitios de *splicing* 3' de la región de genes tempranos. Dichos sitios de *splicing* se localizan en el intrón 1, entre el ORF de E6 y E7 (del Moral O., *et al.*, 2010; Ordóñez, R. M., *et al.*, 2004).

La diferenciación terminal de la célula hospedera resulta en cambio expresión a la región tardía del genoma (codificando L1 y L2) seguido por la poliadenilación en la señal de poliadenilación tardía (pAL) para generar mRNAs de L2. Cada señal de poliadenilación está precedida por un UTR que, cuando se transcribe, confiere elementos al RNA los cuales determinan la

eficiencia de poliadenilación, traducción y la vida media del mRNA (Graham, S. V., 2008; Johansson C., & Schwartz S., 2013; Schwartz, S., 2013). Los sitios donadores de *splicing* SDS880, SDS3632 y el sitio aceptor de *splicing* SAS5639 son usados para el *splicing* de mRNAs tardíos. Cuando la célula infectada se diferencia y el virus se encuentra episomal, el promotor tardío p670 se activa e induce la alta expresión de pre-mRNAs para E1, E2 y E4 usando primariamente los sitios de *splicing* SDS880, SAS2709 y SAS3358.

Las proteínas E1 y E2 se unen al origen de replicación, el cual está localizado en la LCR, para replicar el genoma de DNA viral, y se impide la expresión de p97 (E2 es el represor). En nuestro caso, nos interesa el *splicing* de los oncogenes E6/E7.

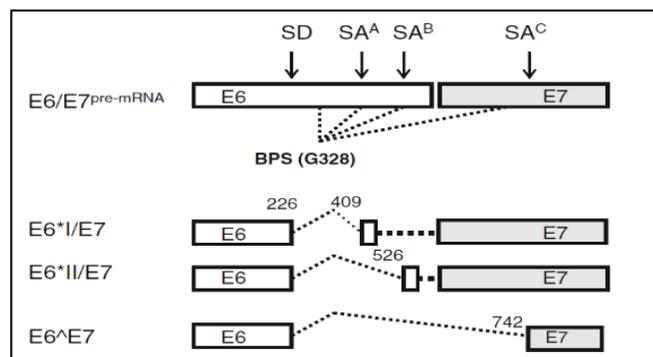


Figura 4. Representación esquemática de los principales transcritos producidos por AS en VPH 16 (tomado de del Moral O., et al., 2010).

Los *Papillomavirus* utilizan el *splicing* alternativo para varios propósitos. Muchos de los sitios de *splicing* son controlados por elementos regulatorios de RNA que determinan la eficiencia de sitio de *splicing*. Basados en el modelo de escaneo para la traducción de mRNA, establece que la presencia río arriba de codones AUG tiene un impacto negativo en el inicio de la traducción de codones AUG río abajo, el *splicing* alternativo genera mRNAs con pocos codones AUG río arriba posibles para cada gen de VPH (Graham S. V. 2008; Johansson C., & Schwartz S., 2013).

## 7. PROTEÍNAS REGULADORAS DEL *SPLICING* ALTERNATIVO

Las proteínas SR (*Serine and arginine-rich*) son una familia conservada de 12 factores de *splicing* esenciales en la biogénesis de los RNAs (Misteli, T., *et al.*, 1998; Howard, J. M., & Sanford, J. R., 2015). Las diferentes proteínas SR pueden restaurar la actividad de *splicing* en el extracto citoplasmático celular inactivo de *splicing* S100 de HeLa. Sin embargo, todas muestran un grado de especificidad de substrato, especialmente con respecto a la regulación del *splicing* alternativo, a través de la unión secuencia específica, a elementos de *enhancer* de *splicing* exónico (ESE) (Liu, H. X. *et al.*, 1998; Blencowe, B. J., 2000). Estas proteínas actúan en la selección de sitios de *splicing* para su reconocimiento por el *spliceosome* (un gran complejo de ribonucleoproteínas encargado de la selección de exones y la eliminación de intrones en los pre-mRNAs).

Las proteínas SR se unen principalmente a secuencias degeneradas de 4-8 nucleótidos ricos en purinas (por ejemplo, GAAGAA). Esta unión promueve la definición de exón en el *splicing* constitutivo y la selección positiva (inclusión) del exón alternativo durante el *splicing* alternativo (Howard, J. M., & Sanford, J. R., 2015). Estructuralmente las SR poseen un dominio amino modular que consiste en uno o dos motivos de unión a RNA (RRM) y un dominio carboxilo rico en repetidos de serina y arginina (SR). Las diferencias entre sus miembros están basadas en la presencia o ausencia del dominio de unión a RNA homólogo (RRMH) y el tamaño del dominio SR (este varía desde los 50 a 350 aminoácidos) (Zahler, A. M., *et al.*, 1992). Las proteínas SR, como SRSF1, SRSF3, SRSF4, SRSF6, SRSF7 y SRSF10, tienen localización nuclear y citoplasmática (hacen *shuttling*). Las modificaciones post-traduccionales dictan la localización y función de las proteínas SR. La fosforilación de las proteínas SR está regulada por familia de cinasas específicas de SR (SRPK) y otros miembros de la familia de cinasas CMGK (Clk/Sty). El dominio SR es fosforilado constantemente para incrementar la especificidad de unión al RNA y la interacción con proteínas del *spliceosome* (Björk, P., *et al.*, 2009). Se localizan en subregiones nucleares denominados *speckles*. Clk/Sty promueve



## 8. LA PROTEÍNA SRSF1

La proteína prototipo de las SR es SRSF1 (anteriormente llamada ASF/SF2) y es uno de los factores de *splicing* más estudiados y conservados en función. Es el miembro fundador de la familia; originalmente fue identificado y aislado en base a sus actividades: promover el ensamble del *spliceosoma*, restaurar el *splicing* constitutivo del pre-mRNA en el extracto celular S100 de HeLa y regular el *splicing* alternativo del pre-mRNA temprano de SV40 (Björk, P., 2009; Das, S., & Krainer, A. R., 2014; Howard, J. M., & Sanford, J. R., 2015). La proteína SRSF1 inicialmente fue descrita como un factor de *splicing* importante para la definición del exón e intrón en el *splicing* constitutivo y la regulación del *splicing* alternativo. Sin embargo, SRSF1 participa en varios eventos durante la biogénesis de los RNA: favorece el *splicing*, estabilidad, transporte, regulación de traducción, degradación de mRNAs y producción de miRNAs (Aenkoe, M. L., et al., 2014).

La proteína SRSF1 regula el *splicing* de sus propios transcritos promoviendo la expresión de formas de *splicing* que poseen un codón de paro prematuro (PTC) y son dirigidos a degradación; además regula su expresión a nivel traduccional, cambia la asociación de su mRNA de los polisomas a los monosomas, disminuyendo la eficiencia de traducción (Das, S., & Krainer, A. R., 2014; Howard, J. M., & Sanford, J. R., 2015). Estructuralmente, posee 2 RRM (un motivo RRM y un RRMH) separados por una región *linker* rica en glicinas en el dominio amino terminal y contiene un dominio SR dividido en RS1 y RS2 con cerca de 20 serinas unidas a prolinas o argininas en su dominio carboxilo terminal. Ambos dominios son esenciales en la unión específica a los transcritos y su interacción con otras proteínas (Aubol, B. E., et al., 2013).

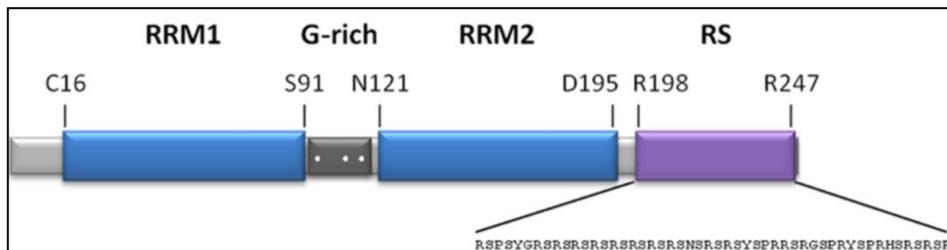


Figura 6. Esquema estructural de la proteína SRSF1 (tomado y modificado de Blanco F.J. & Bernabéu C, 2012).

El *knock out* del gen de *SFRS1* es letal, durante el desarrollo del gusano y ratón. Adicionalmente, cuando el gen *SFRS1* es eliminado en células de pollo DT40 o en los cardiomiocitos de ratón, desencadena inestabilidad genómica, arresto del ciclo celular y apoptosis. Esto refleja su importancia en una etapa de desarrollo o especificidad en un tipo celular (Xu et al., 2005; Li et al., 2005).

## **9. SRSF1 UN PROTO-ONCOGÉN**

El gen *SFRS1* está localizado en el cromosoma 17q23, un locus comúnmente amplificado en tumores y muestra un incremento en niveles elevados de mRNA de *SRSF1* (Sinclair, C. S., 2003). Los niveles de mRNAs y proteína de SRSF1 se detectan elevados en diversos tipos de tumores, como mama, pulmón, colon, próstata, ovario, entre otros. Su sobreexpresión en fibroblastos de ratón inmortalizados y células epiteliales mamarias humanas, resulta en transformación oncogénica; este efecto promueve una alta capacidad de proliferación, resistencia a la apoptosis y formación de tumores malignos en trasplante ortotrópico en ratones. Estos datos demuestran su posible papel como un proto-oncogén (Anczuków O., et al., 2012; Das S., et al., 2012). La regulación de SRSF1 se ha estudiado ampliamente. El gen *SFRS1* es un blanco transcripcional de C-MYC (considerado también un oncogén), un potente factor de transcripción altamente expresado en tumores, se une a dos cajas E canónicas funcionales localizadas en el promotor de *SFRS1* y promueve una mayor transcripción del gen. Por otra parte, la proteína Sam68 (fosforilada vía ERK/MAP cinasa) promueve la expresión del transcrito completo de *SRSF1* y un incremento en sus niveles de proteína.

La localización de SRSF1 es modulada por la respuesta a estrés y su hiperfosforilación es observada durante la respuesta a daño al DNA, provoca una distribución subnuclear alterada y, por lo tanto, cambios en los patrones de *splicing* de un gran número de transcritos (Valacca C., et al., 2010; Das S., et al., 2012; da Silva, et al., 2015). La alta expresión de SRSF1 en células HEK 293T mostró un incremento en la tasa traduccional de algunas proteínas de unión a RNA, componentes clave de la maquinaria del ciclo celular (proteínas

uso mitótico, cinetocoro, fase M) y proteínas de regulación de transcripción. La proteína SRSF1 altera el *splicing* alternativo del receptor tirosina cinasa RON, omitiendo el exón 11 y generando isoformas que inducen transición epitelio-mesénquima (EMT) y motilidad celular. Además, SRSF1 promueve el incremento de variantes de la cinasa S6 1 (S6K1), que pueden unirse al complejo mTOR para ser activadas y consecuentemente fosforilar al factor eIF4EBP1, lo que aumenta la traducción dependiente de cap. La proteína SRSF1 regula la expresión de su propio transcrito, así como los de *PABPC1*, *NETO2* y *ENSA*, y potencia la traducción de  $\beta$ -catenina, promoviendo la señalización Wnt. Interesantemente, cuando SRSF1 se encuentra altamente expresado, se ha observado alteraciones en los niveles de proteínas de unión a RNA como hnRNP A1 en células HEK293T (Sanford J. R., et al., 2008), hnRNP A2/B1 en cáncer de mama (Gautrey H. L. & Tyson-Capper A. J., 2012), SRSF3 en cáncer de ovario epitelial (Iborra S., et al., 2013), entre otros en cáncer de mama (Das S. y Krainer, A. R., 2014; Karni R, et al., 2007) y cáncer de colon (Ghigna C., et al., 2005). Aunque el papel de SRSF1 durante el *splicing* constitutivo y alternativo ha sido descrito ampliamente en tumores de mama, colon y pulmón, son pocos los estudios que evalúan la estabilidad y eficiencia de traducción de transcritos durante el desarrollo de la malignidad en otros tipos de cáncer.

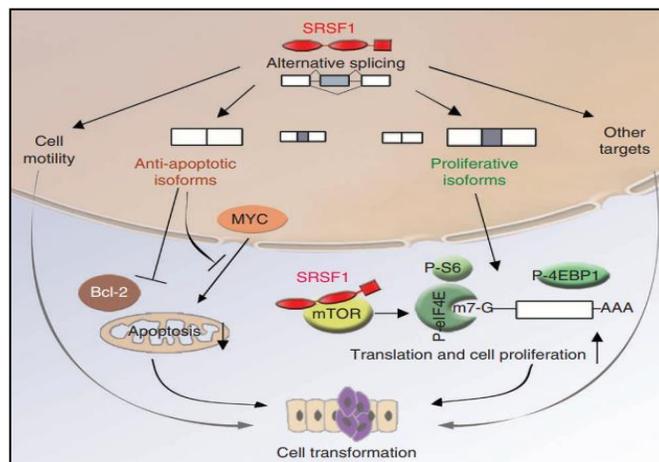


Figura 7. Modelo de las actividades que contribuyen a la transformación en cáncer de mama (tomado de Anczukow O., et al., 2012).

## 10. SRSF1 Y LA RESISTENCIA A LA APOPTOSIS

Las células tumorales evaden la apoptosis al cambiar la expresión de genes que controlan la muerte celular programada (Fernald, K., & Kurokawa, M.; 2013). Las alteraciones en los niveles de factores de *splicing* observados en cáncer pueden afectar la apoptosis en diversas maneras. Los niveles muy altos o muy bajos de estos factores pueden resultar en cambios en el balance entre variantes de *splicing* pro- y antiapoptóticas. Algunos factores de *splicing* pueden también facilitar la síntesis de variantes de *splicing* de proteínas específicas que promuevan o interfieran con las vías apoptóticas. Adicionalmente, algunos factores pueden actuar como reguladores traduccionales o post-traduccionales (como hnRNP A1, hnRNP C1/C2 y SRSF2) alterando la tasa traduccional, mediada por IRES, de proteínas antiapoptóticas como CIAP1/2 y XIAP condicionando la degradación proteosomal de proteínas apoptóticas (como P53 y algunas caspasas). Por último, algunas proteínas de unión a RNA pueden interactuar directamente con proteínas apoptóticas y modular su actividad (Kędzierska, H., & Piekiełko-Witkowska, A., 2017). SFSR1 podría regular la expresión de varios factores de *splicing* de las familias SR y hnRNP, incluyendo hnRNP I (PTB), hnRNP K y SRSF3, de acuerdo a ensayos con gen luciferasa (Mo, S., Ji, X., & Fu, X.-D., 2013) y ensayos *in silico* en células HEK293T (Sanford J. R., et al., 2008).

Previamente, las proteínas hnRNPs han sido estudiadas mayormente en relación a su papel en la regulación de apoptosis en algunos tumores. hnRNP I promueve la expresión de variantes antiapoptóticas de FADD (isoforma corta), APAF-1 (disminución de niveles de mRNA), BIM (expresión isoformas  $\gamma$ ) en tumores renales y mamarios (Juan, W. C., *et al.*, 2014). Por su parte, la proteína hnRNP K favorece los niveles de la isoforma larga de CFLIP, disminución de mRNA de APAF-1, y promueve el incremento de la traducción de XIAP en tumores hepatocelulares (Xiao, Z., 2013). Recientemente, las proteínas SR se han involucrado en la regulación de apoptosis en células tumorales. La proteína SRSF3 favorece la producción del transcrito largo de caspasa 8, la isoforma corta de la caspasa 2 y cambios en el *splicing*

alternativo de BCL-2. Dichas alteraciones previenen el evento de apoptosis en tumores de colon, de ovario, de cérvix y de mama (Jang, H. N., 2014; He, X., *et al.*, 2011).

La proteína SRSF1, primer oncogén identificado entre las proteínas SR, altera el *splicing* alternativo de proteínas de la familia Bcl-2 (Bim $\gamma$ , Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1L), IAPs (la traducción de survivina) y otras proteínas relacionadas (caspasa 9b, BIN1, P53). Este efecto favorece una resistencia a la apoptosis, al generar isoformas que tienen funciones antiapoptóticas o carecen de actividad proapoptótico en cáncer de mama (Anczukow O., *et al.*, 2012), de pulmón y de colon (Moore M. J., *et al.*, 2010). Por último, la proteína CIAP1 regula la ubiquitinación de MAD que, junto con MAX, regulan negativamente a C-MYC, el regulador transcripcional del gen de *SFRS1* (Xu, L., *et al.*, 2007). Sin embargo, el papel de SRSF1 en la regulación de componentes de las vías apoptóticas durante la carcinogénesis cervical ha sido pobremente evaluado y es poco comprendido.

## II. ANTECEDENTES DIRECTOS

Actualmente, hay muy pocos estudios sobre el papel de la proteína SRSF1 en el desarrollo de cáncer cervicouterino. Se ha descrito que los niveles de expresión de las proteínas SR y hnRNPs disminuyen conforme la célula diferenciada asciende en el estrato de epitelio cervical; sin embargo, en lesiones pre-malignas infectadas con VPH-AR, se observa un incremento en los niveles de proteínas de unión a RNA (especialmente SRSF1) (Fay, J., *et al.*, 2009). Además, las proteínas SRSF1 y SRSF3 se unen a un ESE que favorece la producción de transcritos tardíos de VPH16, en el inicio del ORF de E4 (Somberg M., & Schwartz S., 2010). En un modelo de progresión de tumor cervical, las proteínas SRSF1, SRSF2 y SRSF3 se incrementan específicamente por la infección de VPH16. Se sugiere que sus niveles son controlados por la infección viral para la regulación de expresión de genes virales (Mole S., *et al.*, 2009). En la línea celular de CaSki, se observó que en el *knockdown* de SRSF2 disminuyó la proliferación celular, la formación de

colonia y se incrementó la apoptosis. Además se demostró que SRSF2 podría mantener la estabilidad de los mRNAs de E6/E7 (McFarlane M., et al., 2015).

En nuestro laboratorio, se ha evaluado la resistencia de apoptosis de líneas celulares derivadas de Cáncer Cervicouterino y dicha respuesta es diferencial. Los niveles de transcrito y de proteína de caspasas son diferenciales en las líneas C33-A (VPH negativo), SiHa (1-2 copias de VPH16 integradas), CaSki (derivado de carcinoma con alto número de copias integradas de VPH16 por célula) y HeLa (derivado de adenocarcinoma con alto número de copias integradas de VPH18 por célula). La expresión de las caspasas 3 y 6 es menor en las líneas CaSki y HeLa (altamente resistentes a apoptosis con tratamiento Cis-platino y UV, datos no publicados). El nivel de caspasa 8 es bajo en SiHa y no es detectada en C33-A (Aréchaga-Ocampo E., et al., 2008). Cambios en las proporciones de proteínas que se unen al RNA pueden alterar su estabilidad y traducibilidad. Cabe recordar que las proteínas IAPs, CIAP1/2 y XIAP son ubiquitin-ligasas que se unen a las caspasas; además, CIAP1 es un regulador de los niveles de expresión de C-MYC. Adicionalmente, en las líneas se observan niveles de expresión heterogéneos de algunos factores de *splicing*. De especial interés, la proteína SRSF1 presentó niveles mayores en CaSki y HeLa (del Moral O., et al., 2010). Se ha observado en CaSki y HeLa un incremento de niveles de proteína de miembros reguladores negativos de apoptosis como c-IAP1, c-IAP2 y CFLIP (datos no publicados). Estos resultados nos sugieren que el patrón diferencial de expresión en marcadores de la resistencia a apoptosis y el papel que juegan algunos factores de *splicing* está relacionado, pero aún se desconoce el papel de las oncoproteínas E6 y E7.

En variantes de VPH16, solamente un polimorfismo de nucleótido único (SNP) es suficiente para alterar el sitio de unión de al menos algún factor de *splicing*, cambiando la habilidad de estas proteínas para unirse al transcrito (López-Urrutia, E., et al., 2012). Por análisis de espectrometría de masas en extractos nucleares de HeLa, se observa que alrededor de 170 proteínas se

unen al intrón 1, de las cuales el 80% fueron proteínas de unión al RNA, incluyendo las proteínas hnRNPA1, hnRNPA2, SRSF3, PTB1, TIAR, entre otras (Martínez-Salazar, M., et al., 2014), todas son reguladas por SRSF1. Durante mi tesis de maestría, observé un incremento de los niveles de transcrito de E6/E7 de VPH16, y de los niveles de transcritos y de proteína de algunos factores de *splicing* (hnRNP A1, A2/B1, SRSF3 y TIAR) en células SiHa establemente transfectadas con SRSF1-RFP.

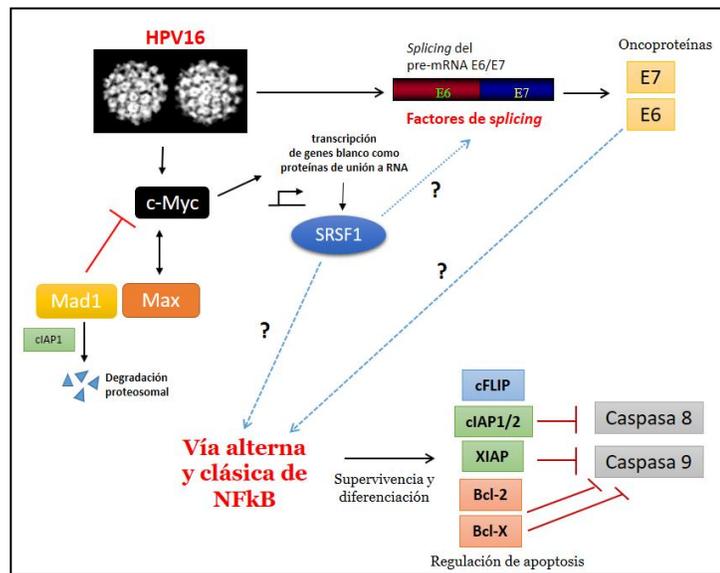


Figura 8. Esquema representativo del probable papel de la proteína SRSF1 en la regulación de apoptosis y regulación de oncoproteínas E6 y E7 de VPH16.

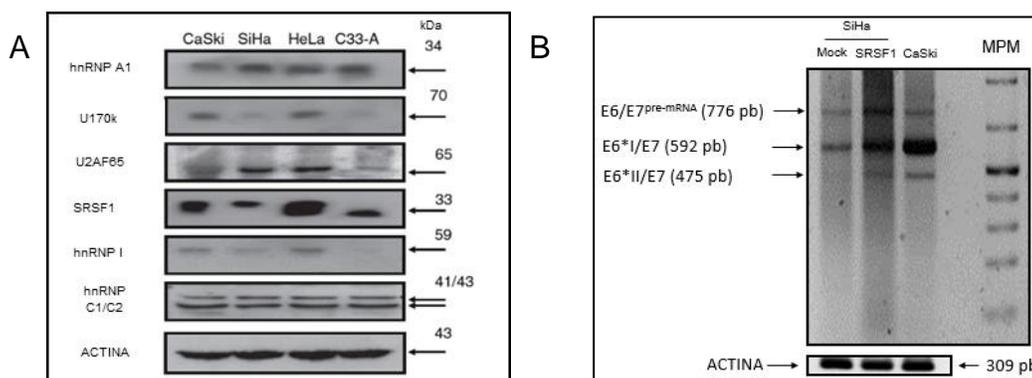


Figura 9. A) Perfil de expresión de factores de *splicing* en líneas celulares derivadas de Cáncer Cervicouterino (del Moral, O., et al., 2010). B) Tras la expresión ectópica de SRSF1-RFP, se observó en la línea celular SiHa un incremento en el nivel de los transcritos de E6/E7 (datos no publicados de la maestría).

## JUSTIFICACIÓN

El Cáncer Cervicouterino es el cuarto tipo de cáncer más común en mujeres a nivel mundial; los VPH-AR son el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervicouterino. El VPH16 es el tipo viral más prevalente, siendo detectado en el 50-60% de tumores cervicales. Los cambios en el *splicing* alternativo de los transcritos se han asociado como una característica nueva y típica en el cáncer. La alteración aberrante producida por el *splicing* alternativo en el proteoma puede favorecer la proliferación, desregulación del ciclo celular y evasión de apoptosis, acentuando la malignidad celular. En diversos tumores, se ha encontrado una sobreexpresión de proteínas de unión a RNA como los factores de *splicing* y se relaciona con mecanismos de desarrollo de tumor. La proteína SRSF1 fue el primer proto-oncogén de la familia de proteínas SR en ser descrita en cáncer de mama, de pulmón y de colon. Su sobreexpresión conlleva a un fenotipo agresivo en células epiteliales mamarias y fibroblastos de ratón. Recientemente, se ha descrito que las proteínas SR oncogénicas participan en la regulación de proteínas que componen de las vías apoptóticas.

En nuestro laboratorio, se hemos observado que líneas celulares derivadas de Cáncer Cervicouterino presentan un perfil diferencial de expresión de algunos factores de *splicing*, especialmente SRSF1 y de proteínas antiapoptóticas, pero ignoramos como se vinculan. Es importante conocer el papel de la proteína SRSF1 en la regulación de algunas proteínas que participan en la apoptosis y viceversa, en líneas derivadas de cáncer cervicouterino.

## HIPÓTESIS

El aumento de la expresión de SRSF1 altera los niveles de los transcritos de E6/E7, de factores de *splicing* y de proteínas reguladoras de apoptosis.

## OBJETIVOS

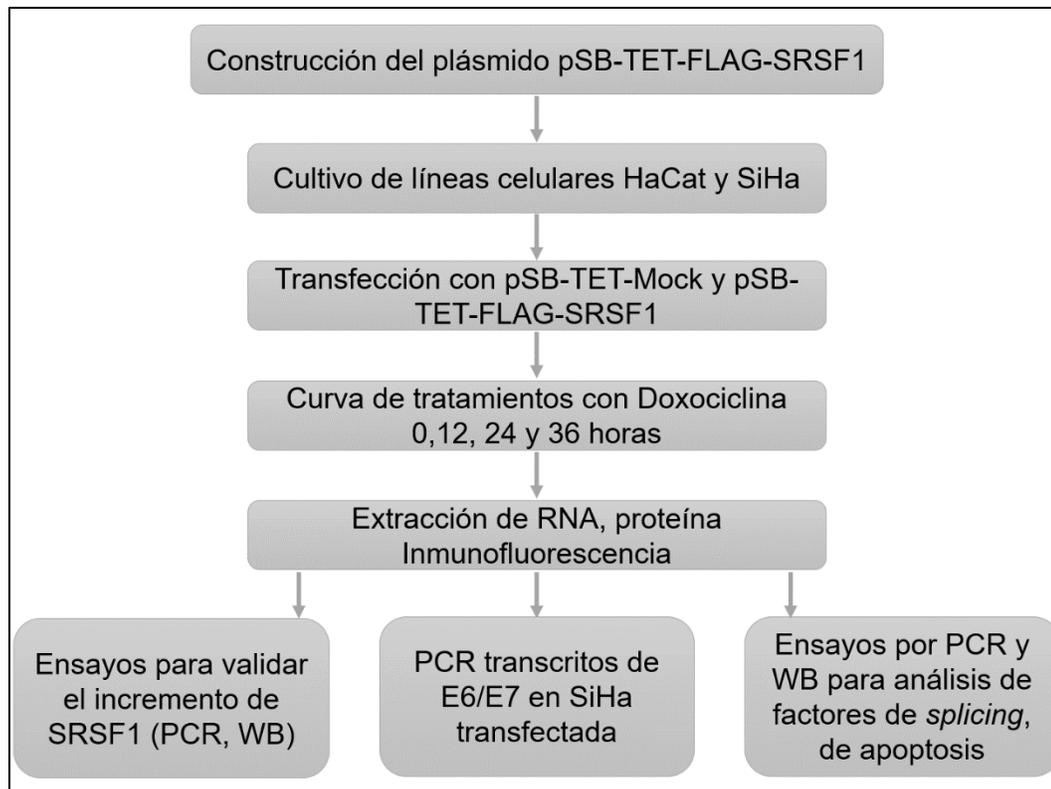
### Objetivo general

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de SRSF1 en los niveles de los transcritos de E6/E7, de factores de *splicing* y factores involucrados en la regulación de apoptosis, en las células derivadas de Cáncer Cervicouterino.

### Objetivos específicos

1. Caracterizar el factor de *splicing* SRSF1 en células derivadas de Cáncer Cervicouterino.
2. Establecer una cinética con doxociclina en las transfectantes HaCaT y SiHa que sobreexpresan SRSF1.
3. Determinar los niveles de mRNA de E6/E7 en la célula SiHa transfectada que sobreexpresa SRSF1.
4. Identificar alteraciones en los factores de *splicing*, en reguladores de apoptosis e interleucinas en las transfectantes HaCaT y SiHa.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Líneas celulares y condiciones de cultivo**

La línea celular no tumoral HaCaT se creció en medio DMEM (HEPES 25 mM) adicionado con 10% SFB, 1% de Glutamax® y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Las líneas celulares C-33 A (VPH negativo) derivada de un carcinoma epiteloide, SiHa (contiene 1-2 copias integradas de VPH16) derivada de carcinoma epitelial, y HeLa (contiene 400-600 copias integradas de VPH18) derivada de un adenocarcinoma, se crecieron en medio MEM adicionado con 10% de SFB y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. La línea celular CaSki (contiene ~500 copias integradas de VPH16) derivada de carcinoma epitelial, se creció en medio RPMI adicionado con 10% de SFB, 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) y 1% de aminoácidos esenciales, a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Para los ensayos con las transfectantes HaCaT y SiHa, se cultivaron durante 24 horas, tratadas con Doxiciclina (#D9891-5G, Sigma-Aldrich), que es un análogo de tetraciclina, a una concentración de 1 µg/mL por 12 y 24 horas antes de realizar los experimentos correspondientes. Las transfectantes HaCaT y SiHa como control fueron tratadas con 0.1% de Dimetil Sulfoxido (DMSO) de Sigma Chemical Co.

### **Construcción de plásmidos**

Para la construcción de los plásmidos, se amplificó el transcrito de SRSF1 a partir de cDNA de HeLa con los oligonucleótidos AAGCTTATGTCGGGAGGTGGTGTGATT (*SRSF1HIND*) y CTCGAGTTATGTACGAGAGCGAGATCTGCT (*SRSF1XHOI*). Este plásmido se sometió a restricción enzimática y secuenciación para corroborar que no se presentaran mutaciones. Posteriormente, el cDNA fue clonado en el vector intermedio *pJetBlunt1.2*, que posee un tamaño de 3 kb, los promotores T3 y T7, y un gen de resistencia de ampicilina para identificación de colonias en medio selectivo. Después, este fragmento de DNA que contiene el ORF de

SRSF1 se subclonó en un vector transitorio pEGFP-N1 (Clontech) en los sitios para las enzimas de restricción HindIII y XhoI, que permitió colocar FLAG en el extremo amino de SRSF1 (vector modificado por el Biólogo Raúl Bonilla Moreno). La clonación fue verificada por análisis de restricción enzimática y por secuenciación.

Subsecuentemente, se reamplificó FLAG-SRSF1 con los oligonucleótidos GGCCTCTGAGGCCATGGATTACAAGGATGACGACGAT (SfiI-FLAG FW) y GGCCTGACAGGCCTTATGTACGAGAGCGAGATCTGCT (SRSF1-SfiI RV). El amplificado fue clonado en el vector intermedio *pJetBlunt1.2* (pJet-SfiI-FLAG-SRSF1-SfiI) y sometido a digestión enzimática con la enzima SfiI. El fragmento liberado se purificó y se subclonó en los vectores pSBbi-GN<sup>TM</sup> y pSBbi-TET<sup>TM</sup> (amablemente donados por el Dr. Vianney Ortíz). La clonación fue verificada por restricción enzimática y secuenciación.

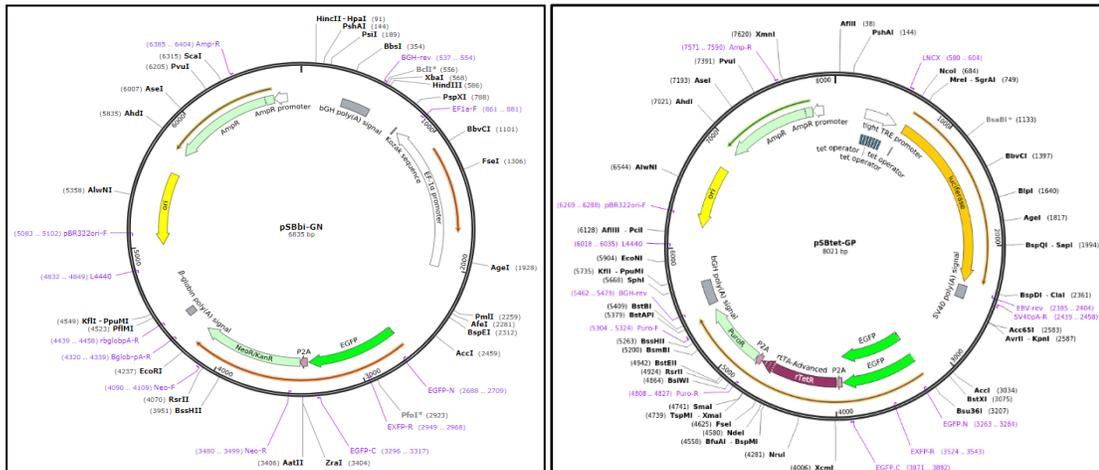


Figura 10. Representación esquemática del vector pSBbi-GN y pSB-TET.

### Transfección con lipofectamina

Las células se cultivaron en placas de 6 pozos durante 24 h o hasta alcanzar un 80% de confluencia. Una hora antes de la transfección, se removió el sobrenadante y se puso medio de cultivo. Posteriormente, se prepararon dos tubos Eppendorf por pozo, uno que lleva plásmido+pCM CAT (2 µl) que

favorece la expresión de la transposasa y otro con el reactivo Lipofectamina 2000® (Thermo Scientific) (4 µl), ambos tubos llevaron medio de cultivo para llevar a un volumen de 100 µl. Se homogenizaron y se incubaron. Se mezcló el contenido del tubo 2 en el tubo 1 y se volvió a homogenizar e incubar. Se agregó la mezcla gota a gota para distribuir uniformemente. Se continuó con los pozos restantes y se homogenizó. Se incubó 24 h y se observó en el microscopio de fluorescencia para observar el marcador fluorescente (GFP). Se mantuvieron las células con la selección con antibiótico Geneticina™ (sulfato G418, #10131035, Thermo Scientific) a concentración de 0.5 mg/ml.

### **Ensayo de inmunofluorescencia**

Para llevar a cabo la inmunofluorescencia, una caja de T25 de las células transfectadas, se lavó dos veces con PBS1X, se despegaron y resuspendieron en 5 ml de medio. Se pasó a un tubo Falcon de 15 ml, se centrifugó a 1500 rpm 5 min a temperatura ambiente. Se repitió el lavado en el botón. Se adicionó 2 ml de medio y se contaron 150,000 células en la cámara de Neubauer. Se colocó por goteo el volumen equivalente en un cubreobjetos colocado en una placa de 12 pozos. Se adicionaron 2 ml adicionales de medio y se dejaron creciendo 24 h. Al día siguiente, se lavó con PBS1X a temperatura ambiente. Se retiró y adicionó PFA al 4% (diluido con PBS1X a 4°C). Se incubó por 15 min (a partir de este momento, se mantuvo siempre cubierto de la luz). Se retiró el exceso de PFA, se lavó con PBS1X por 5 min. Se permeabilizó con Tritón X-100 0.01% por 15 min y se retiró el volumen. Se lavó por 5 min con PBS y se agregó solución de bloqueo (PBS+Tritón X-100 0.01%+BSA 1%). Se incubó por 1 h y se procedió a lavar los pozos con PBS. Se preparó el anticuerpo en la dilución recomendada por el fabricante utilizando la solución de bloqueo como diluyente. Se incubó a 4°C por toda la noche. Se lavaron los pozos con PBS. Se preparó el anticuerpo secundario correspondiente (anti mouse Alexa 488 o anti rabbit Alexa 594, Thermo Fisher Scientific) utilizando como diluyente la solución de bloqueo. Se incubó a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente se lavaron los pozos

con PBS. Se agregó el DAPI diluido 1:1000 y se incubó por 5 min. Se lavó por 5 min con PBS1X. Se tomó el cubreobjetos, se sumergió varias veces en agua miliQ y se secó el exceso de líquido. Sobre el portaobjetos previamente etiquetado, se adicionó 5  $\mu$ l de VectaShield Mounting® y se depositó el cubreobjetos. Se fijó con barniz mezclado con resellador y guardó a -20°C. Se observaron en el microscopio confocal Olympus IX7, tomando de 2-3 imágenes en varios campos, con los objetivos 40X y 100X.

### **Extracción de RNA y tratamiento con DNAsa**

La extracción de RNA se hizo con el reactivo de TRIzol™ (#15596026, Invitrogen™, Thermo Scientific) a partir de cultivos con >80% de confluencia (15x10<sup>6</sup> de células). Se efectuaron los lavados con PBS1X, se adicionó 1 ml del reactivo por pozo y procedió con el raspado de la monocapa. Se agregó 200  $\mu$ l de cloroformo, centrifugación por 15 min a 12,000 rpm a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el RNA con 500  $\mu$ l de isopropanol y posteriormente se centrifugó, después se lavó con etanol al 70%. Se centrifugó adicionalmente 5 min a 12,000 rpm a 4°C, la pastilla se secó (el tubo se colocó destapado y cubierto con una sanita durante 30 min), y se resuspendió en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Se verificó la integridad del RNA por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% con TAE1X.

En el tratamiento con DNAsa para eliminación del DNA genómico remanente en la preparación del RNA, se adicionaron 5  $\mu$ l del amortiguador de DNAsa 10X y 1  $\mu$ L de enzima DNAsa (EN0521, Thermo Scientific). Posteriormente se incubó por 1 hora a 37°C. Nuevamente, se adicionó 1  $\mu$ l de enzima DNAsa y se incubó por 1 hora a 37°C. Inmediatamente, se agregó 5  $\mu$ l de reactivo de inactivación y se incubó por 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 1 min a 10,000 rpm, se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo limpio. Finalmente, el RNA se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar su integridad.

## **Retro-Transcripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)**

La reacción de retrotranscripción (RT) se llevó a cabo utilizando el RNA libre de DNA (10 µg) de las líneas celulares transfectadas y sus controles, en una mezcla con 3 µl de 10 µM oligo dT, 10 µl de 200 µM dNTPs y se completó a un volumen de 25 µl con agua libre de nucleasas. Se incubará a 70°C durante 5 min. Posteriormente, se adicionó una mezcla con 10 µl de amortiguador 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl y 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 5 µl de 0.1 M Dithiothreitol (dTT) y se llevó a un volumen de 50 µl con agua libre de nucleasas, incubándolo a 42°C 2 min. Se separaron 5 µl (RT-) y se adicionó 2 µl de la retrotranscriptasa (200 U/µl) (SuperScript II, Invitrogen). Se incubó la mezcla a 42°C durante 1 h y 30 min para llevar a cabo la reacción y a 70°C durante 5 min para inactivación de la SuperScript II. Para efectuar la reacción de PCR, se utilizó 1 µl de cDNA como templado, en una mezcla de los siguientes reactivos: 10 µl de amortiguador 10X, 2 µl de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µl de 200 µM dNTPs, 0.25 µl de Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen), 1 µl de 10 µM oligonucleótido sentido y 1 µl de 10 µM oligonucleótido antisentido, y se llevó a un volumen final de 50 µl con agua libre de nucleasas. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 1 ciclo a 92°C por 2 min, 30 ciclos de 92°C por 20 seg, 55°C (dependiendo del alineamiento de los oligonucleótidos) por 20 seg y 72°C por 45 seg, finalizando con 1 ciclo de 72°C durante 7 min. La reacción se llevó a cabo en el termociclador *Thermal Cycler 2720* (Applied Biosystem). Los productos de PCR se detectaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en TAE1X y se visualizaron en un transiluminador UV. En anexos se encuentra una tabla 2 con los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

## **Ensayo de western blot**

Para la obtención extractos proteicos, 15x10<sup>6</sup> células se cultivaron en cajas Petri de 100 mm. Hasta llegar a monocapa confluyente, las células se lavaron dos veces con PBS1X, se eliminó el exceso y se adicionó el reactivo M-PER 1X con inhibidores de proteasas (Complete®) o el amortiguador RIPA

(preparado en el laboratorio, siguiendo las recomendaciones de Monroy, F.) con el cóctel inhibidor de proteasas cCOMPLETE™ (#11697498001, Roche) y para experimentos adicionales se agregó el inhibidor de fosfatasas PhosStop™ (#4906845001, Roche). Se agitó vigorosamente en el rotor durante 10 min. Se raspó la caja, se homogenizó y el contenido se transfirió a un tubo Eppendorf. Se centrifugó a 12,500 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo y se estimó el nivel de proteínas por el método de Bradford. Se tomaron aproximadamente 50 µg de proteínas totales y se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 o 12% [H<sub>2</sub>O desionizada, amortiguador Tris pH 8.8 1.5 M/Tris pH 6.8 1 M, SDS al 10%, mix de acrilamida 30% (29.2% de acrilamida y 0.8% de *N, N'*-metileno-bis-acrilamida), persulfato de amonio al 10% y TEMED]. Las proteínas se cargaron con el amortiguador de Laemmli 2X/4X y como marcador se utilizará el marcador *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific). Las proteínas fueron corridas en una cámara de electroforesis MIGHTY SMALL II FOR 8X7CM GELS (Amersham Biosciences) con un amortiguador de corrida, se electrotransfirieron en una membrana de PVDF (*Perkin Elmer*) utilizando un amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, 20% de metanol). Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con una solución de TBS1X-Tween-20 con 5% de leche descremada en polvo durante 1 hora y se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos. Se hicieron 3 lavados de 5 min con TBS1X-Tween-20 y, se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa anti-rabbit, anti mouse (diluidos 1:5,000) y anti goat (diluido 1:4,000), según corresponda el anticuerpo primario, durante 1 hora y 30 min respectivamente, usando TBS1X-Tween-20 con 5% de leche descremada en polvo. Se procedió con tres lavados durante 5 min con TBS1X y se reveló por quimioluminiscencia con el substrato *SuperSignal West Pico/Femto* (Sigma-Aldrich), utilizando el equipo *ChemiDoc MP Imagen System* (Bio-Rad). En anexos se encuentra la tabla 3 con todos los anticuerpos utilizados en este trabajo.

### **Ensayo de defosforilación con fosfatasa lambda**

Se llevó a cabo la cuantificación del extracto proteico con RIPA, considerando el volumen a 50 µg de proteína por reacción. La reacción se ajustó con base en lo recomendado por el fabricante; se adicionó el volumen del extracto proteico, 10 µl de amortiguador de reacción 10X, 5 µl de MnCl<sub>2</sub>, 1 µl de enzima fosfatasa lambda (#401941-75-1, Sigma-Aldrich) y se llevó a un volumen final de 50 µl. Se incubó a 30°C por 30 min, se adicionó 12.5 µl de 4X Laemmli y se inactivó por incubación a 95°C por 10 min. Se centrifugó el tubo a 12,000 rpm por 2 min y se recuperó el sobrenadante. Se cargaron 20 µg de proteína para los ensayos de western blot. Como control de carga se usó actina.

### **Ensayo de inmunoabsorbencia ligada a enzima (ELISA)**

Un día antes, se llevó a cabo la sensibilización de la placa de 96 pozos con el anticuerpo recombinante. Para ello, se preparó el amortiguador de recubrimiento (NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, agua miliQ, pH 9.5) y se diluyó con el anticuerpo de captura a una dilución 1:250. Se adicionó 100 µl por pozo y se incubó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se eliminó el volumen y se lavó 3 veces con PBS1X+Tween 0.01%. Se preparó la solución de bloqueo (PBS1X+Tween 0.01%+BSA 5%) y se adicionó a cada pozo un volumen de 250 µl. Se cubrió de la luz y se colocó en agitación suave por 1 h. Transcurrido el tiempo, se decantó y se procedió a hacer 3 lavados. Se preparó la dilución de la recombinante (control estándar) y los sobrenadantes de las células (muestra problema, se centrifugaron 2,500 rpm por 5 min) con la dilución correspondiente (con anterioridad se llevó a cabo una curva estándar para la concentración utilizando sobrenadantes de las líneas celulares). Las diluciones de las recombinantes y los sobrenadantes se prepararon con la solución de bloqueo y con las consideraciones del fabricante (BD OptEIA™ TNF-α Human TNF ELISA Set, BD OptEIA™ IL-6 Human IL-6 ELISA Set, BD OptEIA™ Human IL-8 ELISA Set, BD Bioscience). Se agregaron 100 µl por pozo de la dilución, se cubrió de la luz y se colocó en agitación suave por 2 h.

Se llevaron a cabo 5 lavados con PBS1X+Tween 0.01%, se preparó la solución detectora con el anticuerpo de detección y agente enzimático en una dilución 1:250, de acuerdo a las consideraciones del fabricante. Se agregó 100 µl de la solución y se incubó por 1 h. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se hicieron 7 lavados con PBS1X+Tween 0.01%. Se preparó la solución reveladora (OPD, amortiguador de citratos, agua miliQ), se homogenizó hasta que el OPD se disolviera y se agregó peróxido de hidrógeno. Se mezcló e inmediatamente se agregó 100 µl a los pozos. Se incubó a 36°C por un lapso de 30 min en agitación suave. Se adicionó la solución de paro (solución de ácido sulfurico 2N), considerando 50 µl por pozo. Se llevó a leer en el lector de placas de ELISA (Multiskan™ FC Microplate (ELISA) Reader, Thermo Fisher Scientific) a una longitud de onda de 450 nm.

## RESULTADOS

### Caracterización del factor de *splicing* SRSF1 en líneas celulares derivadas de Cáncer Cervicouterino

Para llevar al cabo la caracterización molecular de la expresión de SRSF1, se utilizaron las líneas celulares HaCaT (epitelial no maligna) y SiHa (VPH+) como líneas celulares problema, y C33A (VPH+) y CaSki (VPH+, altamente maligna) como líneas celulares control. Se cultivaron las células, se obtuvieron extractos RNA y proteína para hacer ensayos de RT-PCR y western blot, respectivamente. En la figura 11, se muestran los resultados de RT-PCR y western blot de SRSF1 en las diferentes líneas celulares. En la figura 12A se observa que los niveles de transcrito de SRSF1 son similares en las 4 líneas. En la figura 12B, en el western blot usando extractos solubles, la proteína SRSF1 solo fue detectada en la célula HaCaT. Adicionalmente se aprecia el western blot utilizando extractos totales en ausencia y presencia de inhibidores de fosfatasa (PhosStop™ de Roche). Esto nos mostró que SRSF1 que se encuentra fosforilado se detecta con mayor intensidad y podría sugerir que es regulado post-traduccionamente a nivel de fosforilación; ya que se observa mayor nivel de proteína en presencia de inhibidor de fosfatasa, tanto en las líneas celulares VPH- y las líneas celulares VPH+. Al usar extractos totales en la figura 12C, se observa en todas las líneas celulares, pero los niveles de proteína son mayores en SiHa y CaSki y los más bajos en C33-A. Estos resultados pueden indicarnos que en la línea celular HaCaT la proteína SRSF1 puede encontrarse también en forma soluble en el citoplasma celular, a diferencia de las líneas malignas, donde no se detecta en los extractos solubles. Desafortunadamente, no se llevó al cabo el fraccionamiento núcleo-citoplasma, para comprobar si la proteína SRSF1 se encuentra solo en el núcleo, o también agregada a otros complejos citoplásmicos (vgr. polisomas y cuerpos P). Los datos sugieren que las líneas de cáncer presentan una alteración en la regulación del *Turnover* o el recambio de este factor, pero se requieren más experimentos para verificarlo.

Se ha relacionado que el factor SRSF1 se encuentra hiperfosforilado en diferentes tipos de cáncer: como de mama (Anczuków, O. *et al.*, 2012; Anczuków, O., *et al.*, 2015), de colon (Gonçalves, V., *et al.*, 2014), de pulmón de células pequeñas (Gout, S., *et al.*, 2012) y gliomas (Chang, Y., *et al.*, 2015). La hiperfosforilación incrementa la actividad de SRSF1 en el *splicing* alternativo para la generación de isoformas que promueven la malignidad (Das, S., & Krainer, A. R., 2014). En la figura 12D, se muestra el western blot utilizando fosfatasa lambda (elimina todos los grupos fosfato de SRSF1), se observó una disminución considerable en los niveles del factor SRSF1 en HaCaT y SiHa; lo que indica que la fosforilación protege al factor de su degradación. Notablemente, a pesar de observarse una disminución en CaSki, fue posible detectar la proteína en el tamaño observado, migra más lento que en las otras líneas celulares. Esto indica que posiblemente la proteína SRSF1 en CaSki podría presentar otras modificaciones post-traduccionales como metilación o acetilación que afectan la localización celular (Sinha, R., *et al.*, 2010). Es necesario hacer más estudios para conocer como es la regulación de SRSF1 en estas líneas celulares, así como determinar los tiempos de vida media en cada línea celular.

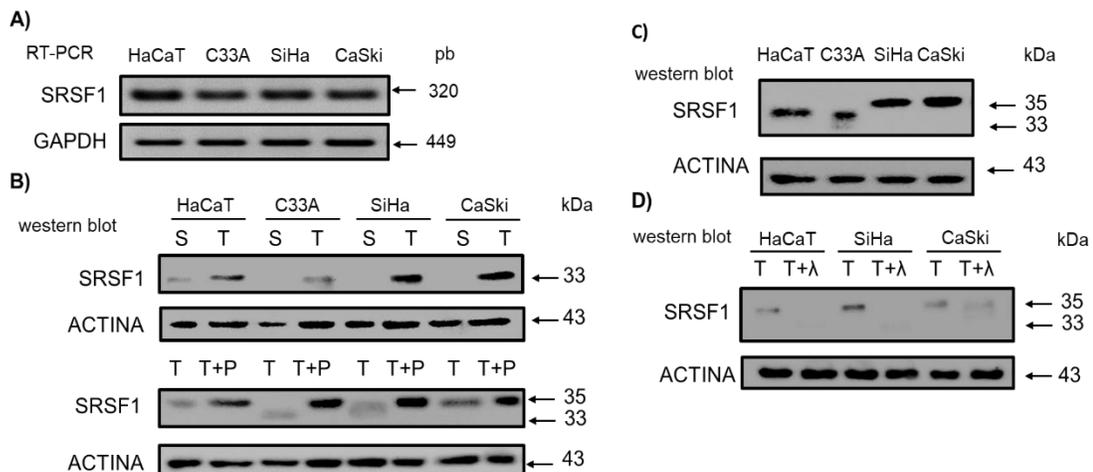


Figura 11. Expresión heterogénea de SRSF1 en líneas derivadas de Cáncer Cervical. A) RT-PCR para la expresión de mRNA de SRSF1. Se utilizó GAPDH como control de carga. B) Western blot para la detección de SRSF1 en extractos solubles (S) con M-Per® y en totales (T) con RIPA. Western blot para la detección de SRSF1 en extractos totales (T) y extractos totales tratados con inhibidor de fosfatasa (T+P). C) Western blot para la detección de SRSF1 en extractos totales (RIPA). D) Western blot para la detección de SRSF1 con extractos totales (RIPA) y extractos tratados con fosfatasa lambda (T+λ). Se utilizó actina como control de carga en el western blot.

En la figura 12 se muestran los resultados de la inmunofluorescencia (IF) para detectar y localizar SRSF1 en las líneas celulares (figura 12A) y para detectar los niveles de proteína de otros factores de *splicing* relacionados con la actividad de SRSF1 se hizo un western blot (figura 12B). En las IF se observó que la mayor expresión de SRSF1 se detectó en las líneas celulares SiHa y CaSki (que contienen integrado el genoma de VPH16), mientras que la detección en HaCaT fue menor, estos datos son consistentes con lo observado en la figura anterior. Además, se observa que la proteína SRSF1 se distribuye en el citoplasma, y predominante, en el núcleo, donde posiblemente se localizan los *speckles*. Desafortunadamente no se realizaron los experimentos de co-localización con anticuerpos específicos en estas regiones para determinar la región nuclear donde se localiza el factor en estas líneas celulares. En el western blot se observa que las líneas celulares SiHa y CaSki que tienen mayores niveles de proteína SRSF1, también hay un incremento de otros factores de *splicing* como SRSF2, PTB1, hnRNPA1 y hnRNPA2B1 (figura 12B). Se concluye que SRSF1 se encuentra expresado heterogéneamente en las líneas celulares estudiadas y que podría tener un papel importante en la regulación del *splicing* alternativo en diversas proteínas de interés para la investigación.

Interesantemente, en HaCaT se observa mayores niveles de proteína C-MYC (regula transcripcionalmente la expresión de SRSF1) en comparación con las líneas tumorales (figura 12B). Esto se puede explicar porque los queratinocitos de estratos suprabasales en la piel tienen una mayor expresión de C-MYC para mantener un balance entre proliferación celular y apoptosis, así como el recambio celular en estos estratos (Pelengaris, S., *et al.*, 2000; Flores, I., *et al.*, 2004).

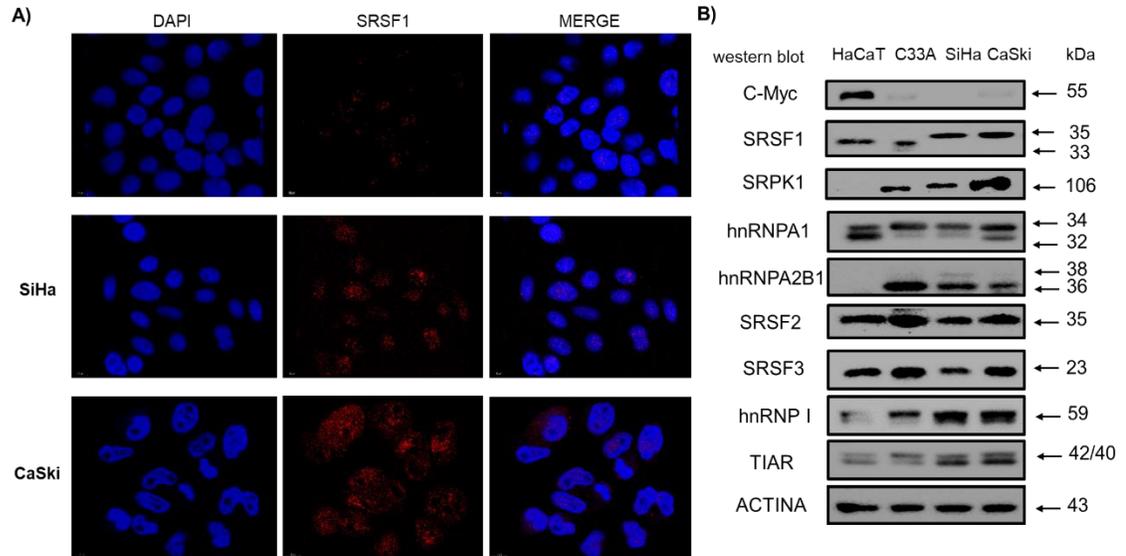


Figura 12. Expresión heterogénea de la proteína SRSF1 y de factores de *splicing* en líneas celulares derivadas de Cáncer Cervicouterino. A) Expresión de SRSF1 mediante inmunofluorescencia en líneas derivadas de Cáncer Cervical. B) Western blot para la detección de proteínas relacionadas con SRSF1. C-MYC es el principal regulador transcripcional de SRSF1, SRPK1 es la principal cinasa que fosforila SRSF1 y algunos factores de *splicing* relacionados con SRSF1. Es de notar la heterogeneidad en los niveles de estos factores, principalmente en la línea resistente a muerte CaSki.

### Construcción de pSB-GN-FLAG-SRSF1 y pSB-TET-FLAG-SRSF1

La construcción de los plásmidos pSB-GN-FLAG-SRSF1 y pSB-TET-FLAG-SRSF1 se llevó al cabo a partir de la amplificación por RT-PCR del ORF de SRSF1, utilizando como molde el cDNA de HeLa. Posteriormente, este fragmento se clonó en *pJet1.2/blunt* con reacción de restricción enzimática utilizando las enzimas *Hind* III y *Xho* I. El fragmento recuperado se subclonó en pEGFP-FLAG-N1 (el tag FLAG queda en fase con el ORF de SRSF1, es decir, FLAG se colocó en el extremo N1 de la proteína SRSF1). Se corroboró la liberación del fragmento y el plásmido se secuenció. Se continuó con la amplificación de FLAG-SRSF1 con los sitios de corte para *Sfi* I con los oligonucleótidos mencionados anteriormente. Dicho amplificado fue clonado en *pJet1.2/blunt*, fue sometido a digestión enzimática con *Sfi* I para ser subclonado en los vectores finales pSBbi-GN<sup>TM</sup> y pSBbi-TET<sup>TM</sup>. Las nuevas construcciones pSB-GN-FLAG-SRSF1 y pSB-TET-FLAG-SRSF1 se

secuenciaron y se corroboró la liberación del fragmento FLAG-SRSF1. En la figura 13 se muestra el esquema del vector de expresión y los resultados de las digestiones de los plásmidos.

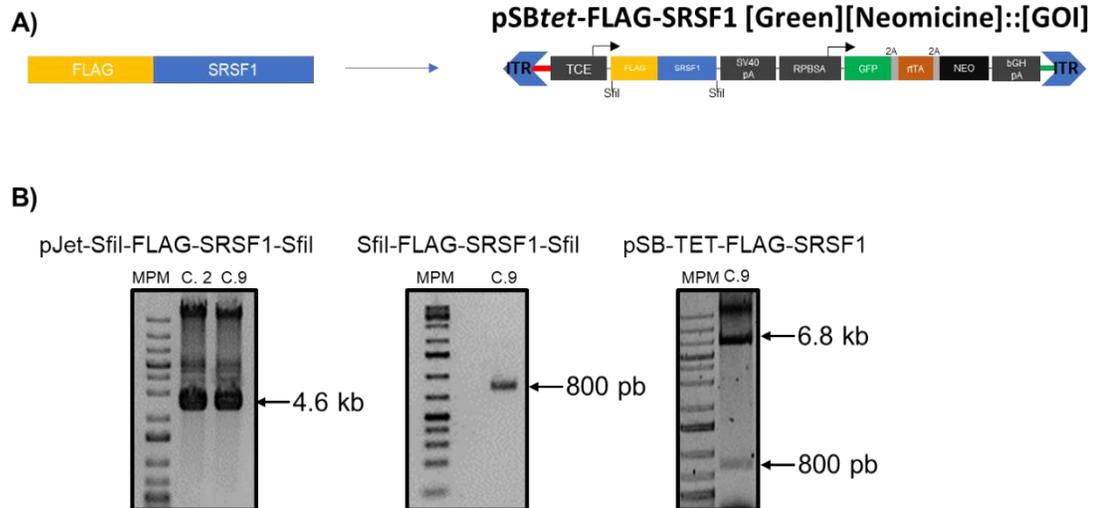


Figura 13. Construcción del plásmido pSB-TET-Flag-SRSF1. A) Esquema representativo del plásmido pSB-TET-FLAG-SRSF1 utilizado para la sobreexpresión de SRSF1. B) La digestión enzimática del vector intermediario pJet-SfiI-FLAG-SRSF1-SfiI se hizo utilizando la enzima Sfi I, el fragmento liberado (800 pb) fue ligado en el vector de expresión pSB-TETTM. Posteriormente, se sometió nuevamente por digestión enzimática con Sfi I y se corroboró la secuenciación del plásmido.

Se procedió a transfectar las células HaCaT y SiHa con el reactivo Lipofectamina 2000® (Thermo Scientific). Las células se mantuvieron bajo selección con el antibiótico Geneticina (G418) durante 2 semanas. Una vez que las cajas con las células estuvieron confluentes, se hicieron pases para hacer una curva con tratamiento con doxiciclina a diferentes tiempos para observar un incremento en la expresión de SRSF1.

### **Incremento de expresión de SRSF1 en las líneas celulares HaCaT y SiHa transfectadas con pSB-GN-FLAG-SRSF1 y pSB-TET-FLAG-SRSF1**

Las líneas celulares transfectadas fueron tratadas con doxiciclina durante 12 y 24 horas, según de que permitiría mantener una mayor expresión de SRSF1 exógeno (FLAG-SRSF1). En la figura 14A se muestran los resultados de RT-PCR con los niveles de mRNA de SRSF1 exógeno, SRSF1 endógeno y control de carga. Se observó un incremento del mensajero de SRSF1

exógeno tras 24 horas con tratamiento con doxiciclina en ambas líneas transfectadas. Interesantemente, los niveles de mensajero de SRSF1 no presentaron cambios, lo que sugiere un control de los niveles de su mensajero. En la figura 14B muestra el western blot para detectar SRSF1 y FLAG-SRSF1 con las transfectantes tras inducción con doxiciclina durante 0 h, 12 h, 24 h y 36 h. Se denota un incremento de los niveles de SRSF1, principalmente la proteína de fusión FLAG-SRSF1. En el western blot, usando extractos de las transfectantes de HaCaT, los niveles de proteína de SRSF1 parecen casi no detectables o muy bajos, en ausencia de doxiciclina; pero se hace la aclaración, también se decidió colocar una menor exposición de la figura, debido a que la señal de SRSF1 es intensa en HaCaT (lo cual se corrobora más adelante con la inmunofluorescencia); y la finalidad de este western blot fue la detección de la sobreexpresión de SRSF1 y la proteína de fusión de FLAG-SRSF1. En la figura 14C se observan el western blot para SRSF1, FLAG, GFP (indicador de transfección) y control de carga. Se observó un incremento de los niveles de proteína SRSF1 tras el tratamiento con doxiciclina, siendo mayor a las 24 horas. Se verificó la expresión de GFP (expresión constitutiva), lo que corroboró la transfección en las líneas celulares HaCaT y SiHa. Con base en estos resultados, se consideró utilizar el tratamiento con doxiciclina por 24 h. En la figura 14D se demuestra el western blot utilizando las transfectantes con tratamiento con doxiciclina por 24 h, donde se comprueba la sobreexpresión de SRSF1.

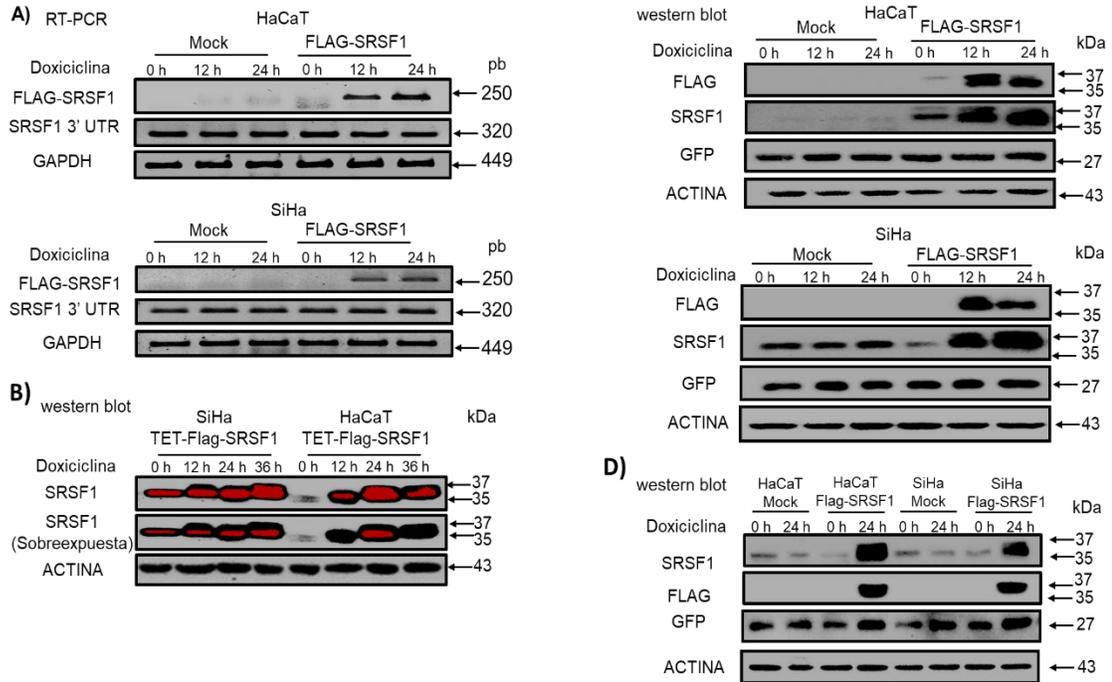


Figura 14. Sobreexpresión de SRSF1 en las líneas celulares HaCaT y SiHa transfectadas. A) RT-PCR que muestra los niveles de mensajero de SRSF1 exógeno y SRSF1 endógeno. Como control de carga se utilizó GAPDH. B) western blot que muestra niveles de proteína de SRSF1 y FLAG-SRSF1 en las transfectantes SiHa y HaCaT a las 0, 12, 24 y 36 h después del tratamiento con doxiciclina. El color rojo muestra la sobreexpresión de la membrana. C) western blot que muestra los niveles de proteína de FLAG (etiqueta), GFP y SRSF1. Como control de carga se utilizó Actina. D) western blot con las condiciones finales de tratamiento con Doxiciclina 24 horas en las transfectantes.

Para corroborar los datos de sobreexpresión y de localización de SRSF1 en estas transfectantes, se hizo una inmunofluorescencia indirecta usando los anticuerpos para detectar FLAG y SRSF1. En la figura 15A, se muestran los resultados de la inmunofluorescencia en las transfectantes después del tratamiento con doxiciclina. En la figura 15A, se muestra la expresión del tag FLAG donde se observó un incremento notable en la expresión de FLAG-SRSF1 tras el tratamiento con doxiciclina a las 24 horas. Además, se observó una localización tanto nuclear como citoplasmática de la proteína, con el patrón característico puntiforme en el núcleo, que recuerda a los *speckles* nucleares (localización nuclear de factores de *splicing*). Estos resultados demuestran que la proteína exógena no presenta una

deslocalización por FLAG y podría conservar sus funciones. En la figura 15B, se observa la expresión total de SRSF1 (endógeno y FLAG-SRSF1) usando el anticuerpo SRSF1, donde se corroboró un incremento de expresión del factor de *splicing* posterior al tratamiento con doxiciclina.

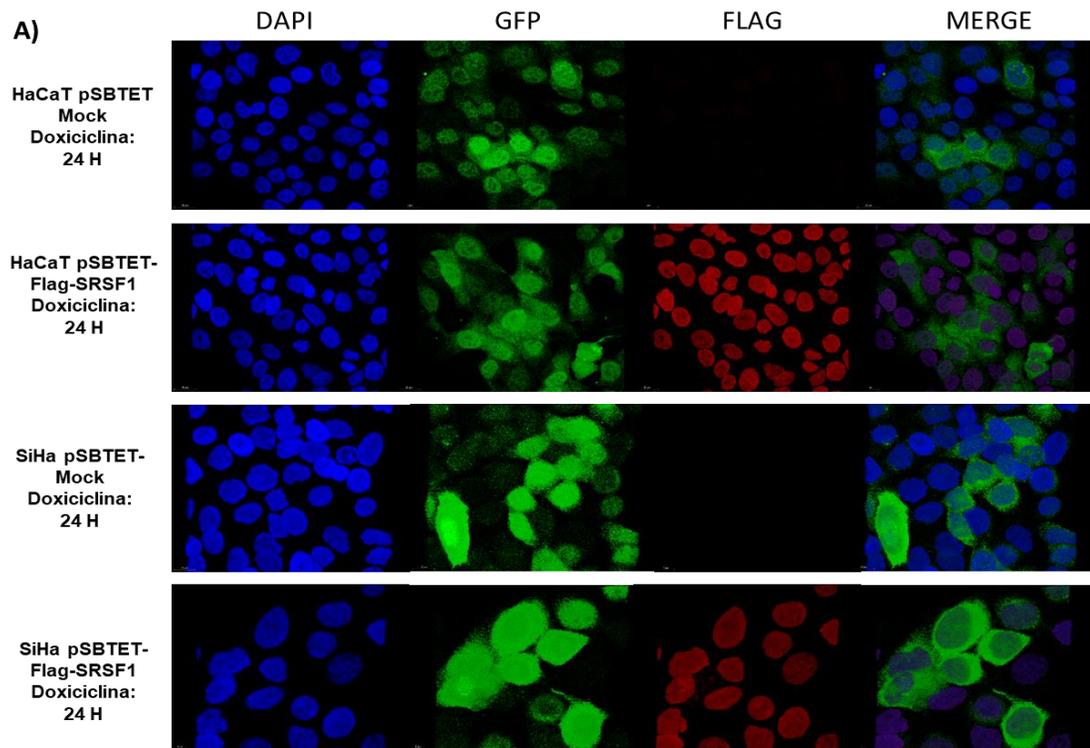
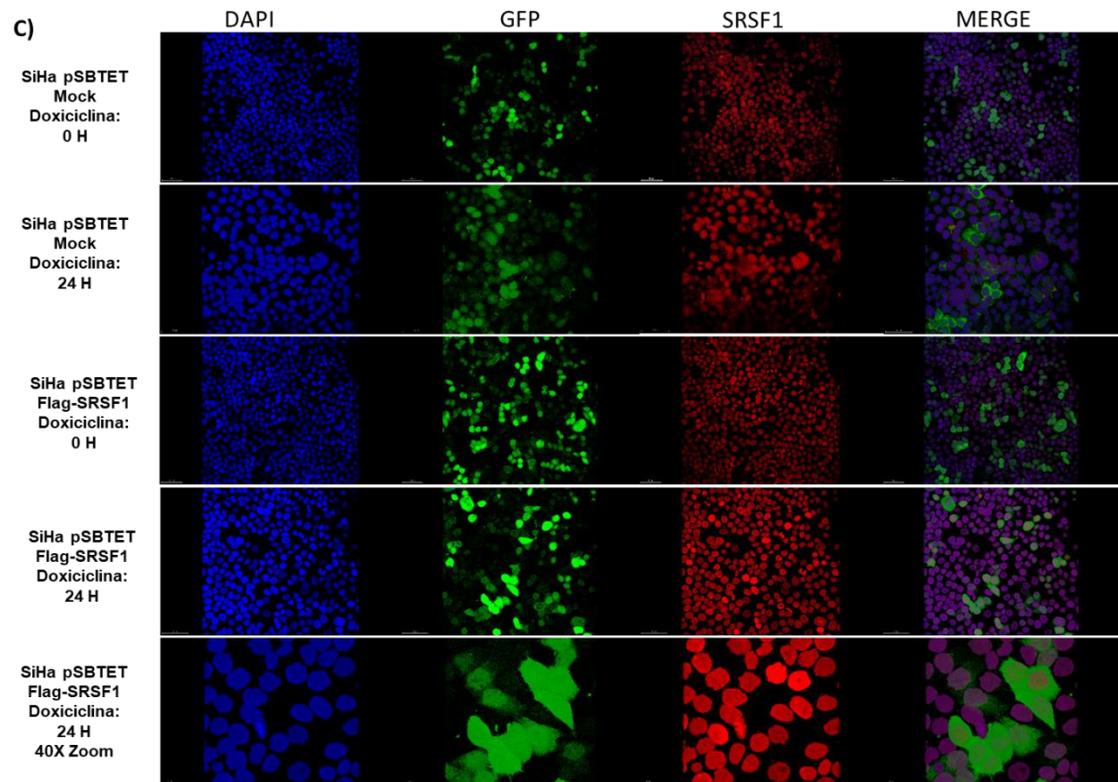
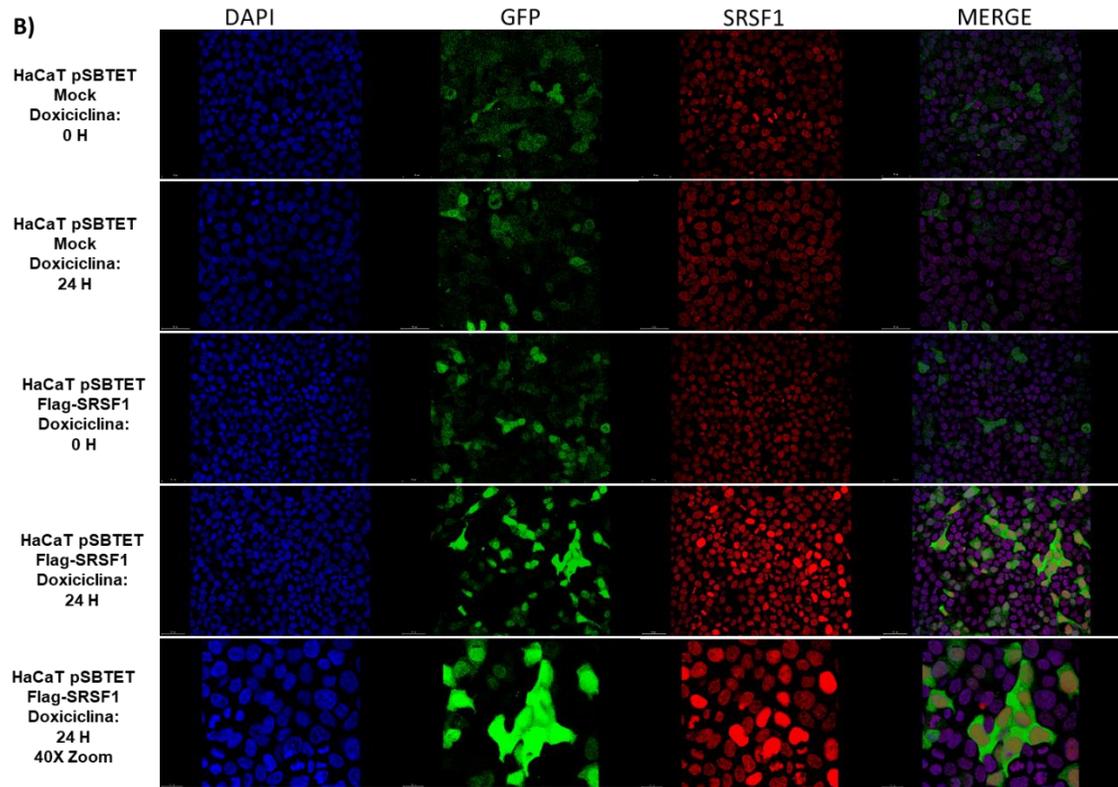


Figura 15. Sobreexpresión de la proteína SRSF1 en las líneas transfectadas. A) Inmunofluorescencia con el anticuerpo FLAG (diluido 1:50 en PBS1X) en las líneas transfectadas y tratadas con doxiciclina. B) y C) Inmunofluorescencia con el anticuerpo SRSF1 (diluido 1:50 en PBS1X) en las líneas transfectadas y tratadas con doxiciclina. Se utilizó DAPI marcador de núcleo. Se muestra una amplificación 40X Zoom para observar a mayor detalle su localización. (Continúa en la siguiente página)



## La sobreexpresión de SRSF1 incrementa los niveles de transcritos de E6/E7 en SiHa

Para analizar los niveles de transcritos del bicistrón de E6/E7 ( $E6/E7^{pre-mRNA}$ ,  $E6^*I/E7$ ,  $E6^*II/E7$  y  $E6^{\wedge}E7$ ) en la línea celular SiHa, se hizo una RT-PCR utilizando los oligonucleótidos que amplifican el inicio del ORF de *E6* y el fin del ORF de *E7* con menos ciclos de amplificación (ver anexo). Se observó un ligero incremento en  $E6/E7^{pre-mRNA}$  y  $E6^*I/E7$  en SiHa transfectada con FLAG-SRSF1 en comparación con el mock. (del Moral O., *et al.*, 2010).

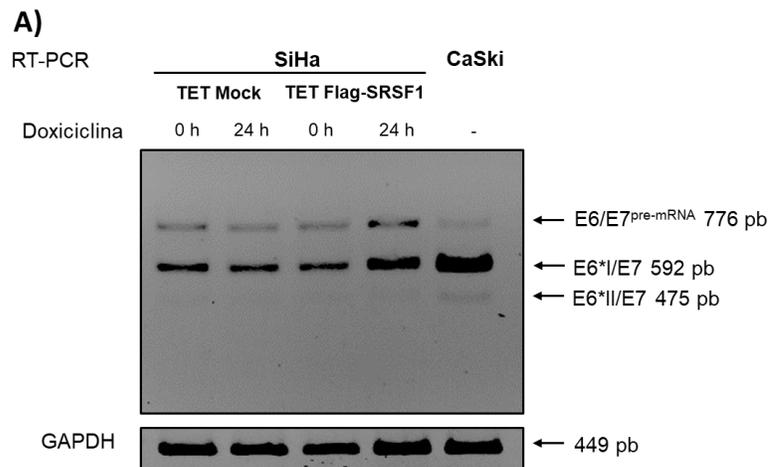


Figura 16. Incremento de los transcritos de isoformas de E6/E7 de VPH16 detectados en la línea celular SiHa transfectada. Como control positivo, se utilizó cDNA de CaSki. control de carga se utilizó actina.

## La sobreexpresión de SRSF1 en HaCaT y SiHa incrementa los niveles de transcrito y proteína de algunos factores de *splicing* y clAPs.

Dado el papel de SRSF1 en favorecer el *splicing* alternativo de algunos genes conocidos, específicamente nos interesamos por analizar los que son blanco de regulación por la familia NF- $\kappa$ B, como son: algunos genes involucrados en el control de la muerte celular o de interleucinas y quimiocinas. Los niveles relativos de transcrito y proteína, se analizaron por las técnicas de RT-PCR tiempo final y western blot, respectivamente. En la figura 17 se observan los resultados de los factores de *splicing*; claramente se observa un incremento en los niveles de mRNA de SRSF3 en HaCaT y SiHa transfectadas, después del tratamiento con doxiciclina, pero no se observó

diferencia en hnRNPA1 y hnRNPA2B1. Además, se observó que el tratamiento con doxiciclina afecta los niveles de mRNA de PKM en ambas líneas celulares, pero no se detectó diferencias en hnRNP I. Interesantemente, se observa un incremento muy claro en los niveles de proteína de hnRNPA2B1 en la transfectante de SiHa, pero solo un ligero incremento en PTB en ambas líneas transfectadas. Por lo que todos estos hallazgos sugieren que la sobreexpresión de SRSF1 podría alterar los niveles de mensajero y de proteína de algunos factores de *splicing* en estas líneas celulares.

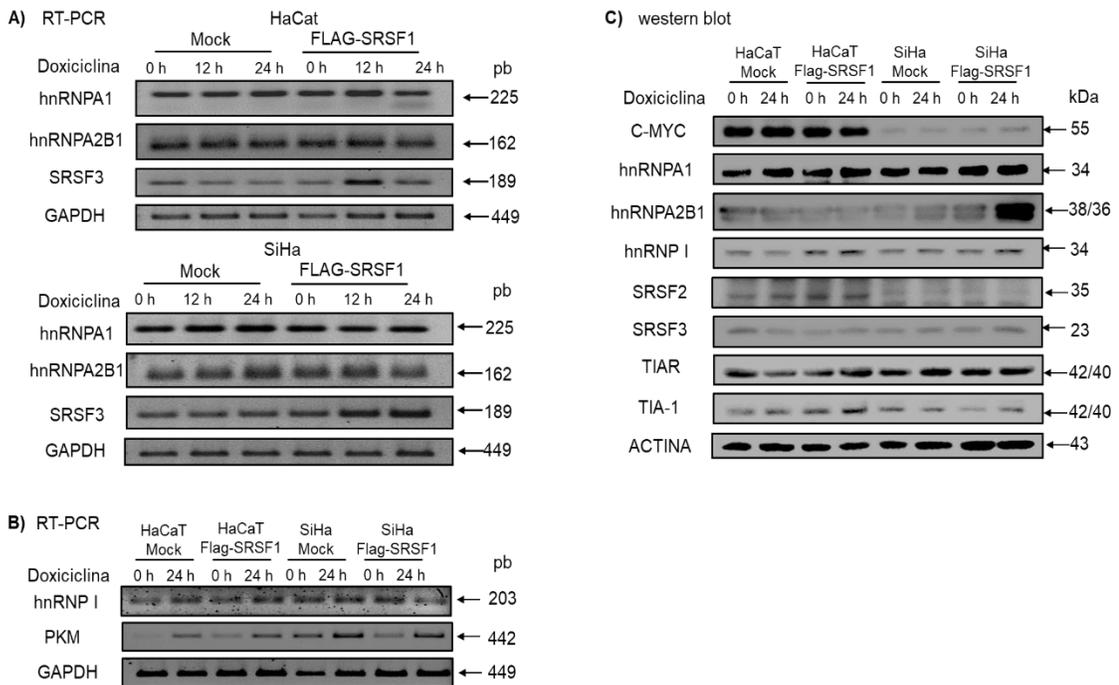


Figura 17. Alteración en los niveles de expresión de factores de splicing en las líneas celulares transfectadas derivadas de Cáncer Cervicouterino. A) RT-PCR de hnRNPA1, hnRNPA2B1 y SRSF3 en las líneas celulares HaCaT y SiHa. Se utilizó 1 µl de cDNA de las líneas celulares transfectadas. B) RT-PCR de hnRNP I y PKM en las líneas celulares transfectadas. Se utilizó 1 µl de cDNA de las líneas celulares. C) western blot de los niveles de proteína de algunos factores de splicing regulados por SRSF1. Como control de carga se utilizó GAPDH y actina para la RT-PCR y western blot, respectivamente. Para el western blot, se utilizó una imagen representativa de control de carga.

También se analizó el efecto de la sobreexpresión de SRSF1 sobre el nivel de expresión de algunos factores que controlan la apoptosis, entre ellos c-IAP1 y CIAP2. La figura 18 muestra sus niveles de mRNA y de proteína. En células HaCaT se observó una ligera disminución del transcrito de CIAP1 a las 12 h pero un incremento a las 24h, además de incremento en CIAP2 a las 12

y 24 h después del tratamiento con doxiciclina. Interesantemente, a nivel de proteína, no se observan diferencias claras en las transfectantes en SiHa, aunque hay un ligero incremento en HaCaT a las 24h; aunque se observó una ligera disminución de XIAP en la transfectante de SiHa, no se detectó ningún cambio claro aparente en los niveles de proteína de otros factores de control de la apoptosis, aunque algunos de ellos son blancos conocidos de regulación de *splicing* por SRSF1. Sin embargo, nosotros en este momento no analizamos los efectos en el nivel de *splicing* alternativo, dado que son hechos conocidos en la literatura.

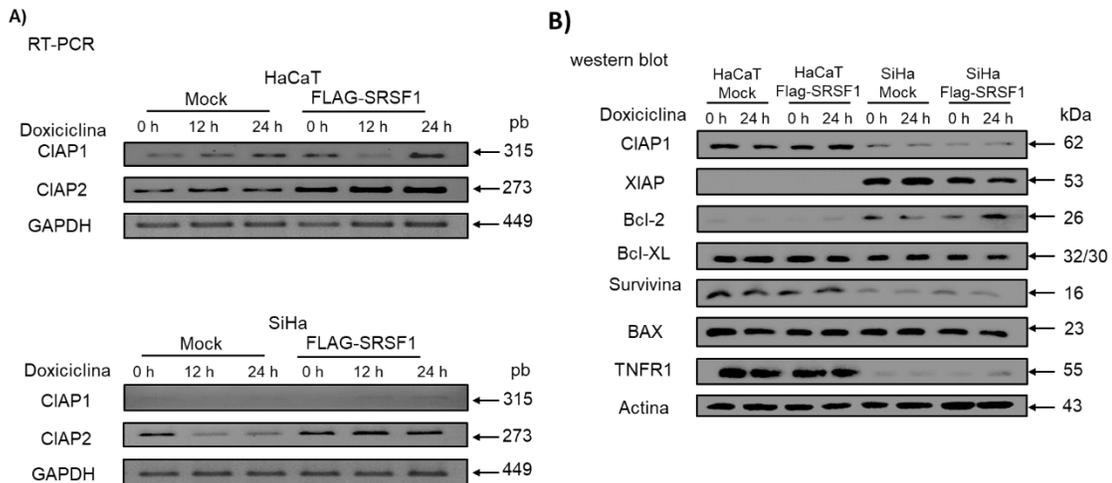


Figura 18. Alteración de la expresión de proteínas reguladoras de apoptosis en las líneas celulares transfectadas derivadas de Cáncer Cervicouterino. A) RT-PCR de CIAP1 y CIAP2 en las líneas celulares transfectadas. Se utilizó 1  $\mu$ l de cDNA de las líneas celulares. B) western blot de los niveles de proteína de algunos reguladores de apoptosis. Como control de carga se utilizó GAPDH y actina para la RT-PCR y western blot, respectivamente. Para el western blot, se utilizó una imagen representativa de control de carga.

Adicionalmente, se analizó si la sobreexpresión de SRSF1 podría afectar los niveles de transcrito y de proteína de algunas interleucinas y quimiocinas, dado que se sabe que su expresión está alterada en algunas enfermedades auto-inmunes, en las que SRSF1 se encuentra aberrantemente disminuido. Además, ratones con expresión deficiente en SRSF1 desarrollan una autoinmunidad severa y nefritis (Moulton, V. R., *et al.*, 2013; Katsuyama, T., *et al.*, 2020). También, se ha postulado que SRSF1 juega un papel importante en la activación y funciones de las células del sistema inmune. El ratón *knockout* de *SRSF1*, presenta linfocitos T CD4 con elevada expresión de IFN- $\gamma$ , y IL4 y IL-17 y linfocitos T CD8 con elevada expresión de IFN- $\gamma$ .

Interesantemente, se ha observado que la expresión de SRSF1 está disminuida en enfermedades autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico (SLE). Además, SRSF1 participa en la inflamación al interactuar con la interleucina 17 por medio de un complejo TRAF5, TRAF2 y ACT1 para estabilizar el mensajero de CXCL1 (Paz, S., *et al.*, 2021).

A nivel de proteína, se observó un incremento en p65 y RELB en la transfectante HaCaT después del tratamiento con doxiciclina (Fig 19 A) . En la figura 19B se observa los niveles de mRNA de las interleucinas analizadas y los niveles de proteína de 2 factores de la familia NF- $\kappa$ B, en donde se aprecia una ligera disminución del transcrito de TNF- $\alpha$  en la transfectante HaCaT y un incremento del mRNA de IL-8 en SiHa transfectada, después del tratamiento con doxiciclina.

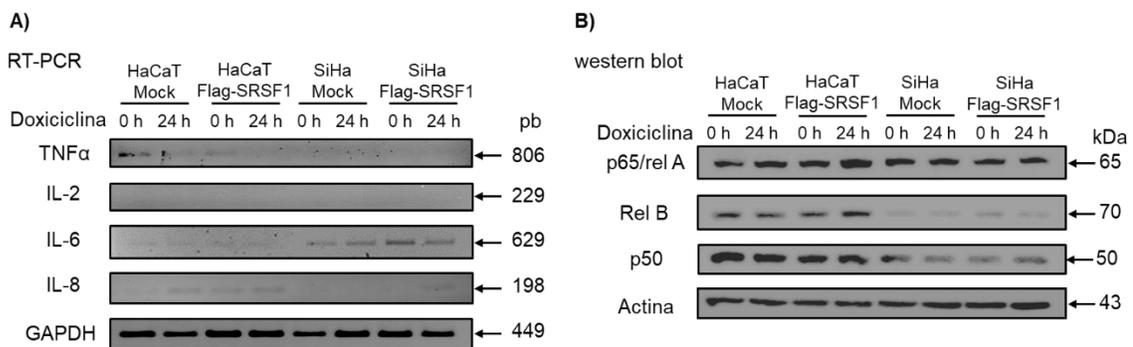


Figura 19. Alteración de los niveles de expresión de interleucinas y de reguladores de NF $\kappa$ B en las líneas celulares transfectadas derivadas de Cáncer Cervicouterino. A) RT-PCR de TNF $\alpha$ , IL2, IL6 e IL8 en las líneas celulares transfectadas. Se utilizó 1  $\mu$ l de cDNA de las líneas celulares. B) western blot de los niveles de proteína de algunos reguladores de NF $\kappa$ B. Como control de carga se utilizó GAPDH y actina para la RT-PCR y western blot, respectivamente. Para el western blot, se utilizó una imagen representativa de control de carga. Se realizaron 2 ensayos independientes (n=2).

Por último, se ha observado que SRSF1 incrementa la producción de ciertas citocinas durante la malignidad como IL-17 (Xu, B., *et al.*, 2014) y disminuye los niveles de IL-2 e IL-6 durante SLE (Moulton, V. R., *et al.*, 2013; Katsuyama, T., *et al.*, 2020; Paz, S., *et al.*, 2021). Además diferentes vías de señalización que involucran a SRSF1 en cáncer se han relacionado con la regulación de mensajeros de interleucinas (Zhao, J., *et al.*, 2021). Por ello, se

exploraron cambios en la secreción de interleucinas en el medio del cultivo de estas líneas transfectadas, después del tratamiento con doxiciclina. Como se observa en la figura 20, no se observan cambios en la secreción de TNF- $\alpha$  en HaCaT, y el resultado no es claro en SiHa. En el caso de IL-6 solo se observó incremento en el mensajero de IL-6 y de la secreción de IL-6 en la transfectante de SiHa, mientras que se observó una disminución ligera de la secreción de IL-6 en células HaCaT transfectadas. Similarmente, se observó disminución de IL-8 en células HaCaT transfectadas pero incrementó en las células SiHa transfectadas. Sin embargo, debido a los bajos niveles de transcrito de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en HaCaT (figura 19B), estos datos se deberían analizar con más experimentos, otras metodologías y a más detalle. Además, no se revisó su expresión por western blot, usando extractos celulares. Estos resultados muestran posibles diferencias en la secreción de citocinas en HaCaT y SiHa cuando sobreexpresan SRSF1.

Tabla 1. Niveles de expresión de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en las líneas celulares transfectadas derivadas de Cáncer Cervicouterino.

Línea celular	TNF- $\alpha$ (pg/ml)			IL-6 (pg/ml)			IL-8 (pg/ml)			Doxiciclina
	0h	12h	24h	0h	12h	24h	0h	12h	24h	
HaCaT TET mock	3.35	3.56	3.64	291.52	297.14	308.29	4,887.72	4,873.68	4,938.54	
HaCaT TET FLAG-SRSF1	3.50	3.68	3.74	330.67	340.39	257.052	5,058.71	5,058.71	3,055.00	
SiHa TET mock	3.56	3.70	3.74	2,100.71	2,234.30	2,514.54	338.32	326.07	288.44	
SiHa TET FLAG-SRSF1	3.82	4.05	3.68	2,606.51	4,453.25	4,990.01	229.18	337.27	363.6634	

Se observan la media aritmética de la cuantificación de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en las líneas celulares transfectadas derivadas de Cáncer Cervicouterino. Se trataron con doxiciclina por 0 h hasta 24 h. Las citocinas se expresaron en pg/mL. Se realizaron 2 experimentos independientes (n=2).

## DISCUSIÓN

El Cáncer Cervicouterino es uno de los principales cánceres en mujeres a nivel mundial que impacta en países subdesarrollados y que, a pesar de las mejoras en la detección de lesiones y genoma del VPH; recientemente, se ha observado un incremento de nuevos casos y muertes anualmente (Zhang, S., *et al.*, 2020). Los VPHs se clasifican con base en su potencial oncogénico en VPH de bajo y alto riesgo, donde el VPH16 ocupa el primer lugar en ser el tipo viral más frecuentemente detectado y ser más oncogénico. Se ha demostrado que el VPH de alto riesgo es el agente causal necesario para el desarrollo de lesiones precancerosas y el cáncer invasivo (zur Hausen, H., 2002; de Sanjosé, S., 2007; Mole S., *et al.*, 2009; Jung, H. S., *et al.*, 2015). Esto puede deberse a la capacidad que tiene el virus de integrarse al genoma celular de forma aleatoria y perder la expresión del represor E2, lo cual genera una sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7, principales protagonistas en la actividad transformante en los queratinocitos primarios. Los incrementos de niveles de E6 y E7 se han detectado en tumores de diferentes estadios de evolución y en modelos celulares. Estas oncoproteínas modifican diversas vías celulares como la estabilidad genómica, ciclo celular, inmortalización, muerte celular programada y metástasis (McLaughlin-Drubin, M. E., 2009; Howie, H. L., *et al.*, 2009; Moody, C. A., *et al.*, 2010); por lo que todo esto resalta la importancia del estudio de la regulación del virus para el desarrollo de tumores anogenitales, de cabeza y de cuello.

El *splicing* alternativo es un mecanismo altamente conservado en las células eucariotas que les permite expandir el transcriptoma y diversificar el proteoma. Los virus, en especial los VPHs, utilizan este proceso para expresar sus proteínas mediante mRNAs policistrónicos, debido al bajo potencial codificante de sus marcos de lectura en su genoma (Johansson C., & Schwartz S., 2013). Bajo este supuesto, es importante identificar los factores involucrados en la regulación de la expresión de transcritos virales de VPH16 en la célula infectada. Las proteínas que regulan el *splicing* alternativo son factores nucleares/celulares que se unen a los RNA mediante un RRM y

participan en la regulación post-transcripcional y post-traducciona de muchos mRNAs. Se han descrito dos principales familias de proteínas de unión a RNA (RBPs): las proteínas SR y las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs). Recientemente, ambas familias de proteínas se han involucrado en el desarrollo de tumores, como cáncer de mama, de pulmón, de colon y cáncer cervicouterino. La sobreexpresión de SRSF1 promueve incremento de isoformas de *splicing* de genes que regulan la transición epitelio-mesénquima (Ghigna C., *et al.*, 2005), la traducción dependiente de cap (Iborra S., *et al.*, 2013) y la evasión de apoptosis (Anczuków O, *et al.*, 2012). En cáncer cervical, se sabe que esta proteína se encuentra incrementada en tumores y se asocia a la diferenciación del queratinocito cervical normal (Fay, J., *et al.*, 2009). Sin embargo, se conoce muy poco en relación al papel del factor SRSF1 en el desarrollo de cáncer cervicouterino.

En este estudio, se analizó el efecto de la expresión exógena de la proteína SRSF1 en la línea celular HaCaT y en la línea derivada de cáncer cervical SiHa (1-2 copias de VPH16 integradas por célula). Esta última línea celular, posee una sensibilidad limitada a muerte con Cis-platino (datos no publicados) y presentan relativamente bajos niveles de proteína de SRSF1. Por lo cual, es un buen modelo de estudio incrementando la expresión de SRSF1 e investigar las consecuencias celulares de una sobreexpresión de SRSF1, y comparar con las otras 2 líneas cervicales como CaSki (500 copias integradas de VPH16) y HeLa (~600-800 copias integradas de VPH18), ambas con niveles elevados de la proteína SRSF1 y altamente malignas y resistentes a muerte celular programada (Yee, C., 1985; del Moral O., *et al.*, 2010). La sobreexpresión de SRSF1 podría ayudarnos a entender los mecanismos de resistencia a apoptosis presente en estas líneas celulares.

Inicialmente, se hizo la caracterización molecular de la proteína SRSF1 en las líneas celulares derivadas de Cáncer Cervicouterino. Se observó que los niveles de mensajero de SRSF1 no varían entre las líneas celulares; sin embargo, cuando se analizaron los niveles de proteínas, los extractos solubles

detectaban niveles bajos de proteína y esto contradecía hallazgos observados en el laboratorio. Por ello, se procedió a utilizar extractos totales de proteína preparados con amortiguador de RIPA y nos permitió detectar de mejor manera los niveles de proteína en estas líneas celulares. Esto se explica porque muchos factores de *splicing* se encuentran unidos a mRNAs que sufren *splicing* alternativo y a otras RBPs a través de su RRM formando complejos (Zhou Z., et al., 2013). Se observó que las líneas con genoma de VPH integrado presentan mayores niveles de proteína en comparación con las 2 líneas sin VPH. Similares resultados reportaron Mole, S., et al., 2009 y del Moral O., et al., 2010. Al incorporar el inhibidor de fosfatasa, se observó que en todas las líneas los niveles de proteína se incrementaban, e inclusive, presentaron un mayor peso molecular (35-37 kDa). Esto sugiere indicar la presencia de actividad de fosfatasa en los extractos proteicos, incluyendo PP2A, una de las principales fosfatasas en la célula. Esta proteína se encuentra disminuida en líneas celulares VPH16+ debido a la unión de E7 que inhibe la subunidad catalítica de PP2A (Pim, D., et al., 2005).

Fue interesante observar las diferencias en los tamaños de la proteína especialmente en estas líneas celulares. Un peso molecular mayor en SRSF1 expresa un posible estado de hiperfosforilación, principalmente en CaSki. La hiperfosforilación de SRSF1 es un mecanismo que asegura una alta actividad de la proteína en el núcleo, promoviendo el *splicing* alternativo de diversos mensajeros (Sanford, J. R., et al., 2008). Por ello, se decidió tratar con fosfatasa lambda los extractos proteicos totales de las líneas celulares HaCaT, SiHa y CaSki. Se demostró que los niveles de proteína de SRSF1 disminuían considerablemente en HaCaT y SiHa; sin embargo, los niveles de la proteína SRSF1 en CaSki disminuyeron un poco. Esto plantea una alta actividad de otras cinasas que fosforilan SRSF1 como SRPK1 y SRPK2, o bien, otras modificaciones post-traduccionales como metilación o acetilación que sufre SRSF1 durante su participación en los procesos de transcripción y *splicing* alternativo (da Silva, M. R., et al., 2015; Gout, S., et al., 2012; Gonçalves, V., et al., 2014). Es necesario llevar al cabo más experimentos para tener

información más certera de la hiperfosforilación de SRSF1 en las líneas derivadas de Cáncer Cervicouterino, e investigar sus niveles por experimentos de fraccionamiento celular, co-inmunoprecipitación o co-localización.

Por medio de inmunofluorescencia se observó que la expresión de SRSF1 en HaCaT fue baja y dada la naturaleza de esta línea celular, es de esperar que los niveles de proteína se encuentren incrementados. Sin embargo, los niveles de SRSF1 son menores, esto indica una alta regulación en HaCaT, quizás por varios mecanismos (incluyendo *splicing* alternativo para generación de isoformas cortas que se degradan, vida media del mensajero corta, etc.) (Twyffels, L., *et al.*, 2011; Wood, D. W., 2014; Sun, S., *et al.*, 2010; Tripathi, V., *et al.*, 2012). Consideramos que experimentos adicionales podrían dilucidar este resultado. Se evidenció que SRSF1 se encuentra más expresada en las líneas VPH16+, siendo mayor la expresión en la línea altamente resistente a muerte por apoptosis CaSki. Esto nos indica que SRSF1 podría jugar un papel importante en la malignidad de estas líneas celulares, como se ha reportado en cáncer de mama (Karni, R., 2007; Anczuków, O., *et al.*, 2012), cáncer de colon (Ghigna, C., *et al.*, 2005; Gonçalves, V., *et al.*, 2014), cáncer de pulmón (Gout, S., *et al.* 2012) y gliomas (Zhou, X., *et al.*, 2019). Además, se observó que la proteína SRSF1 se localiza en toda la célula, principalmente en el núcleo, donde normalmente se encuentra en los *speckles* nucleares (Sanford, J. R., *et al.*, 2008; Björk, P., *et al.*, 2009). Además, se observó que las líneas celulares VPH16+ presentan niveles de proteína mayores de SRSF1, así como con otros factores de *splicing* como SRSF2, PTB1, hnRNPA1, hnRNPA2B1 y TIAR. Se desconoce el mecanismo por el cual SRSF1 puede regular estos factores de *splicing*; al respecto, Delestienne, N., *et al.*, 2010 reportaron que SRSF1 modula la actividad de TIA-1 y TIAR a través de la unión de mRNA con elementos ricos en adenina y uridina (AREs) en los gránulos de estrés en células NIH3T3. Por lo que sería interesante conocer si la sobreexpresión de SRSF1 podría afectar los niveles de los factores de *splicing* mencionados anteriormente.

Para la sobreexpresión de SRSF1, se utilizó el plásmido pSB-TET (sistema *Sleeping Beauty*), que es un sistema que permite la incorporación de un gen de interés de forma segura, fácil y rápida a través de la expresión de una transposasa. Este sistema genera líneas celulares establemente transfectadas en 5 – 7 días (Kowarz, E., *et al*, 2015). La secuencia de FLAG se colocó en fase con el ORF de SRSF1 obtenido a partir de mRNA de HeLa, que nos permitió tener una proteína exógena que se puede diferenciar de la endógena. En otros estudios se han utilizado GFP y T7 como *tag* para la detección de SRSF1 exógeno; sin embargo, FLAG es de menor tamaño que las anteriores y sugiere que no interfiere con la forma estructural de SRSF1, con la consideración de la alta regulación que tiene la proteína en el *splicing* alternativo y sobre si misma (Wood, D. W., 2014). Previamente nuestro grupo dilucidó que al fusionarla con RFP formaba complejos multiméricos con la proteína y favorecía la muerte celular (datos no publicados). En este estudio, se encontraron mayores niveles de mensajero exógeno a las 24 h con el tratamiento con doxiciclina, mientras que los niveles de mensajero endógeno no se modificaron. El western blot evidenció altos niveles de SRSF1 a las 24 y 36 h tras el tratamiento con doxiciclina, donde se mostró un tamaño de 37 kDa de la proteína exógena. Dado que FLAG se traduce en una proteína de 1 kDa, esto también puede demostrar que se conserva la fosforilación de la nueva proteína de fusión como se presenta en la proteína endógena. Mediante inmunofluorescencia indirecta se analizó FLAG-SRSF1 que permite observar su localización y expresión con el anticuerpo FLAG y SRSF1. Se observó una alta expresión de FLAG-SRSF1 en las transfectantes tras el tratamiento con doxiciclina a las 24 h, y presentó un patrón puntiforme en el núcleo celular y expresión en el citoplasma. La proteína SRSF1 se ha encontrado principalmente en núcleo (confinado en *speckles*) y citoplasma, en base a su papel como regulador de mRNAs (Tripathi, V., *et al.*, 2012). Nuestros datos indican que el factor de *splicing* se organiza en forma puntiforme, posiblemente en cuerpos P (donde se almacenan y degradan mRNAs) y que se encuentran en cercanía con la maquinaria de traducción (ribosomas) (Anderson, P., *et al.*,

2015). Sin embargo, es necesario utilizar anticuerpos dirigidos a marcadores de estas regiones para definir su co-localización como, por ejemplo, histonas (H3, H2A) en la región de la cromatina, factores de *splicing* (SRSF2) para los *speckles* nucleares o proteínas ribosomales (S6, L7a). Con estos resultados, se demostró la sobreexpresión de SRSF1 en las líneas celulares HaCaT y SiHa establemente transfectadas, lo que nos permitió validar este sistema en una población heterogénea celular. Cabe mencionar que no se observaron cambios morfológicos en las células transfectadas. Consideramos importante realizar experimentos adicionales, como por ejemplo, ensayos de formación de colonia y/o crecimiento independiente de anclaje, mostrarían cambios en proliferación y fenotipo de transición epitelio-mesénquima (Karni R., en el 2007).

Con respecto a los niveles de transcritos de E6/E7, se observó un incremento de E6/E7<sup>pre-mRNA</sup> y E6\*I, en la línea celular SiHa transfectada con FLAG-SRSF1 con respecto al mock. Este dato resulta interesante, debido que anteriormente Rosenberger, S., *et al.*, 2010 y McFarlane, M., *et al.*, 2015, reportaron independientemente que, mediante el *knockdown* de SRSF1, no se afectaba la producción de transcritos de E6/E7. Sin embargo, el efecto que observan podría ser compensado por otros factores de *splicing*, por ejemplo, hTRA2-β1, el cual reconoce secuencias similares a SRSF1 y se ha encontrado sobreexpresado en tumores cervicales (Gabriel, B., *et al.*, 2009). Además, se ha propuesto sitios putativos de unión al bicistrón E6/E7 en el sitio acceptor A (E6\*I) y nosotros al expresar a FLAG-SRSF1 nos aseguramos que existe un incremento en la concentración del factor y esto favorezca la competencia de SRSF1 con otros factores de *splicing* por selección de elementos en el pre-mRNA del bicistrón (Singh, R., & Valcárcel, J., 2005). Por lo tanto, se sugiere que SRSF1 incrementa los niveles de transcritos de E6/E7 en la línea celular SiHa transfectada. En un futuro sería importante determinar si SRSF1 incrementa estos transcritos de forma directa o indirecta, así como si se presentan alteraciones de blancos (P53 y PRB). Sería importante validar la primera aseveración con experimentos adicionales como CLIP o RNA-seq y

con una población de transfectantes homogénea con el vector constitutivo pSB-GN. Nuestro laboratorio ha descrito el papel potencial de las isoformas como E6\*I en la resistencia a apoptosis, expresadas exógenamente en la línea celular C33-A y se continúa con el estudio de la resistencia a muerte con el uso de otras drogas como el Birinapant (del Moral O., *et al.*, 2010; Ordóñez, R. M., *et al.*, 2004; datos no publicados).

En un estudio efectuado por Sanford, J. R., *et al.*, 2008, se encontró que SRSF1 se une a una variedad de mRNAs en los compartimentos subcelulares; encontrando factores de *splicing* como hnRNP H, hnRNP E2 y SRSF11, entre otros. Sin embargo, no se validó el dato obtenido, y es de nuestro interés estudiar su regulación en presencia de VPH16. Diversos factores de *splicing* se han catalogado como proto-oncogénicos como hnRNP A1, A2/B1 y SRSF3 por estar sobreexpresados en tumores de mama, de colon, de pulmón, de hígado y gliomas, y alterar vías de señalización relacionadas con supervivencia (David, C. J., *et al.*, 2010; Venables, J. P., *et al.*, 2008; Corbo, C., *et al.*, 2013; Sánchez-Jiménez, C., & Izquierdo, J. M., 2015).

Los resultados mostraron niveles de mRNA de SRSF3 incrementados en ambas líneas celulares transfectadas con FLAG-SRSF1, tras el tratamiento con doxiciclina, mientras que se encontró un incremento de niveles de proteína de hnRNP I en ambas transfectantes y de hnRNP A2B1 en la transfectante SiHa. Estos resultados nos sugieren que la sobreexpresión de SRSF1 afecta la expresión de otros factores de *splicing*; no obstante, sería necesario llevar al cabo experimentos adicionales para determinar cómo altera la expresión de estas proteínas. Por otro lado, un factor asociado a metabolismo celular como PKM se alteró. Esto se explica por el papel de la doxiciclina en afectar proteínas relacionadas al metabolismo celular (Cortés-Cros, M., *et al.*, 2013). Otros sistemas como el pSB-GN constitutivo o pTuner podría ser más útiles para explorar el metabolismo celular.

Factores de *splicing*, como SRSF1, han jugado un papel importante en la producción de isoformas de proteínas reguladoras de apoptosis para evadir

la muerte celular en células cancerosas. Este mecanismo poco estudiado, tiene gran importancia en la acción de las drogas que se administran en los pacientes y la recurrencia del cáncer (Kędzierska, H., & Piekiełko-Witkowska, A., 2017). Por ello, analizamos la expresión de algunos reguladores de apoptosis en las líneas transfectadas con FLAG-SRSF1. Las CIAPs se han vinculado con la resistencia a muerte celular en tumores y los factores de *splicing* como SRSF2, hnRNPA1, hnRNPA2/B1 y hnRNPC1/C2 regulan la expresión y la producción de isoformas completas. Se desconoce si SRSF1 pueda impactar en la expresión de CIAP1 y CIAP2, las cuales se encuentran incrementadas en CaSki y HeLa. Se evidenció un ligero incremento de los mensajeros de CIAP1 y CIAP2 en la transfectante HaCaT después de 24 h con el tratamiento con doxiciclina. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de proteína en las líneas celulares transfectantes. Se desconoce el mecanismo por el cual SRSF1 podría incrementar el nivel de mensajero de las CIAPs. Se sabe que hnRNPA1 regula la traducción de CIAP1 a través de sus AREs en el extremo 3'-UTR (Kędzierska, H., & Piekiełko-Witkowska, A., 2017). Se observó una ligera disminución de niveles de proteína de XIAP en la transfectante SiHa, aunque consideramos que es necesario efectuar más experimentos para corroborar si otros factores reguladores de apoptosis están afectados como las caspasas.

La actividad de *splicing* de SRSF1 es esencia en las funciones del sistema inmune y cambios en la regulación de este factor pueden llevar a diferentes enfermedades autoinmunes por la alteración del *splicing* alternativo de factores apoptóticos o inmunomodulares clave (Paz, S., *et al.*, 2021). Interesantemente, se ha observado que la expresión de SRSF1 esta disminuida en enfermedades autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico (SLE); SRSF1 es necesario para la función y homeostasis de las células T reguladoras (Tregs), su deficiencia genera problemas de autoinmunidad, incrementa de la actividad de la vía mTOR y, por lo tanto, altera la expresión de algunos inmunomoduladores que regulan la expresión de INF- $\gamma$ , IL-17 y por lo tanto la expresión de otras citocinas y sus transductores. Por ejemplo, en

SLE los niveles bajos de SRSF1 ocasionan disminución de expresión de IL-2 y TNF- $\alpha$  (Moulton, V. R., *et al.*, 2015; Katsuyama, T., *et al.*, 2020). En células T se ha observado que SRSF1 modula la actividad de algunas interleucinas como IL-2 e IL-17 (Moulton, V. R., *et al.*, 2013; Paz, S., *et al.*, 2021). Por último, dado los cambios en los mensajes de algunos factores reguladores de apoptosis y que interesantemente, se observó un incremento en P65 y RELB en las células HaCaT transfectadas, se decidió explorar los niveles de mensajero y de proteína de algunas interleucinas relacionadas con la vía NF- $\kappa$ B y apoptosis, como son TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8. Mediante RT-PCR se observó una disminución del mensajero de TNF- $\alpha$  en la transfectante HaCaT y un incremento de IL-8 en la transfectante SiHa tras el tratamiento con doxiciclina. Para profundizar nuestros datos, se llevó al cabo el ensayo de inmunoabsorbencia ligada a enzima para TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en sobrenadantes de cultivo de las células transfectadas. Se observó un incremento de TNF- $\alpha$  en las transfectantes HaCaT y SiHa, y una disminución en IL-6 e IL-8 en la transfectante HaCaT tras el tratamiento con doxiciclina; sin embargo, los resultados no fueron significativos y es necesario llevar al cabo experimentos más detallados, por ejemplo, curvas dosis respuesta con el tratamiento con doxiciclina, y análisis western blot, para explorar la posibilidad de que los cambios pueden ser más claros en la expresión que en la secreción.

Las diferencias observadas entre las transfectantes HaCaT y SiHa en los experimentos efectuados demostraron que ambas líneas celulares sufrieron cambios en la expresión de algunos factores estudiados. Es claro denotar que algunos cambios no ocurren en las líneas normales y ocurren en la línea derivada de tumor o viceversa, lo que requiere un análisis más detallado. En la línea celular HaCaT, tras la sobreexpresión de SRSF1, se observó incrementos de mensajero y de proteína en varios factores de *splicing*, de apoptosis y algunos involucrados en la vía NF- $\kappa$ B, así como la disminución de algunas interleucinas. Este hallazgo nos sugiere que en las células HaCaT, al sobreexpresar SRSF1, podría simular un proceso de desarrollo tumoral al verse incrementados los niveles de factores de *splicing* involucrados en

proliferación y metástasis como SRSF3 y hnRNP I (PTB1), producción de isoformas de hnRNPA1, resistencia a apoptosis con los factores CIAP1 y CIAP2 y alteraciones en la vía NF- $\kappa$ B, como el factor P65. Interesantemente, estos factores se encuentran desregulados en las líneas celulares VPH16+, principalmente CaSki, sería importante continuar estudiando el efecto de SRSF1 en HaCaT y compararlo con HaCaT transfectada con E6/E7. Por otra parte, en SiHa se observó un incremento en los niveles de mensajero de E6/E7<sup>pre-mRNA</sup> y E6\*1/E7, y en nuestro laboratorio hemos observado que la primera es la principal fuente de producción de la oncoproteína E7 y la segunda isoforma tiene un papel importante en la resistencia a Cis-platino en CaSki (del Moral O., *et al.*, 2010; Vaisman, C. E., *et al.*, 2018). Este dato debe explorarse más adelante, para conocer el papel de SRSF1 en la producción de las isoformas del bicistrón E6/E7; otros estudios no mostraron diferencias en la regulación del *splicing* del bicistrón E6/E7 por SRSF1 (Mole, S., *et al.*, 2009; McFarlane, M., *et al.*, 2015), pero no se ha investigado su efecto en la estabilidad de los mensajeros de E6/E7. Utilizando la línea celular HaCaT, podríamos tener un acercamiento importante en relación con el inicio de los mecanismos que llevan riesgo inducido por el bicistrón E6/E7 a la malignidad, y la regulación del transcrito bicistrónico de E6/E7 a nivel de *splicing* o de estabilidad por SRSF1. En la transfectante SiHa también se observaron incrementos de algunos factores de *splicing* como SRSF3, hnRNP A1, hnRNP A2B1, hnRNP I (PTB1) e incremento de secreción de IL-8 e IL-6, esto podría darnos un indicio de mecanismos de aumento en supervivencia o resistencia a la muerte al compararla con la línea celular CaSki. Sin embargo, se requieren estudios adicionales de resistencia al Cis-platino para llegar a conclusiones respecto al tema.

En resumen, la sobreexpresión de FLAG-SRSF1 en la línea celular transfectada SiHa incrementa los niveles de algunos transcritos de E6/E7 de VPH16 y de los factores de *splicing* SRSF3 y PTB1, se observó un incremento de nivel de mensajero de CIAP1 y CIAP2 en la transfectante HaCaT después del tratamiento con doxiciclina. Todo esto nos sugiere que en el desarrollo de

cáncer cervicouterino, la proteína SRSF1 es un factor importante en la regulación de los transcritos de VPH16.

## **CONCLUSIÓN**

Se estableció un modelo de sobreexpresión inducible del factor de *splicing* SRSF1 en líneas celulares HaCaT y SiHa. La sobreexpresión de SRSF1 en la línea celular SiHa transfectada incrementa los niveles de mRNA de E6/E7<sup>pre-mRNA</sup> y E6\*I. La sobreexpresión de SRSF1 altera los niveles de mRNA y de proteína de factores de *splicing* y reguladores de apoptosis en las líneas celulares transfectadas HaCaT y SiHa.

## PERSPECTIVAS

- Analizar el papel de SRSF1 en la estabilidad de los niveles de transcritos de E6/E7 mediante un ensayo de actinomicina D, es decir, determinando su vida media.
- Determinar si SRSF1 se encuentra unido a los transcritos de E6/E7 mediante los ensayos de CLIP o RIP.
- Analizar otros reguladores de la apoptosis y componentes de la vía NFκB (tanto por RT-PCR y western blot) en las transfectantes.
- Llevar a cabo la RT-PCR, ELISA y WB para TNFα, IL-2, IL-6 y IL-10 a diferentes tiempos de inducción con doxociclina.
- Secuenciación del RNA de las líneas transfectantes.
- Insertar FLAG-SRSF1 en pTurner (vector de expresión controlada) para analizar otros mecanismos donde SRSF1 tenga un papel importante, como ciclo celular y metástasis.
- Generar transfectantes establemente transfectadas con el plásmido constitutivo pSB-GN para conocer alteraciones en el metabolismo celular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, J.M., Cory, S. (1998) The BCL-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*, 281, 1322–1326.
2. Aenkoe, M. L. (2014). Regulation of gene expression programmes by serine–arginine rich splicing factors. *In Seminars in cell & developmental biology*, 32: 11-21.
3. Anczuków, O., Rosenberg, A. Z., Akerman, M., Das, S., Zhan, L., Karni, R., *et al.*, & Krainer, A. R. (2012). The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nature structural & molecular biology*, 19(2), 220-228.
4. Anczuków, O., Akerman, M., Cléry, A., Wu, J., Shen, C., Shirole, N. H., *et al.*, & Allain, F. H. T. (2015). SRSF1-regulated alternative splicing in breast cancer. *Molecular cell*, 60(1), 105-117.
5. Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1305- 1308.
6. Aubol, B. E., Plocinik, R. M., Hagopian, J. C., Ma, C. T., McGlone, M. L., Bandyopadhyay, R., *et al.*, Adams, J. A. (2013). Partitioning RS domain phosphorylation in an SR protein through the CLK and SRPK protein kinases. *Journal of molecular biology*, 425(16), 2894-2909.
7. Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V. A. L. E. R. I. E., Braun, M. J., Gonda, M. A., & Howley, P. M. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *Journal of virology*, 61(4), 962-971.
8. Bernard, H. U. (2002). Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antiviral therapy*, 7(4), 219-237.
9. Björk, P., Jin, S., Zhao, J., Singh, O. P., Persson, J. O., Hellman, U., & Wieslander, L. (2009). Specific combinations of SR proteins associate with single pre-messenger RNAs in vivo and contribute different functions. *The Journal of cell biology*, 184(4), 555-568.
10. Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual review of biochemistry*, 72(1), 291-336.
11. Blencowe, B. J. (2000) Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends in biochemical sciences*, 25(3), 106-110.
12. Chang, Y., Wu, Q., Tian, T., Li, L., Guo, X., Feng, Z., Zhou, J., Zhang, L., Zhou, S., Feng, G., Han, F., Yang, J., & Huang, F. (2015). The influence of SRPK1 on glioma apoptosis, metastasis, and angiogenesis through the PI3K/Akt signaling pathway under normoxia. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(8), 6083–6093. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3289-2>
13. Chinnaiyan, A. M. (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, 1(1), 5-15.
14. Chow, L. T., Broker, T. R., & Steinberg, B. M. (2010). The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *Apmis*, 118(6 - 7), 422-449.

15. Corbo, C., Orrù, S., & Salvatore, F. (2013). SRp20: an overview of its role in human diseases. *Biochemical and biophysical research communications*, 436(1), 1-5.
16. Cortés-Cros, M., Hemmerlin, C., Ferretti, S., Zhang, J., Gounarides, J. S., Yin, H., Muller, A., Haberkorn, A., Chene, P., Sellers, W. R., & Hofmann, F. (2013). M2 isoform of pyruvate kinase is dispensable for tumor maintenance and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2), 489–494. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212780110>
17. Creagh, E. M. (2014). Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways. *Trends in immunology*, 35(12), 631-640.
18. da Silva, M. R., Moreira, G. A., Gonçalves da Silva, R. A., de Almeida Alves Barbosa, É., *et al.*, & Bressan, G. C. (2015). Splicing regulators and their roles in cancer biology and therapy. *BioMed research international*, ID:150514, pp. 1-12.
19. Das, S., & Krainer, A. R. (2014). Emerging functions of SRSF1, splicing factor and oncoprotein, in RNA metabolism and cancer. *Molecular Cancer Research*, molcanres-0131.
20. Das, S., Anczuków, O., Akerman, M., & Krainer, A. R. (2012). Oncogenic splicing factor SRSF1 is a critical transcriptional target of MYC. *Cell reports*, 1(2), 110-117.
21. de Sanjosé, S., Diaz, M., Castellsagué, X., Clifford, G., Bruni, L., Muñoz, N., & Bosch, F. X. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*, 7(7), 453-459.
22. del Moral-Hernández, O., López-Urrutia, E., Bonilla-Moreno, R., Martínez-Salazar, M., Arechaga-Ocampo, E., Berumen, J., & Villegas-Sepúlveda, N. (2010). The HPV-16 E7 oncoprotein is expressed mainly from the unspliced E6/E7 transcript in cervical carcinoma C33 A cells. *Archives of virology*, 155 (12), 1959-1970.
23. Delestienne, N., Wauquier, C., Soin, R., Dierick, J.-F., Gueydan, C., & Krays, V. (2010). The splicing factor ASF/SF2 is associated with TIA-1-related/TIA-1-containing ribonucleoproteic complexes and contributes to post-transcriptional repression of gene expression: ASF/SF2 in TIAR-mediated regulatory pathways. *The FEBS Journal*, 277(11), 2496–2514. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07664.x>
24. Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology*, 32, 7-15.
25. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
26. Fay, J., Kelehan, P., Lambkin, H., & Schwartz, S. (2009). Increased expression of cellular RNA - binding proteins in HPV - induced neoplasia and cervical cancer. *Journal of medical virology*, 81(5), 897-907.
27. Fernald, K., & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in cell biology*, 23(12), 620-633.

28. Fernandes, J. V. & Araújo, T. A. (2012). *Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis, Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - A Clinical Perspective*, Dr. Davy Vanden Broeck (Ed.), ISBN: 978-953-307-860-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/human-papillomavirus-and-relateddiseases-from-bench-to-bedside-a-clinical-perspective/humanpapillomavirus-biology-and-pathogenesis>
29. Flores, I., Murphy, D. J., Swigart, L. B., Knies, U., & Evan, G. I. (2004). Defining the temporal requirements for Myc in the progression and maintenance of skin neoplasia. *Oncogene*, 23(35), 5923–5930. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207796>
30. Francis, D. A., Schmid, S. I., & Howley, P. M. (2000). Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *Journal of virology*, 74(6), 2679-2686.
31. Gautrey, H. L., & Tyson-Capper, A. J. (2012). Regulation of Mcl-1 by SRSF1 and SRSF5 in cancer cells. *PloS One*, 7(12), e51497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051497>
32. Ghigna, C., Giordano, S., Shen, H., Benvenuto, F., Castiglioni, F., Comoglio, P. M., *et al.*, & Biamonti, G. (2005). Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Molecular cell*, 20(6), 881-890.
33. Graham, S. V. (2008). Papillomavirus 3'UTR regulatory elements. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13, 5646-5663.
34. Gonçalves, V., Henriques, A. F. A., Pereira, J. F. S., Neves Costa, A., Moyer, M. P., Moita, L. F., Gama-Carvalho, M., Matos, P., & Jordan, P. (2014). Phosphorylation of SRSF1 by SRPK1 regulates alternative splicing of tumor-related Rac1b in colorectal cells. *RNA (New York, N.Y.)*, 20(4), 474–482. <https://doi.org/10.1261/rna.041376.113>
35. Gout, S., Brambilla, E., Boudria, A., Drissi, R., Lantuejoul, S., Gazzeri, S., & Eymin, B. (2012). Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma. *PloS One*, 7(10), e46539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046539>
36. He, X., Arslan, A. D., Pool, M. D., Ho, T. T., Darcy, K. M., Coon, J. S., & Beck, W. T. (2011). Knockdown of splicing factor SRp20 causes apoptosis in ovarian cancer cells and its expression is associated with malignancy of epithelial ovarian cancer. *Oncogene*, 30(3), 356.
37. Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M., & Martin, S. J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native APAF - 1 apoptosomes. *The EMBO journal*, 23(10), 2134-2145.
38. Howard, J. M., & Sanford, J. R. (2015). The RNAissance family: SR proteins as multifaceted regulators of gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 6(1), 93-110.
39. Howie, H. L., Katzenellenbogen, R. A., & Galloway, D. A. (2009). Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, 384(2), 324-334.

40. Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G., & Goeddel, D. V. (1996). TRADD–TRAF2 and TRADD–FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, *84*(2), 299-308.
41. Huibregtse, J. M., Scheffner, M., & Howley, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of P53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *The EMBO journal*, *10*(13), 4129.
42. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. (2007) *Human Papillomaviruses*. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 90.) Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK321760/>
43. Iborra, S., Hirschfeld, M., Jaeger, M., zur Hausen, A., Braicu, I., Sehouli, J., et al., & Stickeler, E. (2013). Alterations in expression pattern of splicing factors in epithelial ovarian cancer and its clinical impact. *International Journal of Gynecological Cancer*, *23*(6), 990-996.
44. Jang, H. N., Lee, M., Loh, T. J., Choi, S. W., Oh, H. K., Moon, H., et al., Park, D. (2014). Exon 9 skipping of apoptotic caspase-2 pre-mRNA is promoted by SRSF3 through interaction with exon 8. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, *1839*(1), 25-32.
45. Johansson, C., & Schwartz, S. (2013). Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nature reviews. Microbiology*, *11*(4), 239.
46. Juan, W. C., Roca, X., & Ong, S. T. (2014). Identification of cis-acting elements and splicing factors involved in the regulation of BIM Pre-mRNA splicing. *PLoS One*, *9*(4), e95210.
47. Jung, H. S., Rajasekaran, N., Song, S. Y., Kim, Y. D., Hong, S., Choi, H. J., ... & Shin, Y. K. (2015). Human papillomavirus E6/E7-specific siRNA potentiates the effect of radiotherapy for cervical cancer in vitro and in vivo. *International journal of molecular sciences*, *16*(6), 12243-12260.
48. Kajitani, N., & Schwartz, S. (2015). RNA binding proteins that control human papillomavirus gene expression. *Biomolecules*, *5*(2), 758-774.
49. Karni, R., de Stanchina, E., Lowe, S. W., Sinha, R., Mu, D., & Krainer, A. R. (2007). The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nature Structural & Molecular Biology*, *14*(3), 185–193. <https://doi.org/10.1038/nsmb1209>
50. Katsuyama, T., Martin-Delgado, I. J., Krishfield, S. M., Kyttaris, V. C., & Moulton, V. R. (2020). Splicing factor SRSF1 controls T cell homeostasis and its decreased levels are linked to lymphopenia in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford, England)*, *59*(8), 2146–2155. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keaa094>
51. Kędzierska, H., & Piekietko-Witkowska, A. (2017). Splicing factors of SR and hnRNP families as regulators of apoptosis in cancer. *Cancer Letters*, *396*: 53-65.
52. Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity - dependent APO - 1

- (Fas/CD95) - associated proteins form a death - inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal*, 14(22), 5579-5588.
53. Kowarz, E., Löscher, D., & Marschalek, R. (2015). Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines. *Biotechnology Journal*, 10(4), 647–653. <https://doi.org/10.1002/biot.201400821>
  54. Li, L. Y., Luo, X., & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412(6842), 95.
  55. Li, X., Wang, J., & Manley, J. L. (2005). Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation. *Genes & development*, 19(22), 2705-2714.
  56. Liu, H. X., Zhang, M., & Krainer, A. R. (1998). Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes & development*, 12(13).
  57. Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487-501.
  58. López-Urrutia, E., Valdés, J., Bonilla-Moreno, R., Martínez-Salazar, M., Martínez-García, M., Berumen, J., & Villegas-Sepúlveda, N. (2012). A few nucleotide polymorphisms are sufficient to recruit nuclear factors differentially to the intron 1 of HPV-16 intratypic variants. *Virus research*, 166(1), 43-53.
  59. Lowy, D. R. (2016) HPV vaccination to prevent cervical cancer and other HPV-associated disease: from basic science to effective interventions. *The Journal of clinical investigation*, 126(1), 5-11.
  60. Martínez-Salazar, M., López-Urrutia, E., Arechaga-Ocampo, E., et al. (2014). Biochemical and proteomic analysis of spliceosome factors interacting with intron-1 of human papillomavirus type-16. *Journal of proteomics*, 111, 184-197.
  61. Maslon, M. M., Heras, S. R., Bellora, N., Eyra, E., & Cáceres, J. F. (2014). The translational landscape of the splicing factor SRSF1 and its role in mitosis. *Elife*, 3, e02028.
  62. Matlin, A. J., Clark, F., & Smith, C. W. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(5), 386-398.
  63. McFarlane, M., MacDonald, A. I., Stevenson, A., & Graham, S. V. (2015). Human papillomavirus 16 oncoprotein expression is controlled by the cellular splicing factor SRSF2 (SC35). *Journal of virology*, 89(10), 5276-5287.
  64. McLaughlin-Drubin, M. E., & Münger, K. (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, 384(2), 335-344.
  65. Misteli, T., Cáceres, J. F., Clement, J. Q., Krainer, A. R., Wilkinson, M. F., & Spector, D. L. (1998). Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo. *The Journal of cell biology*, 143(2), 297-307.

66. Mo, S., Ji, X., & Fu, X.-D. (2013). Unique role of SRSF2 in transcription activation and diverse functions of the SR and hnRNP proteins in gene expression regulation. *Transcription*, 4(5), 251–259. <https://doi.org/10.4161/trns.26932>
67. Mole, S., Milligan, S. G., & Graham, S. V. (2009). Human papillomavirus type 16 E2 protein transcriptionally activates the promoter of a key cellular splicing factor, SF2/ASF. *Journal of virology*, 83(1), 357-367.
68. Monroy, F. (n.d.). RIPA Buffer Protocol. Northern Arizona University. Recuperado de: <http://www2.nau.edu/fpm/documents/RIPAbuffer.pdf>.
69. Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10(8), 550-560.
70. Moulton, V. R., Gillooly, A. R., Perl, M. A., Markopoulou, A., & Tsokos, G. C. (2015). Serine arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1) contributes to the transcriptional activation of CD3 $\zeta$  in human T cells. *PLoS One*, 10(7), e0131073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131073>
71. Moulton, V. R., Grammatikos, A. P., Fitzgerald, L. M., & Tsokos, G. C. (2013). Splicing factor SF2/ASF rescues IL-2 production in T cells from systemic lupus erythematosus patients by activating IL-2 transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(5), 1845–1850. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214207110>
72. Ordóñez, R. M., Espinosa, A. M., Sánchez-González, D. J., Armendáriz-Borunda, J., & Berumen, J. (2004). Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *Journal of general virology*, 85(6), 1433-1444.
73. Pandit, S., Zhou, Y., Shiue, L., Coutinho-Mansfield, G., Li, H., Qiu, J., et al., & Fu, X. D. (2013). Genome-wide analysis reveals SR protein cooperation and competition in regulated splicing. *Molecular cell*, 50(2), 223-235.
74. Parrish, A. B., Freel, C. D., & Kornbluth, S. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6), a008672.
75. Paz, S., Ritchie, A., Mauer, C., & Caputi, M. (2021). The RNA binding protein SRSF1 is a master switch of gene expression and regulation in the immune system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 57, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.10.008>
76. Pelengaris, S., Rudolph, B., & Littlewood, T. (2000). Action of Myc in vivo - proliferation and apoptosis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(1), 100–105. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(99\)00046-5](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(99)00046-5)
77. Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448.
78. Pim, D., Massimi, P., Dilworth, S. M., & Banks, L. (2005). Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A. *Oncogene*, 24(53), 7830–7838. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208935>

79. Pop, C., & Salvesen, G. S. (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 21777-21781.
80. Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., & Greenwood, M. T. (2011). Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(1), 238-259.
81. Risso, G., Pelisch, F., Quaglino, A., Pozzi, B., & Srebrow, A. (2012). Regulating the regulators: Serine/arginine - rich proteins under scrutiny. *IUBMB life*, 64(10), 809-816.
82. Roman, A., & Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, 445(1-2), 138-168.
83. Rosenberger, S., Arce, J. D. C., Langbein, L., Steenbergen, R. D., & Rösl, F. (2010). Alternative splicing of human papillomavirus type-16 E6/E6\* early mRNA is coupled to EGF signaling via Erk1/2 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 7006-7011.
84. Rush M., Zhao X., Schwartz S. (2005). A splicing enhancer in the E4 coding region of human papillomavirus type 16 is required for early mRNA splicing and polyadenylation as well as inhibition of premature late gene expression. *Journal of Virology*, 79(18), 12002–12015.
85. Saelens, X., Festjens, N., Walle, L. V., Van Gorp, M., van Loo, G., & Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23(16), 2861.
86. Sanford, J. R., Coutinho, P., Hackett, J. A., Wang, X., Ranahan, W., & Caceres, J. F. (2008). Identification of nuclear and cytoplasmic mRNA targets for the shuttling protein SF2/ASF. *PLoS One*, 3(10), e3369.
87. Saraiya M, et al. (2015) US assessment of HPV types in cancers: implications for current and 9-valent HPV vaccines. *J Natl Cancer Inst*, 107(6):086.
88. Schiffman M, Wentzensen N. (2013) Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 22(4):553–560.
89. Schwartz, S. (2013). Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology*, 445(1-2), 187-196.
90. Sinclair, C. S., Rowley, M., Naderi, A., & Couch, F. J. (2003). The 17q23 amplicon and breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 78(3), 313-322.
91. Sinha, R., Allemand, E., Zhang, Z., Karni, R., Myers, M. P., & Krainer, A. R. (2010). Arginine methylation controls the subcellular localization and functions of the oncoprotein splicing factor SF2/ASF. *Molecular and Cellular Biology*, 30(11), 2762–2774. <https://doi.org/10.1128/mcb.01270-09>
92. Somberg, M., & Schwartz, S. (2010). Multiple ASF/SF2 sites in the human papillomavirus type 16 (HPV-16) E4-coding region promote splicing to the most commonly used 3' -splice site on the HPV-16 genome. *Journal of virology*, 84(16), 8219-8230.
93. Sun, S., Zhang, Z., Sinha, R., Karni, R., & Krainer, A. R. (2010). SF2/ASF autoregulation involves multiple layers of post-transcriptional and translational control. *Nature structural & molecular biology*, 17(3), 306-312.

94. Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., ... & Brothers, G. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 192(4), 571-580.
95. Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(3), 231.
96. Tommasino, M. (2014). The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *In Seminars in cancer biology Academic Press*, 26: 13-21.
97. Tripathi, V., Song, D. Y., Zong, X., Shevtsov, S. P., Hearn, S., Fu, X. D., et al., & Prasanth, K. V. (2012). SRSF1 regulates the assembly of pre-mRNA processing factors in nuclear speckles. *Molecular biology of the cell*, 23(18), 3694-3706.
98. Valacca, C., Bonomi, S., Buratti, E., Pedrotti, S., Baralle, F. E., Sette, C., Ghigna, C., & Biamonti, G. (2010). Sam68 regulates EMT through alternative splicing-activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene. *The Journal of Cell Biology*, 191(1), 87–99. <https://doi.org/10.1083/jcb.201001073>
99. Vaisman, C. E., Del Moral-Hernandez, O., Moreno-Campuzano, S., Aréchaga-Ocampo, E., Bonilla-Moreno, R., Garcia-Aguiar, I., Cedillo-Barron, L., Berumen, J., Nava, P., & Villegas-Sepúlveda, N. (2018). C33-A cells transfected with E6\*I or E6\*II the short forms of HPV-16 E6, displayed opposite effects on cisplatin-induced apoptosis. *Virus Research*, 247, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.02.009>
100. Venables, J. P., Koh, C. S., Froehlich, U., Lapointe, E., Couture, S., Inkel, L., et al., & Lucier, J. F. (2008). Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins. *Molecular and cellular biology*, 28(19), 6033-6043.
101. Vicencio, J. M., Galluzzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., Criollo, A., Tasmemir, E., et al., & Kroemer, G. (2008). Senescence, apoptosis or autophagy?. *Gerontology*, 54(2), 92-99.
102. Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 296(5573), 1635-1636.
103. Wagner, R. E., & Frye, M. (2021). Noncanonical functions of the serine-arginine-rich splicing factor (SR) family of proteins in development and disease. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 43(4), e2000242. <https://doi.org/10.1002/bies.202000242>
104. Wood, D. W. (2014). New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification. *Current Opinion in Structural Biology*, 26, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.04.006>
105. Xiao, Z., Ko, H. L., Goh, E. H., Wang, B., & Ren, E. C. (2013). hnRNP K suppresses apoptosis independent of P53 status by maintaining high levels of endogenous caspase inhibitors. *Carcinogenesis*, 34(7), 1458-1467.
106. Xu, B., Guenther, J. F., Pociask, D. A., Wang, Y., Kolls, J. K., You, Z., Chandrasekar, B., Shan, B., Sullivan, D. E., & Morris, G. F. (2014). Promotion of lung tumor growth by interleukin-17. *American Journal of*

- Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 307(6), L497-508.  
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00125.2014>
107. Xu, L., Zhu, J., Hu, X., Zhu, H., Kim, H. T., LaBaer, J., ... & Yuan, J. (2007). c-IAP1 cooperates with Myc by acting as a ubiquitin ligase for Mad1. *Molecular cell*, 28(5), 914-922.
  108. Xu, X., Yang, D., Ding, J.H., Wang, W., Chu, P.H., Dalton, N.D., Wang, H.Y., Bermingham, J.R., Jr., Ye, Z., Liu, F., et al. (2005). ASF/SF2-regulated CaMKII $\delta$  alternative splicing temporally reprograms excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Cell*, 120, 59–72.
  109. Yee, C., Krishnan-Hewlett, I. N. D. I. R. A., Baker, C. C., Schlegel, R., & Howley, P. M. (1985). Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *The American journal of pathology*, 119(3), 361.
  110. Yip, K.W., Reed, J.C. (2008) BCL-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 27, 6398–6406.
  111. Zahler, A. M., Lane, W. S., Stolk, J. A., & Roth, M. B. (1992). SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes & development*, 6(5), 837-847.
  112. Zhang, S., Xu, H., Zhang, L., & Qiao, Y. (2020). Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. *Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu [Chinese Journal of Cancer Research]*, 32(6), 720–728. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.05>
  113. Zhao, J., Jiang, Y., Zhang, H., Zhou, J., Chen, L., Li, H., Xu, J., Zhang, G., & Jing, Z. (2021). The SRSF1/circATP5B/miR-185-5p/HOXB5 feedback loop regulates the proliferation of glioma stem cells via the IL6-mediated JAK2/STAT3 signaling pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 40(1), 134. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01931-9>
  114. Zhou, X., Li, X., Yu, L., Wang, R., Hua, D., Shi, C., Sun, C., Luo, W., Rao, C., Jiang, Z., Wang, Q., & Yu, S. (2019). The RNA-binding protein SRSF1 is a key cell cycle regulator via stabilizing NEAT1 in glioma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 113, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.06.003>
  115. Zhou, Z., & Fu, X. D. (2013). Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma*, 122(3), 191-207.
  116. zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews cancer*, 2(5), 342.

## ANEXOS

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados durante el proyecto de doctorado

Gen	Tamaño (pb)	Secuencia	Producto (pb)
SRSF1 Fw SRSF1 Rv	27 31	AAGCTTATGTCGGGAGGTGGTGTGATT GGATCCCGTGTACGAGAGCGAGATCTGCTAT	758
E6beginFw E7endRv	27 21	CCACCATGCACCAAAAGAGAAGTCAA TGGTTTCTGAGAACAGATGGG	Full: 776 E6*I: 592 E6*II: 475 E6^E7: 270
SRSF1Hind SRSF1XhoI	27 30	AAGCTTATGTCGGGAGGTGGTGTGATT CTCGAGTTATGTACGAGAGCGAGATCTGCT	760
Sfil-FLAG FW SRSF1-Sfil RV	37 37	GGCCTCTGAGGCCATGGATTACAAGGATGACGACGAT GGCCTGACAGGCCATTATGTACGAGAGCGAGATCTGCT	780
FLAG-ORF-Fw ASF-ORF-Rv	24 24	CCATGGATTACAAGGATGACGACG GACGGTACCCATCGTAATCATAGC	250
SF2/ASF Fw ASF-UTR3 Rv	25 26	TCGATCTCGAAGCCGTAGTCGTAGC GGGAATGTAGATGTTAGGAGCAAGGG	320
SRSF3 Fw SRSF3 Rv	24 24	ATGGCAACAAGACGGAATTGGAAC CATTTCGACAGTTCCTACTTTACAC	189
hnRNPA1 Fw hnRNPA1 Rv	23 22	TGGTGGTGGATATGGTGGCAGTG GAACCGCCATAGCCACCTTGGT	225
hnRNPA2B1 Fw hnRNPA2B1 Rv	24 24	AAATCGGGCTGAAGCGACTGAGTC GCAGGATCCCTCATTACCACACAG	162
hnRNPI Fw hnRNPI Rv	26 20	GTTTCCCTCCACCTTTGCCATTCCA GCTTTGGGGTGTGACTCTCT	203
PKM Fw PKM Rv	20 20	CTGAAGGCAGTGATGTGGCC ACCCGGAGGTCCACGTCCTC	442
CIAP1 Fw CIAP1 Rv	25 27	ATGCACAAAAGTGCCTCCCAAAGAC CTGTTTATGCTTTTGAATAGGACTGTC	315
CIAP2 Fw CIAP2 Rv	26 26	ATGAACATAGTAGAAAACAGCATATT AGGATACAACTTTTTATGCTTTTCAG	273
TNF $\alpha$ Fw TNF $\alpha$ Rv	23 24	CAACCTCCTCTGCCATCAAGA AGACTCGGCAAAGTCGAGATAGTC	169
IL-2 Fw IL-2 Rv	27 24	GAATGGAATTAATAATTACAAGAATCC TGTTTCAGATCCCTTTAGTTCCAG	229
IL-6 Fw IL-6 Rv	23 22	ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG	628
IL-8 Fw IL-8 Rv	25 24	TGATTTCTGCAGCTCTGTGTGAAGG TCCAGACAGAGCTCTCTCCATCA	196
GAPDH Fw GAPDH Rv	21 21	GACCCCTTCATTGACCTCAAC GTGGCAGTGATGGCATGGACT	449

Tabla 3. Anticuerpos utilizados durante el proyecto de doctorado

Anticuerpo	Marca	Dilución
SRSF1 (32-4500)	Thermo Scientific (Life Technologies)	1:1000
SRSF2 (PA5-12402)	Thermo Scientific	1:1000
SRSF3 (7B4) sc-13510	Santa Cruz	1:250
SRPK1 (EE-13) sc-100443	Santa Cruz	1:200
hnRNP A1 (4B10) sc-32301	Santa Cruz	1:10,000
hnRNP A2B1 (B-7) sc-374053	Santa Cruz	1:500
hnRNP I (PTB1) (32-4800)	Zymed	1:1000
TIA-1 (G-3) sc-166247	Santa Cruz	1:250
TIAR (C-18) sc-1749	Santa Cruz	1:250
C-MYC (9E10) sc-40	Santa Cruz	1:100
GFP (600-101-215)	Rockland	1:1000
FLAG (F1804-200UG)	Sigma-Aldrich	1:1000
CIAP1 (D5G9) 7065	Cell Signalling	1:1000
XIAP (2042)	Cell Signalling	1:1000
BCL-2 (C-2) sc-7382	Santa Cruz	1:100
BCL-XL (2764)	Cell Signalling	1:1000
SURVIVINA (71G4B7) 2808	Cell Signalling	1:1000
BAX (B-9) sc-7480	Santa Cruz	1:100
TNFR1 (C25C1) 3736	Cell Signalling	1:1000
P65/REL A (100-4165)	Rockland	1:1000
REL B (C1E4) 4922	Cell Signalling	1:1000
NF- $\kappa$ B p105/p50 (3035)	Cell Signalling	1:1000
ACTINA (C-2) sc-8432	Santa Cruz	1:250

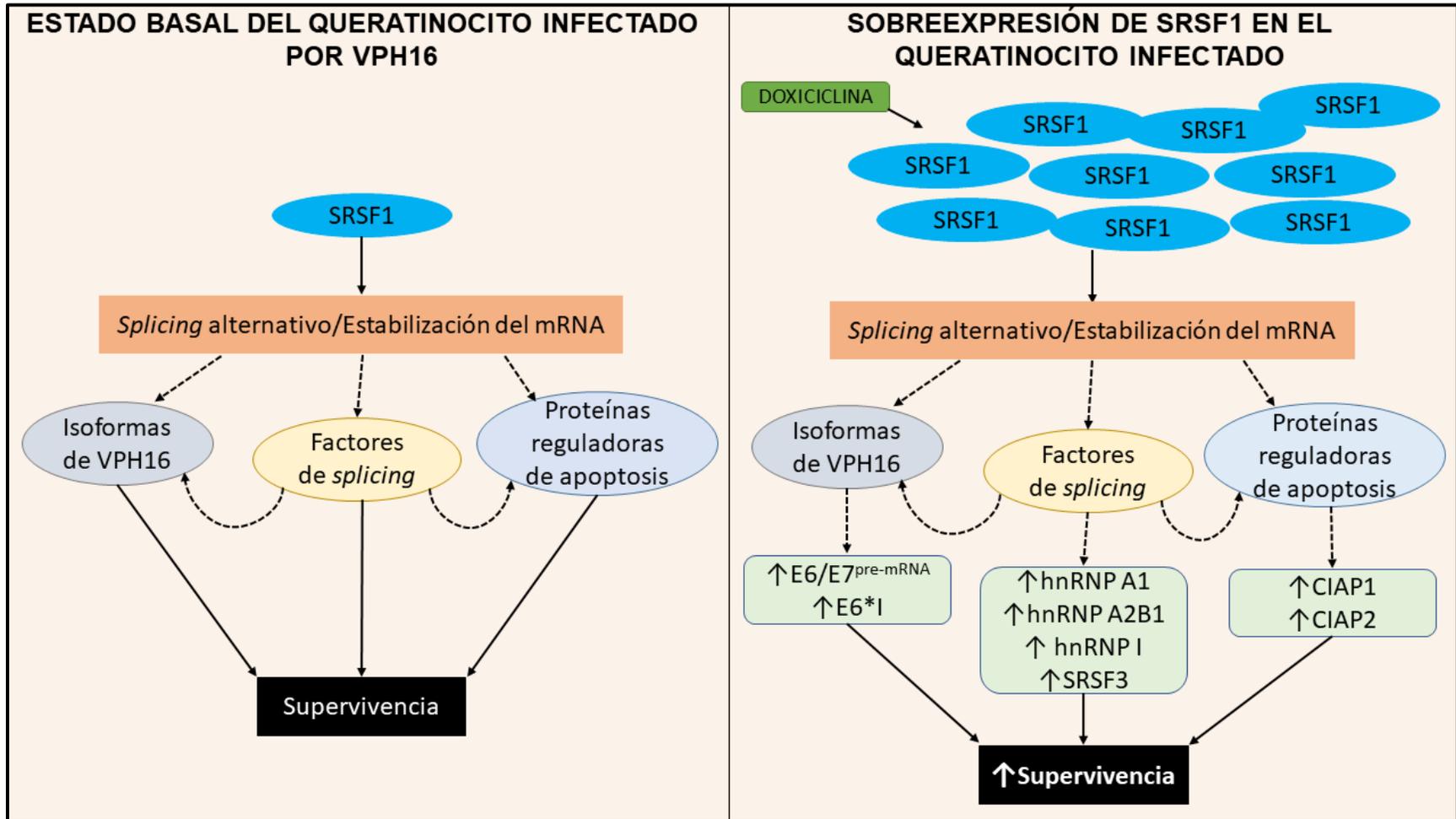


Figura 20. Esquema propuesto de resumen de resultados