



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Unidad Académica de Medicina
Unidad de Investigación Especializada en Microbiología
Maestría en Ciencias Biomédicas
Laboratorio de Biomedicina Molecular



**Análisis de la expresión de pRb en células transfectadas con E7 de
VPH 16 prototipo y sus variantes E7-A712, E7-G647/C789/G795 y
E7-C732/C789/G795**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Biomédicas

Presenta:

QBP. Jorge Adán Navor Hernández

Directora de tesis: Dra. Berenice Illades Aguiar

Codirector de tesis: Dr. Jorge Organista Nava



Chilpancingo, Guerrero; Diciembre del 2020.

**Análisis de la expresión de pRb en células
transfectadas con E7 de VPH 16 prototipo y sus
variantes E7-A712, E7-G647/C789/G795 y E7-
C732/C789/G795**




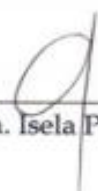
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS


ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS


En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 03 días del mes de julio de dos mil veinte, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Análisis de la expresión de pRb en células transfectadas con E7 de VPH 16 prototipo y sus variantes E7-A712, E7-G647/C789/G795 y E7-C732/C789/G795", presentada por el alumno Jorge Adán Navor Hernández, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.


El Comité Tutorial


Dra. Berenice Illades Aguiar
Dirección de tesis


Dra. Isela Parra Rojas


Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero



Dr. Julio Ortiz Ortiz


Dr. Alfredo Lagunas Martínez

Vo. Bo

Vo. Bo


UAG
ECQB | Coordinación de la
Dirección de la Maestría en Ciencias
Biomédicas
DIRECCIÓN 2018-2021


Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en la ciudad de Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México.

Bajo la dirección de

Dra. Berenice Illades Aguiar

la codirección del

Dr. Jorge Organista Nava

la asesoría de

Dr. Alfredo Lagunas Martínez

Dra. Isela Parra Rojas

Dr. Julio Ortiz Ortiz

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Con la colaboración de

Instituto Nacional de Salud Pública

Esta investigación se desarrolló con el financiamiento de CONACYT con el proyecto de Ciencia Básica No. 288612.

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el QBP. Jorge Adán Navor Hernández, recibió beca del CONACYT (CVU: 925877).

Agradecimientos

A la Dra. Berenice Illades Aguiar, por brindarme la oportunidad de seguir colaborando en su grupo de trabajo, por ayudarme a crecer en el área de la investigación, por ser un constante ejemplo de perseverancia, trabajo duro, constancia, dedicación y calidad humana. Muchas gracias Dra., porque con usted he aprendido muchísimo, gracias por siempre estar al pendiente de todos sus estudiantes y por haberme dado todas las facilidades que permitieron que este día pueda titularme como Maestro en Ciencias Biomédicas.

Al Dr. Jorge Organista Nava, por su apoyo y dedicación incondicional a este proyecto, por estar siempre al pendiente de que no faltara ningún reactivo, por exigirme para siempre dar más y con ello lograr superarme, por escuchar siempre atento cuando alguna idea sobre el proyecto me asaltaba de repente y por siempre atender a todas mis peticiones, gracias por siempre darse el tiempo de resolver mis dudas y de facilitarme todos los materiales que en su momento necesite.

A la Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero, por ser un pilar fundamental en mi vida académica desde la primer clase que me dio en licenciatura, sin duda alguna cada observación, cada palabra, cada corrección, cada consejo, me ayudaron para orientar mi formación como científico por el mejor de los caminos, agradezco muchísimo todas sus muestras de cariño y el apoyo incondicional que durante todos estos años me brindo, muchas gracias querida Dra. Luz.

A la Dra. Isela Parra Rojas, porque además de ser mi tutora se convirtió en mi consejera, gracias por siempre tener las palabras precisas para poder orientarme cuando recurría a usted, por todo el apoyo que me brindo y por siempre estar muy al pendiente de lo que me ocurría durante la maestría. Gracias por siempre confiar en mí y por todas las aportaciones que dio para este proyecto.

Al Dr. Julio Ortiz Ortiz, quien desde hace varios años ha formado parte de mi formación académica y jamás ha dejado de creer en mí, gracias por ayudarme a crecer profesionalmente, por sus consejos, por su apoyo y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Alfredo Lagunas Martínez, por tener siempre la disponibilidad de apoyar en lo que se necesite, por todos los conocimientos transmitidos durante cada uno de mis seminarios, por el tiempo y la dedicación que brindo a este proyecto desde que se me asignó como asesor externo, sin lugar a duda todas sus observaciones fueron y serán de gran utilidad para este proyecto.

Al Laboratorio de Biomedicina Molecular, gracias por acogerme durante casi 4 años. A todo el grandioso equipo que conforma este laboratorio que en todo este tiempo se convirtió en mi segunda casa. Gracias por el apoyo, las risas, los regaños y la amistad sincera, siempre ocuparan un lugar importante en mi vida.

Dedicatorias

A DIOS, ese ser supremo, magnifico y eterno que me llena de sus bendiciones desmedidamente, por no dejarme solo, por siempre darme la fortaleza que necesito para enfrentar cada situación que se me presenta y por amarme infinitamente.

A mis padres, por estar a mi lado a cada paso que doy, por darme su amor y apoyo incondicional y por acompañarme durante todo este proceso que hoy culmina, gracias por jamás dejar de creer en mí, por estar conmigo en las buenas y las no tan buenas, por inculcarme los valores que me permiten ser el hombre que hoy soy. No me alcanzaría la vida para agradecerles todo lo que han hecho por mí; hoy no me queda más que decirles ¡felicidades por este logro!, porque como acertadamente siempre me dicen, mis éxitos son los suyos, los amo con el alma papás.

Índice

RESUMEN	1
ABSTRAC	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MATERIALES Y MÉTODOS	7
III. RESULTADOS	11
IV. DISCUSIÓN	23
V. CONCLUSIONES	27
VI. PERSPECTIVAS	28
VII. ANEXOS	29
VIII. REFERENCIAS	30

RESUMEN

Introducción: El VPH 16, es el patógeno más asociado al cáncer cervical, una enfermedad en la cual, la sobreexpresión de la oncoproteína viral E7 juega un papel primordial debido a que sus principales blancos, son proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, incluida la proteína pRb, ocasionando la transformación celular. Se sabe que mutaciones en el gen E7, se encuentran relacionadas con la carcinogénesis del cuello uterino. Datos recientes de nuestro grupo de trabajo reportan que la variante E7-C732/C789/G795 presenta una alta frecuencia en muestras de cáncer cervicouterino. De igual modo, se observó que esta variante y la E7-prototipo incrementan los niveles de expresión del mRNA de Oct4A. Actualmente, se desconoce el efecto que las variantes reportadas en población guerrerense, tengan sobre el nivel de expresión del mensajero de pRb. Por ello, el objetivo de este proyecto fue analizar la influencia de estas variantes sobre la expresión del mRNA de pRb. **Metodología:** la línea celular C33-A fue transfectada tanto transitoria como establemente con un plásmido que expresa E7-prototipo y sus variantes génicas, se analizó el nivel de expresión del mRNA de pRb y E7 mediante RT-qPCR. **Resultados:** se observó un incremento en el nivel de expresión del mRNA de pRb en presencia de E7-prototipo y las variantes génicas en comparación con el grupo control tanto en las transfectantes transitorias como en las estables. Por otra parte, se observó que la variante E7-C732/C789/G795 presenta una mayor expresión de su mensajero que la E7-prototipo. **Conclusión:** la expresión del RNA mensajero de pRb se incrementa en presencia de E7-prototipo y de las variantes génicas E7 del VPH 16. El nivel de expresión del mRNA de E7 varía en función de la variante génica.

Palabras clave: cáncer cervicouterino, células C33-A, VPH 16, variantes génicas E7, mRNA pRb.

ABSTRAC

Introduction: HPV 16 is the pathogen most associated with cervical cancer, a disease in which the overexpression of the viral oncoprotein E7 plays an essential role because its main targets are proteins involved in the regulation of the cell cycle, causing cell transformation. Mutations in the E7 gene are known to be related to cervical carcinogenesis. Recent data from our working group report that the E7-C732/C789/G795 variant presents a high frequency in cervical cancer samples, in the same way, it was observed that this variant and the E7-prototype increased the Oct4A mRNA expression levels. Currently, the effect that the variants reported in the Guerrero population have on the expression level of the pRb messenger is unknown, therefore, the objective of this project was to analyze the influence of these variants on the expression of pRb mRNA. **Methodology:** the C33-A cell line, which were transiently and stably transfected with a plasmid that contains E7-prototype and its gene variants, the expression level of pRb and E7 mRNA was analyzed by RT-qPCR. **Results:** an increase in the pRb mRNA expression level was observed in presence of E7-prototype and the gene variants compared to the control group in the transient and stable transfectants. On the other hand, it was observed that the expression level of the E7 mRNA was highly expressed in the presence of E7-C732/C789/G795 variant compared to E7-prototype. **Conclusion:** the expression of the pRb messenger RNA is increased in the presence of E7-prototype and the E7 gene variants of HPV 16. The expression level of the E7 mRNA varies depending on the gene variant.

Key words: cervical cancer, C33-A cells, HPV 16, E7 gene variants, mRNA pRb.

I. INTRODUCCIÓN

El Virus del Papiloma Humano (VPH) mide aproximadamente 55 nm de diámetro, posee un genoma de DNA circular de doble cadena cubierto por una cápside icosaédrica (Lazarczyk *et al.*, 2009); es altamente prevalente a nivel mundial (Bruni *et al.*, 2010), presentando tropismo por tejido epitelial cutáneo y mucoso en el cuerpo humano (de Villiers *et al.*, 2004). Existen más de 200 tipos de VPH que generalmente se clasifican en virus de alto riesgo (VPH-AR) (asociados al desarrollo de cáncer) y virus de bajo riesgo (asociados a verrugas genitales y lesiones benignas) (Klingelhutz y Roman, 2012). El VPH 16, es el VPH de alto riesgo más asociado al cáncer cervicouterino (CaCU) (Songock *et al.*, 2016). El CaCU es la cuarta neoplasia más común en mujeres de todo el mundo, detectándose 569,847 nuevos casos y ocasionando 311,365 muertes anuales (Bray *et al.*, 2018). La OMS, señala que el desarrollo de CaCU es multifactorial (Organización Mundial de la Salud, 2018), sin embargo, se sabe qué factores específicos de los VPH-AR como, generar una infección persistente, la integración viral, una carga viral alta y la actividad de sus oncoproteínas, son cruciales para el desarrollo del CaCU (McBride, 2017).

La oncoproteína E7 del VPH 16 es esencial para el ciclo replicativo viral y para el desarrollo de CaCU, desde lesiones precursoras hasta carcinomas invasivos (Songock *et al.*, 2016). E7 es sumamente importante puesto que se une a proteínas reguladoras del ciclo celular como pRb, p107 y p130, incrementado la expresión de los genes necesarios para la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular y la síntesis del DNA (Munger *et al.*, 2001).

E7 de VPH 16 es una oncoproteína de 98 aminoácidos (aa), que estructuralmente se divide en 3 regiones; en la región amino-terminal, se encuentran la región CR1 y CR2, mientras que en la región carboxil-terminal, se encuentra la región CR3, la cual presenta un dominio de unión de Zinc que consta de dos regiones CXXC separados por 29 aa (Roman y Munger, 2013); se localiza tanto en el núcleo (Zatsepina *et al.*, 1997) como en el citoplasma de la célula hospedera, presenta una vida media de 1 hora, su degradación se lleva a cabo vía proteosoma y es una fosfoproteína (Smotkin y Wettstein, 1987), que cuenta con un sitio de fosforilación consenso caseín cinasa en

su región amino-terminal (Barbosa *et al.*, 1990) y otro en la región carboxilo-terminal (Massimi y Banks, 2000). Además, la proteína E7 puede formar tetrámeros y oligómeros (Alonso *et al.*, 2006).

E7 es una proteína multifuncional con diversos blancos celulares (Massimi y Banks, 2000). Se sabe que la presencia de E7 del VPH 16 es suficiente para inmortalizar las células epiteliales humanas incluso en ausencia de E6 (Halbert *et al.*, 1991); y que también desregula la proliferación y diferenciación manteniendo a los queratinocitos en un estado competente de replicación del DNA (Cheng *et al.*, 1995).

E7 altera la red de regulación transcripcional del complejo E2F-DP, un represor transcripcional que restringe la entrada de la fase S del ciclo celular (Munger *et al.*, 2001). E7 del VPH 16 puede unirse directamente a E2F1 y mejorar la transcripción mediada por E2F1 (Hwang *et al.*, 2002). De igual modo, E7 se asocia con E2F6 y anula su capacidad de funcionar como un represor transcripcional (McLaughlin-Drubin *et al.*, 2008). La expresión de las ciclinas E y A, que son las subunidades reguladoras de cdk2, están bajo control E2F y ambas presentan un incremento en su expresión en las células que expresan E7 (Zerfass *et al.*, 1995). De igual modo, E7 inactiva a los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas (CKIs) como p21 y p27 (Munger *et al.*, 2001); p21 y p27 regulan la detención del crecimiento durante la diferenciación epitelial (Mittal y Banks, 2017), y se sabe que p21 actúa como supresor de tumores en el desarrollo del CaCU (Shin *et al.*, 2009). En la célula, cdk2 es el principal blanco de p21 y p27, E7 regula la actividad de cdk2 mediante la unión a p21 y p27 a través de sus extremos carboxilo terminal (Mittal y Banks, 2017). E7 puede unirse a p107 y p130 para inducir su degradación a través de los dominios CR1 y CR2 (Songock *et al.*, 2016).

La proteína supresora de tumor del Retinoblastoma (pRb), es un regulador negativo del ciclo celular ya que se une a E2F1 e inhibe su actividad transcripcional en genes como el de la dihidrofolato reductasa (DHFR), ciclinas E y A, entre otros (Liu *et al.*, 2018). Se sabe que el estado funcional de pRb se inactiva debido a su fosforilación (Ewens *et al.*, 2017), que es catalizada por las cinasas dependientes de ciclina (CDK) durante la progresión del ciclo celular (Chau y Wang, 2003). Durante la proliferación

celular, las CDK tipo D (CDK 4/6) se unen a pRb a través de un motivo LXCXE y la fosforilan para interrumpir su asociación con E2F, inhibiendo así la función de pRb y conduciendo a la activación de la transcripción mediada por E2F1 (Buchkovich *et al.*, 1989). La asociación de la oncoproteína E7 de VPH-AR con pRb y el reclutamiento de la ubiquitin-ligasa Culina 2, induce la degradación mediada por proteosoma de pRb, lo que interrumpe la interacción de pRb con E2F, promoviendo la transición del ciclo celular en fase G1/S; por ello, VPH logra mantener la competencia de la fase S en células epiteliales diferenciadas (Mittal y Banks, 2017). Como consecuencia de la degradación de pRb por E7, la progresión del ciclo celular mediada por E2F puede ocurrir en ausencia de señales mitogénicas (Songock *et al.*, 2016).

Diversos estudios proponen que las mutaciones de sentido erróneo del gen E7 se relacionan con la presencia de CaCU, lo que sugiere una probable intervención de las variantes de E7 en el desarrollo del CaCU (Boumba *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014; Tsakogiannis *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2010). Wu y colaboradores, reportaron a 3 mutaciones de E7 como las más frecuentes en población china: la A647G (70.2%) resultando en un cambio de aa N29S, la mutación C749T (51.1%) con un cambio de aa S63F y la T846C (61.7%) una mutación silenciosa (Wu *et al.*, 2006). La mutación A647G (N29S), fue también determinada como la más frecuente (70.4%) en muestras de CaCU, donde la relación de esta mutación con la progresión del grado patológico fue estadísticamente significativa ($p= 0.043$) (Song *et al.*, 1997). Por otra parte, Lee y colaboradores, también determinaron a la mutación A647G como la más prevalente, mostrando asociación estadísticamente significativa con la gravedad de la neoplasia cervical ($p<0.0001$), observando que aquellas mujeres infectadas con la variante que presenta esta mutación, tenían 9.07 veces más riesgo de desarrollar CaCU invasor (Lee *et al.*, 2011).

La importancia de la mutación A647G recae en que se posiciona en la región CR2 de E7, dicha región cuenta con un dominio de unión a pRb y otro que sirve como el sustrato de la fosforilación por la caseína cinasa II (CKII) (Barbosa *et al.*, 1990). Actualmente, existe evidencia experimental que demuestra que en la variante E7 A647G, la sustitución de N29S crea un sitio adicional fosfo-aceptor de CKII que

aumenta la interacción de E7 con TBP y pRb, lo que resulta en una mayor degradación proteosomal de estas proteínas (El-Abidine *et al*, 2017).

Con respecto al análisis de la secuencia del gen E7, nuestro grupo de trabajo reportó que en población del estado de Guerrero, México, de un total de 190 muestras de cuello uterino, se encontraron 2 mutaciones contrasentido, la A647G (N29S) y la C712A (H51N) y 6 mutaciones sinónimas, G666A, T678C, T732C, C765T, T789C y T795G. La variante E7-prototipo fue la más frecuente en este estudio (74.35%), seguida por la variante con tres mutaciones silenciosas, E7-C732/C789/G795 (20.42%). El análisis estadístico determinó que la variante E7-C732/C789/G795 presentaba un OR de 3.79 (IC: 1.46 - 9.85, $p=0.006$), lo que indica que las mujeres infectadas con esta variante, tienen 3 veces más riesgo de desarrollar CaCU que las mujeres infectadas con la cepa prototipo (Antaño-Arias *et al*, 2020) (Datos no publicados).

Estudios experimentales realizados con las variantes E7-prototipo y E7-C732/C789/G795, en nuestro grupo de trabajo, demostraron que en células C33-A transfectadas transitoriamente con dichas variantes, presentaron un incremento en la expresión del mRNA de Oct4A, sin embargo, la expresión de las isoformas Oct4B y Oct4B1 no se vio alterada (Clemente-Perivan *et al.*, 2019).

Datos epidemiológicos y moleculares sugieren que las variantes de un mismo tipo de VPH son biológicamente distintas y pueden conferir riesgos patogénicos diferenciales (Bernard *et al.*, 2006). Además, se sugiere que las variaciones de secuencia de E7 muestran dependencia geográfica (Wu *et al.*, 2006). En este proyecto se generaron células C33-A transfectadas tanto transitoria como establemente con E7-prototipo y las variantes génicas E7-A712, E7-G647/C789/G795 y E7-C732/C789/G795 del VPH 16, para evaluar el efecto que estas variantes presentan sobre la expresión del mRNA de pRb. De manera similar, se analizó el nivel de expresión de RNA mensajero que presenta cada variante para determinar si existe alguna diferencia en los niveles de expresión del gen E7 de acuerdo a la variante génica y con ello, poder generar más evidencia de la diferencia de oncogenicidad entre las variantes de E7.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

La línea celular C33-A, de carcinoma cervical humano negativo a la infección por VPH, se obtuvo de la “American Type Culture Collection (ATCC)”. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, empleando medio de cultivo MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, Life Technologies, USA), 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina.

Plásmidos

Las construcciones de E7-prototipo y sus variantes, empleadas en este proyecto, fueron realizadas por Zúñiga-Alviar *et al.*, 2019 (Datos no publicados). Los plásmidos son pEGFP-N1, pEGFP-N1-E7-prototipo, pEGFP-N1-E7-A712, pEGFP-N1-E7-G647/C789/G795 y pEGFP-N1-E7-C732/C789/G795. Partiendo de 1 ng de plásmido de cada construcción, se procedió a transformar la cepa *E. coli* DH5 α , empleando 50 μ L de células competentes; la transformación se realizó mediante choque térmico. Posteriormente, las células se incubaron a 37°C, 160 rpm durante 1 hora en medio de cultivo Luria Bertani (LB) sin antibióticos. Después, las células se sembraron en placas de medio LB suplementado con 20 μ g/mL de kanamicina y se incubaron a 37°C por 16 horas. Pasado este tiempo, se seleccionó 1 colonia aislada para cada construcción y se sembró en 15 mL de medio LB líquido suplementado con 20 μ g/mL de kanamicina, se incubaron a 37°C por 16 horas. Posteriormente, se realizó extracción de DNA plasmídico utilizando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific). Para verificar la presencia del gen E7 prototipo y de sus variantes en el plásmido, se realizó una digestión empleando las enzimas HindIII (AAGCTT) y BamHI (GGATCC) (New England BioLabs).

Transfección de variantes génicas E7 en células C33-A

Las células C33-A, se transfectaron transitoriamente con los vectores pEGFP-N1, pEGFP-N1-E7-prototipo, pEGFP-N1-E7-A712, pEGFP-N1-E7-G647/C789/G795 y pEGFP-N1-E7-C732/C789/G795, utilizando una mezcla de 4 μ g de DNA plasmídico,

medio de cultivo MEM y Lipofectamina 2000 transfection reagent (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Verificación de la presencia de E7-prototipo y sus variantes en células C33-A

Extracción de RNA. El RNA total se extrajo mediante el método de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo las condiciones del fabricante (Anexo 1). La integridad y concentración del RNA total se evaluó por medio de espectrofotometría, midiendo la relación de absorbancia a 260/280 nm y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

RT-PCR. El RNA total (4 µg) se convirtió a cDNA usando el Kit “SuperScript” III First-Strand Synthesis (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La mezcla de reacción (20 µL volumen final) incluyó: 10 µL de 2X RT Reaction Mix, 2 µL de RT Enzyme Mix y H₂O-DEPC. La mezcla se incubó siguiendo las siguientes condiciones: 25°C por 10 min, 50°C por 30 min, 85°C por 5 min; posteriormente se agregó 1 µl de RNAsa y se incubó a 37°C por 20 min.

PCR convencional. A partir del cDNA se realizó la amplificación de E7 utilizando los primers enlistados en la Tabla 1. Se utilizaron 400 ng de cDNA que se agregaron a la mezcla de reacción (25 µL volumen final), que incluyó: 1 µL de cada primer (15 pmol), 2.5 µL de buffer de PCR 10X, 1 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de dNTPs 2 mM, 0.2 µL (5U/µl) de Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo), y H₂O-DEPC. La amplificación se realizó de acuerdo a las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min y por ultimo un ciclo a 72°C por 10 min.

Análisis de la expresión del mRNA de pRb y de E7

Cuantificación del mRNA mediante qPCR. Para la qPCR se utilizó SYBR Green PCR Reagents Kit (Applied Biosystem) de acuerdo a las condiciones del fabricante y se usaron los primers de la tabla 1. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 30 seg.

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados

mRNA	Primer sentido (5'-3')	Primer antisentido (5'-3')	Amplicón (pb)	Referencia
E7	TGAAATAGATGGTCCAGCTGG	TGCCCATTAACAGGTCTTCC	149	Wiest <i>et al.</i> , 2002.
pRb	TCGTCAGGCTTGAGTTTGAA	CCCAAGTTAACCAAGCTCTCTC	105	Navor-Hernández, 2019.
GAPDH	GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC	CATGAGTCCTTCCACGATACC	123	Organista-Nava <i>et al.</i> , 2016.

El mix de reacción (20 µl de volumen final) consistió en 10 µl de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), 10 µM de cada primer, 500 ng de cDNA por reacción y agua ultra pura. Para normalizar los resultados de expresión se utilizó el gen endógeno GAPDH. La expresión de los mRNA se determinó mediante el ciclo umbral (C_t) y los niveles relativos de expresión se calcularon usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Nolan *et al.*, 2006).

Células C33-A transfectadas establemente con E7-prototipo y sus variantes génicas

Transfectantes estables. Se sembraron 1 millón de células C33-A por pozo en placas de 6 pozos, pasadas 24 horas, se realizó la transfección siguiendo el método anteriormente descrito. 24 horas después de la transfección, se les retiró el medio de cultivo a las células y se les agregaron 0.5 mL de medio MEM suplementado + 500 µg/mL de antibiótico G418. Las células se mantuvieron en las mismas condiciones durante 3 meses, en los cuales, se les cambiaba el medio cada 3 días y se monitoreaban en microscopia de fluorescencia 1 vez por semana.

Sorting de las células fluorescentes. Las células estables que se mantenían en cultivo, se propagaron en placas p100 y se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaron una confluencia celular del 50-60% aproximadamente, posteriormente, las células se cosecharon con tripsina 1X – verseno y se realizó un lavado con verseno. Las células se diluyeron a una concentración de 3 millones de células por mL de verseno. El sorting se realizó por selección de la población celular que expresa el vector pEGFP-N1 mediante citometría de flujo, se utilizaron células sin transfectar como control negativo y células transfectadas con el vector vacío como control positivo.

Las células aisladas por sorting se colectaron e inmediatamente se sembraron añadiendo medio MEM suplementado + 500 µg/mL de antibiótico G418. Posteriormente, las células se mantuvieron en cultivo por un mes, en donde se les cambiaba el medio cada 3 días y se monitoreaban *in vivo* en microscopia de fluorescencia 1 vez por semana en el microscopio EVOS FL (Thermo Fisher Scientific); pasado el mes, las células se sometieron a un segundo sorting, dichas células se sembraron y se emplearon para los experimentos posteriores.

Secuenciación de E7-prototipo y variantes génicas. El producto de PCR del gen E7 obtenido de las células C33-A transfectadas establemente, se purificó por el método manual del isopropanol al 75% en tubo (protocolo 2-34 del User's Manual de Applied Biosystems) para eliminar los componentes sobrantes de la mezcla de PCR. Los productos fueron marcados mediante el método fluorescente de secuenciación en ciclo (Big Dye Terminator v 3.1 Ready Reaction Kit, Applied Biosystems) usando los iniciadores E7beginHindIII y E7endBamHI. La mezcla del marcaje y las condiciones del ciclaje fueron usadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, a excepción de la temperatura de alineamiento (57°C). La secuenciación se realizó en el secuenciador automático DNA ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Análisis de las secuencias. El análisis de las secuencias obtenidas de cada muestra se realizó utilizando el programa Finch TV. Posteriormente se realizó el alineamiento simple de la secuencia de E7 comparándola con la secuencia de referencia del VPH 16 (NC_001526.3) usando el programa en línea LALIGN.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el software GraphPad (V 5.0). Se empleó la prueba U de Mann-Whitney para comparar la diferencia entre los niveles de expresión del mRNA de pRb y de E7 entre los grupos de estudio, los resultados se reportan como medias y desviaciones estándar (SD), considerando estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

III. RESULTADOS

Validación del modelo: Propagación de plásmidos y digestión

Los plásmidos pEGFP-N1, pEGFP-N1-E7-prototipo, pEGFP-N1-E7-A712, pEGFP-N1-E7-G647/C789/G795 y pEGFP-N1-E7-C732/C789/G795, se propagaron con la finalidad de obtener la concentración suficiente de DNA plasmídico que se emplearía para las transfecciones. Las secuencias de E7-prototipo y de las variantes dentro de cada plásmido, están flanqueados por la secuencia de las enzimas de restricción HindIII y BamHI, por lo cual, al someter a cada plásmido a una digestión, las enzimas reconocerán este sitio de corte y liberarán la secuencia de E7-prototipo y de las variantes del plásmido pEGFP-N1. Se realizó electroforesis de los productos de la digestión en un gel de agarosa al 2.5%. En la figura 1, se observa una banda de aproximadamente 300 pb correspondiente al inserto de E7 y una banda de aproximadamente 4700 pb correspondiente al plásmido digerido, con lo cual, se puede comprobar que los plásmidos contienen la secuencia del gen E7-prototipo y de las variantes.

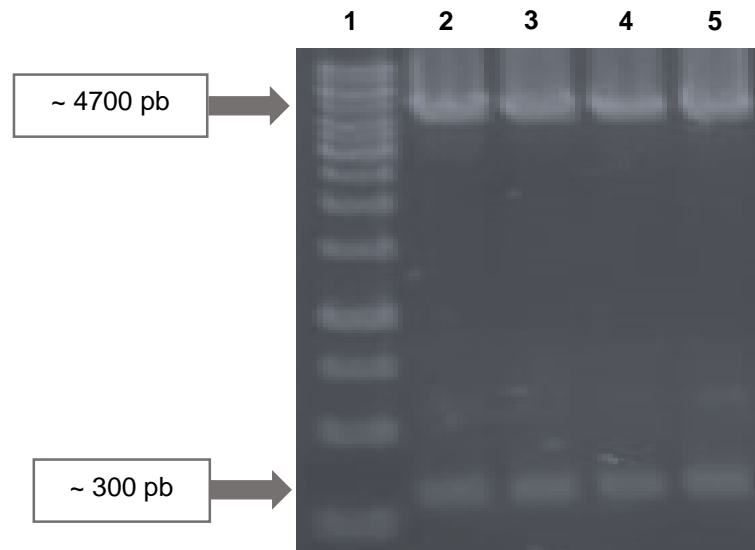
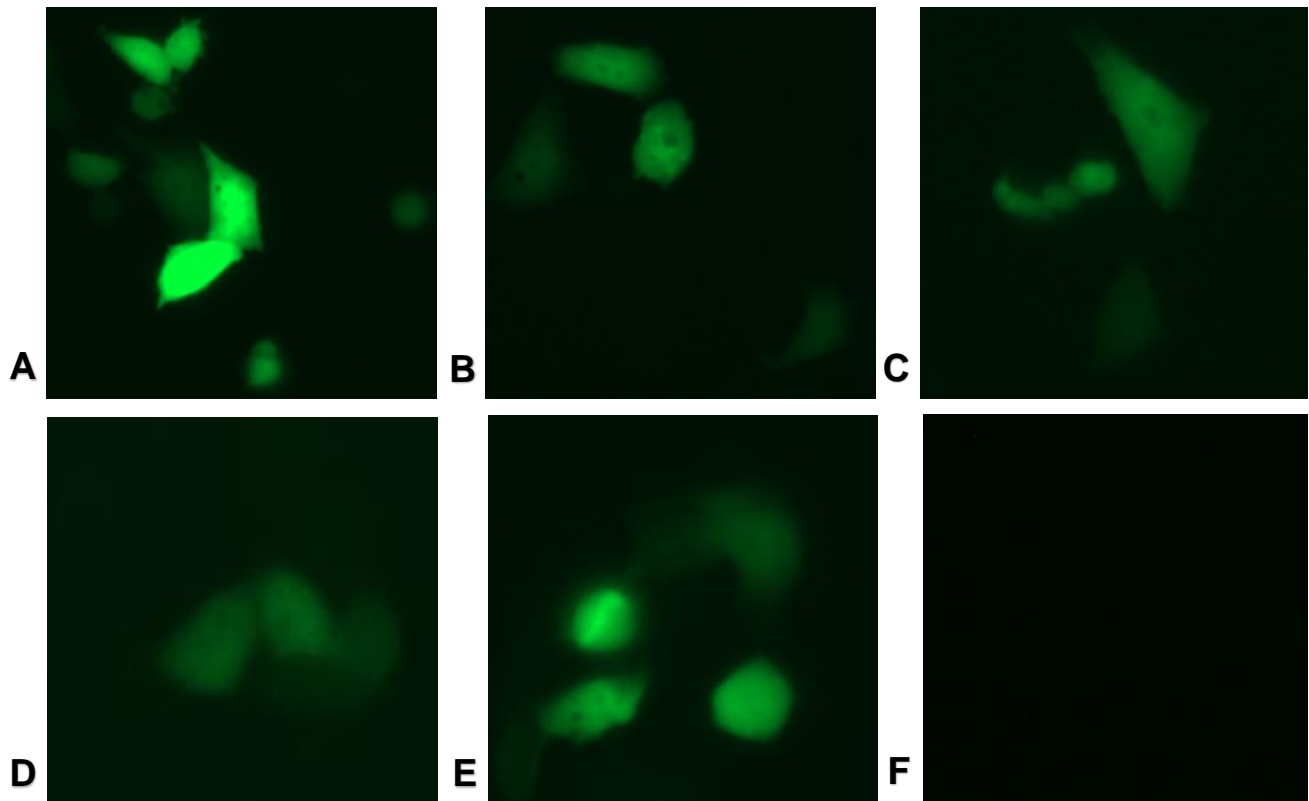


Figura 1. Digestión de los plásmidos. Los plásmidos pEGFP-N1-E7-prototipo, pEGFP-N1-E7-A712, pEGFP-N1-E7-G647/C789/G795 y pEGFP-N1-E7-C732/C789/G795, se digirieron empleando las enzimas HindIII y BamHI. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular (1 Kb); carril 2: pEGFP-N1-E7-prototipo, carril 3: pEGFP-N1-E7-A712, carril 4: pEGFP-N1-E7-G647/C789/G795, carril 5: pEGFP-N1-E7-C732/C789/G795.

Transfección de E7-prototipo y variantes génicas en células C33-A

Las células C33-A se transfectaron con los vectores pEGFP-N1, pEGFP-N1-E7-prototipo, pEGFP-N1-E7-A712, pEGFP-N1-E7-G647/C789/G795 y pEGFP-N1-E7-C732/C789/G795; estos vectores cuentan con un gen reportero, que en este caso es la proteína verde fluorescente (GFP). Una vez realizada la transfección y pasado el tiempo de tratamiento, las células se observaron en el microscopio de fluorescencia, observándose células de color verde brillante, lo que indica la expresión de GFP y por lo tanto, expresan la proteína E7-prototipo y sus variantes (figura 2).



Microscopia de fluorescencia (40X).

Figura 2. Evaluación de fluorescencia de las células transfectadas. Las células se observaron en microscopia de fluorescencia. A) pEGFP-N1, B) pEGFP-N1-E7-prototipo, C) pEGFP-N1-E7-A712, D) pEGFP-N1-E7-G647/C789/G795, E) pEGFP-N1-E7-C732/C789/G795 y F) Células C33-A sin transfectar. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

Verificación de la presencia de E7-prototipo y sus variantes génicas en células C33-A

Posterior a la transfección de las células C33-A, se extrajo el RNA total de cada condición experimental. El RNA total extraído se cuantificó para determinar la concentración de RNA que había por μL de muestra. Posteriormente, se realizó una electroforesis empleando geles de agarosa al 1.5% para determinar la integridad del RNA obtenido. En la figura 3, se observa una banda correspondiente al rRNA 28S y una banda correspondiente al rRNA 18S, indicativas de que el RNA está íntegro.

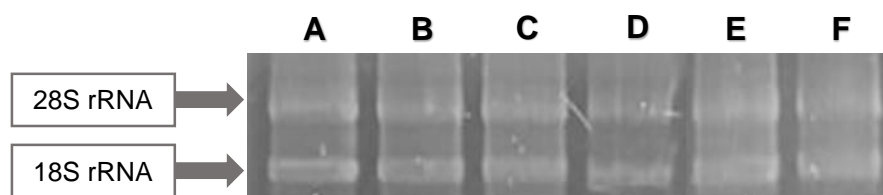


Figura 3. Extracción de RNA total. Se observan las subunidades 28S y 18S de RNA ribosomal. A) Vector vacío, B) E7-prototipo, C) E7-A712, D) E7-G647/C789/G795, E) E7-C732/C789/G795 y F) Células C33-A sin transfectar. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

Se obtuvo DNA complementario (cDNA) a partir del RNA total mediante RT-PCR. El cDNA se empleó para realizar una PCR convencional para GAPDH con la finalidad de evaluar la integridad del cDNA. Los productos de PCR se analizaron en una electroforesis en geles de agarosa al 2.5% y presentaron un tamaño aproximado de 123 pb (figura 4a).

De igual forma, se determinó la presencia del gen E7-prototipo y sus variantes en las células transfectadas mediante una PCR convencional, identificando un tamaño aproximado de 149 pb de cada amplicón (figura 4b).

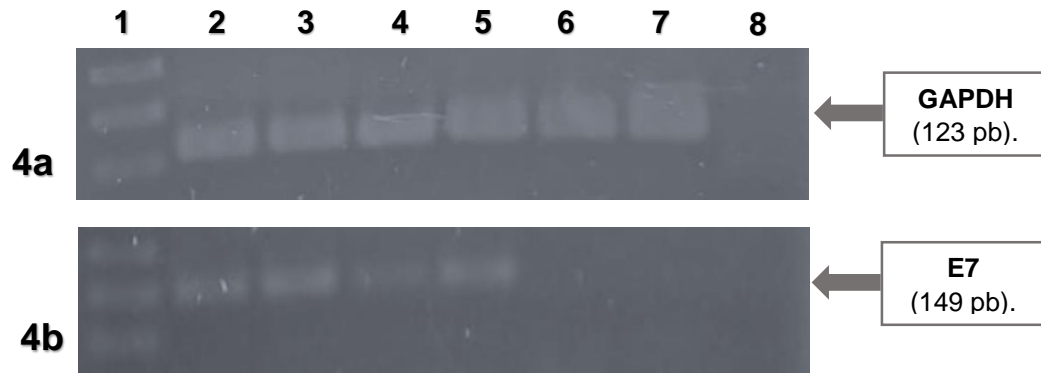


Figura 4. Electroforesis de productos de PCR. 4a) PCR para GAPDH y 4b) PCR de E7. 1) Marcador de peso molecular (50 pb), 2) E7-prototipo, 3) E7-A712, 4) E7-G647/C789/G795, 5) E7-C732/C789/G795, 6) Vector vacío, 7) Células C33-A sin transfectar y 8) control negativo. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

Expresión del mRNA de pRb en células C33-A transfectadas transitoriamente con E7-prototipo y sus variantes génicas

El cDNA obtenido de cada condición se sometió a una PCR en tiempo real para evaluar los niveles del mRNA de pRb que se expresaban en las diferentes condiciones de transfección; para normalizar los datos obtenidos, se empleó la expresión del gen endógeno GAPDH. En la figura 5, se puede observar que el nivel de mensajero de pRb incrementa ligeramente cuando se expresa E7-prototipo ($p=0.3098$) y las variantes génicas E7-A712 ($p=0.0705$), E7-G647/C789/G795 ($p=0.0596$) y E7-C732/C789/G795 ($p=0.0923$) comparados con el grupo control, sin embargo, en ninguno de los casos el valor es estadísticamente significativo.

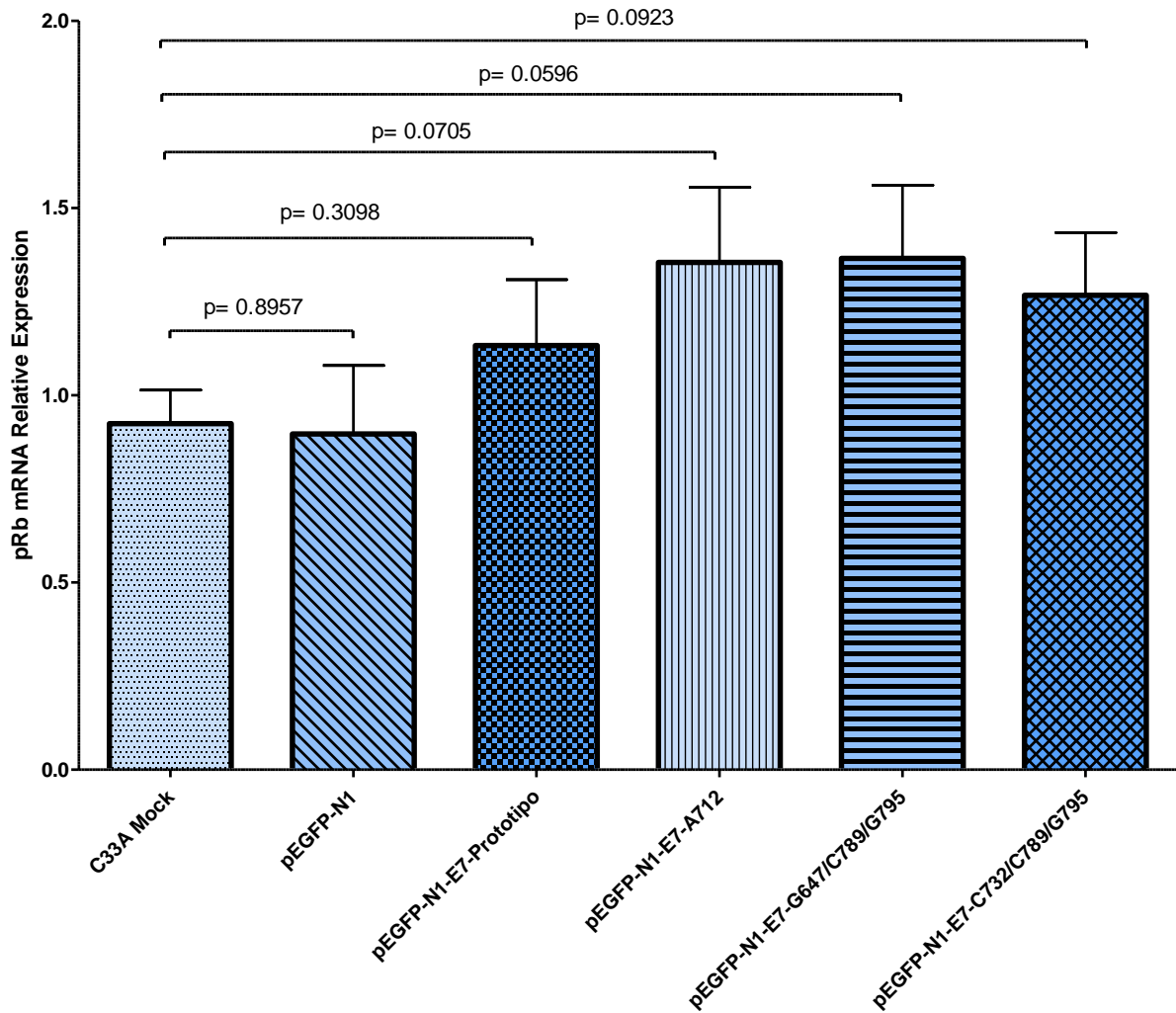


Figura 5. PCR en tiempo real para pRb. Análisis de qPCR para determinar la expresión del mRNA de pRb realizada a partir de cDNA obtenido de células C33-A sin transfectar y transfectadas con pEGFP-N1, pEGFP-N1-E7-prototipo, pEGFP-N1-E7-A712, pEGFP-N1-E7-G647/C789/G795 y pEGFP-N1-E7-C732/C789/G795. Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado, los valores se representan como media y desviación estándar y fueron normalizados con GAPDH. Para la comparación entre grupos se empleó el método U de Mann-Whitney considerándose significativo un valor de $p < 0.05$.

Generación de células C33-A transfectadas establemente con E7-prototipo y sus variantes génicas

Las células que se transfectaron y se mantenían en cultivo estable se sometieron a sorting para seleccionar mediante citometría de flujo a toda la población celular que mantenía la fluorescencia de GFP y por ende retenía el inserto donde se encontraba

nuestro gen de interés (E7-prototipo y sus variantes génicas). Los resultados obtenidos de la citometría de flujo se muestran en la figura 6, donde es posible analizar el porcentaje de transfección para cada condición, los cuales fueron: vector vacío (pEGFP-N1): 100%, E7-prototipo: 96.33%, E7-A712: 95.31%, E7-G647/C789/G795: 98.6% y E7-C732/C789/G795: 98.58%.

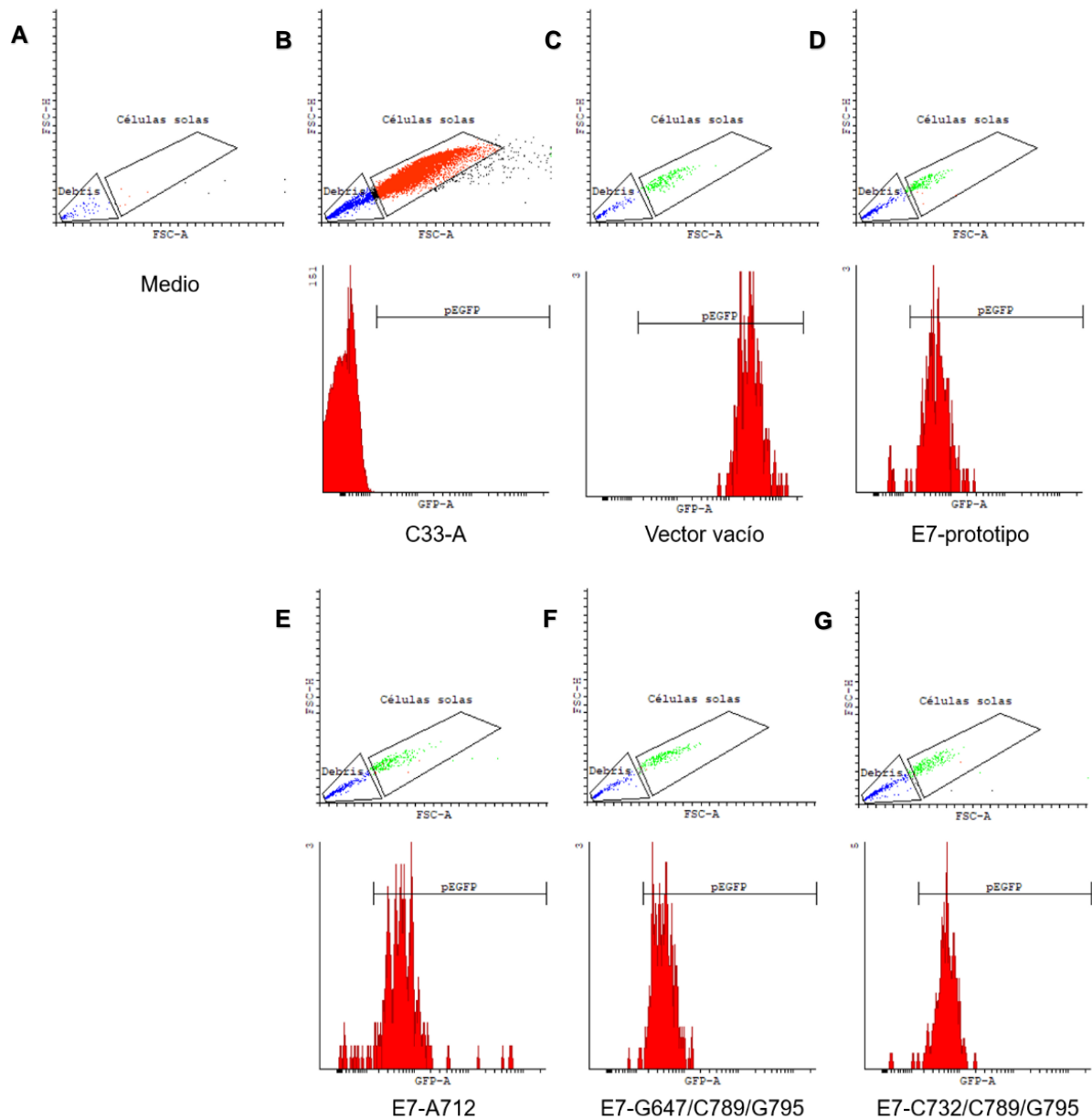


Figura 6. Evaluación de la expresión de GFP mediante citometría de flujo. Porcentaje de transfección obtenido en células C33-A transfectadas con E7-prototipo y sus variantes. A) Medio de cultivo, B) Células C33-A sin transfectar, C) Vector vacío: 100%, D) E7-prototipo: 96.33%, E) E7-A712: 95.31%, F) E7-G647/C789/G795: 98.6% y G) E7-C732/C789/G795: 98.58%.

Validación de la generación de células C33-A transfectadas establemente con E7-prototipo y sus variantes génicas

Se extrajo DNA de las células recuperadas del sorting con la finalidad de realizar una PCR convencional dirigida a amplificar el gen E7 usando los primers E7beginHindIII (5'-aagcttCCACCATGCATGGAGATACACCTACAT-3') y E7endBamHI (5'-ggatccAATGGTTTCTGAGAACAGATGGG-3'). Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, los amplicones presentaron un tamaño aproximado de 300 pb (figura 7).

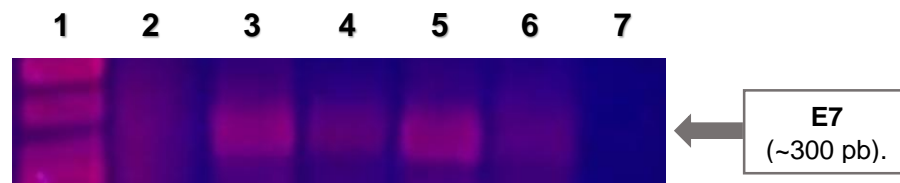
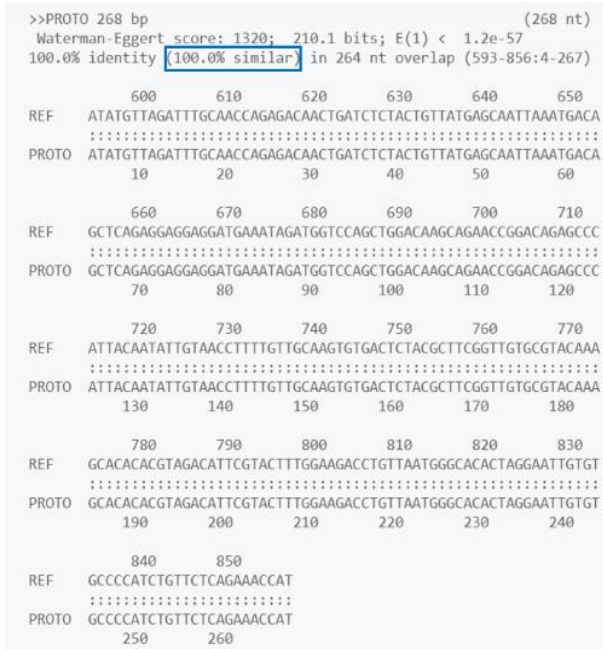


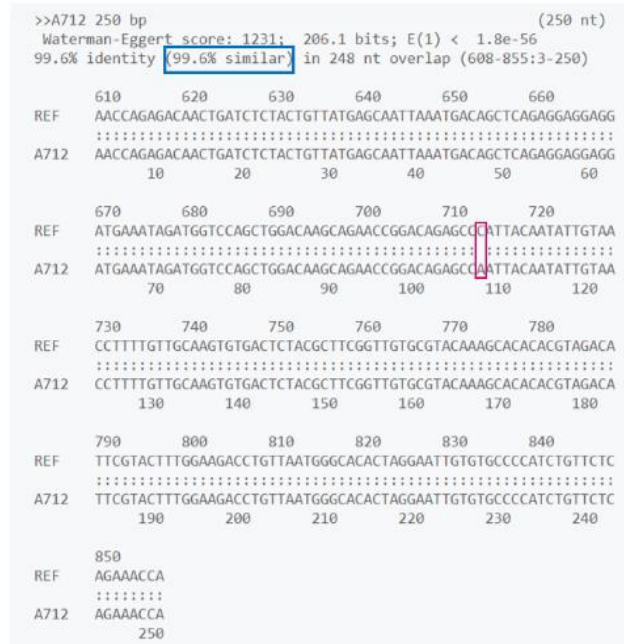
Figura 7. Electroforesis de productos de PCR. Se observan los amplicones de E7. Carril 1) Marcador de peso molecular (50 pb), 2) Vector vacío, 3) E7-prototipo, 4) E7-A712, 5) E7-G647/C789/G795, 6) E7-C732/C789/G795, 7) control negativo.

Para corroborar la presencia de E7-prototipo y sus variantes en cada una de las condiciones, los productos de la PCR de E7 fueron secuenciados. Las secuencias obtenidas se analizaron en el programa Finch TV y se realizó un alineamiento simple de secuencia contra la secuencia de referencia del VPH 16 (NC_001526.3, GenBank) empleando el programa en línea LALIGN. En la figura 8 se puede observar la secuencia correspondiente a cada variante, las cuales son expresadas por las células C33-A transfectadas establemente.

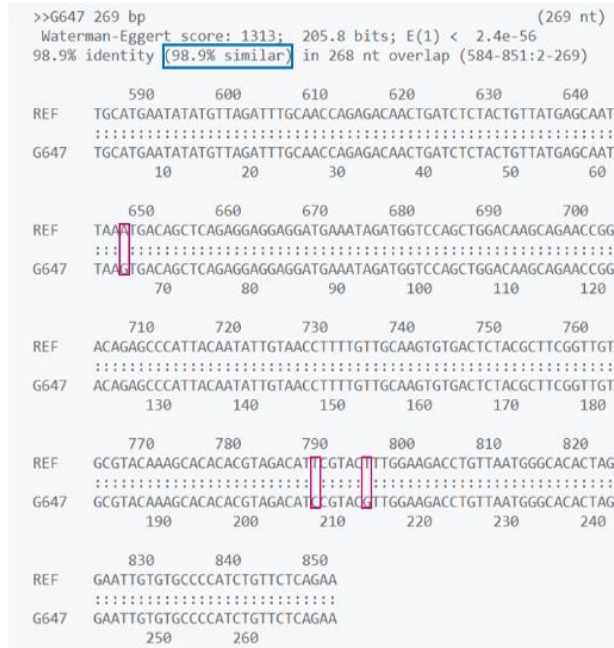
E7-prototipo



E7-A712



E7-G647/C789/G795



E7-C732/C789/G795

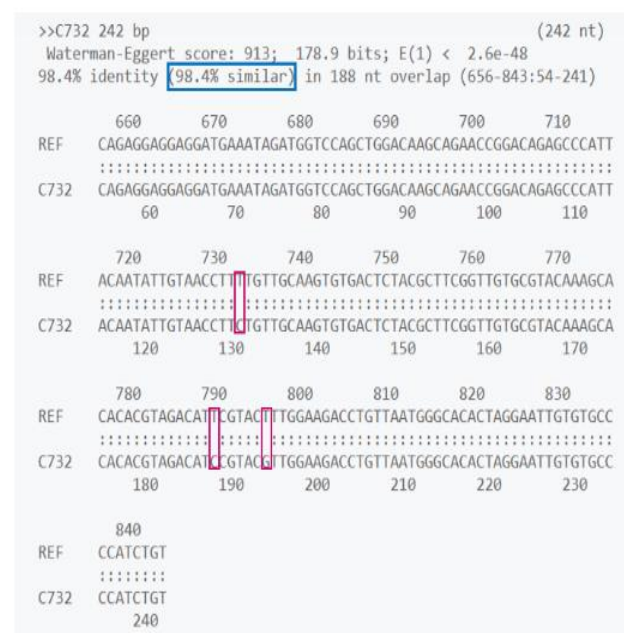


Figura 8. Alineamiento de la secuencia de E7 prototipo y sus variantes génicas. En cada figura se puede observar la secuencia de referencia del VPH 16 NC_001526.3, (GenBank) abreviada como “REF” y en la parte inferior del alineamiento se muestra la secuencia de la variante en estudio abreviada por la primera mutación que compone a la variante. El porcentaje de identidad entre la variante en estudio y la “REF” se marca en un recuadro azul, mientras que las mutaciones que componen a cada variante, se marcan en el recuadro rosa. La secuencia y la posición de las bases del VPH 16 se numeraron de acuerdo a la base de datos de secuencias de 1997 (Los Álamos National Laboratory, NM).

Una vez confirmado que las células que se habían mantenido en cultivo estable, expresaban el gen E7 (figura 7) y que la secuencia de este gen correspondía a la de E7-prototipo o sus variantes génicas (figura 8), se procedió con la extracción de RNA total (figura 9).

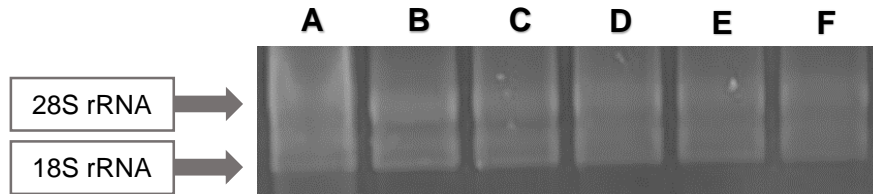


Figura 9. Extracción de RNA total de transfectantes estables. Se observan las subunidades 28S y 18S de RNA ribosomal. A) pEGFP-N1, B) pEGFP-N1-E7-prototipo, C) pEGFP-N1-E7-A712, D) pEGFP-N1-E7-G647/C789/G795, E) pEGFP-N1-E7-C732/C789/G795 y F) Células C33-A sin transfectar. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

Expresión del mRNA de E7 en células C33-A transfectadas establemente con E7-prototipo y sus variantes génicas

Con la finalidad de evaluar si el nivel de expresión del mRNA de E7 variaba en función de la variante génica, se realizó una RT-PCR y posteriormente una qPCR. En la figura 10 se observa que para el caso de C33-A Mock y pEGFP-N1 no hubo amplificación debido a que estas condiciones no expresaban E7, sin embargo, fueron utilizados como controles negativos. Para el caso de las variantes E7-A712 y E7-G647/C789/G795 se observa una menor expresión de su mensajero comparado con E7-prototipo, sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$), mientras que para la variante E7-C732/C789/G795, se pudo observar que el nivel del mensajero de E7 incrementó significativamente ($p = 0.0317$).

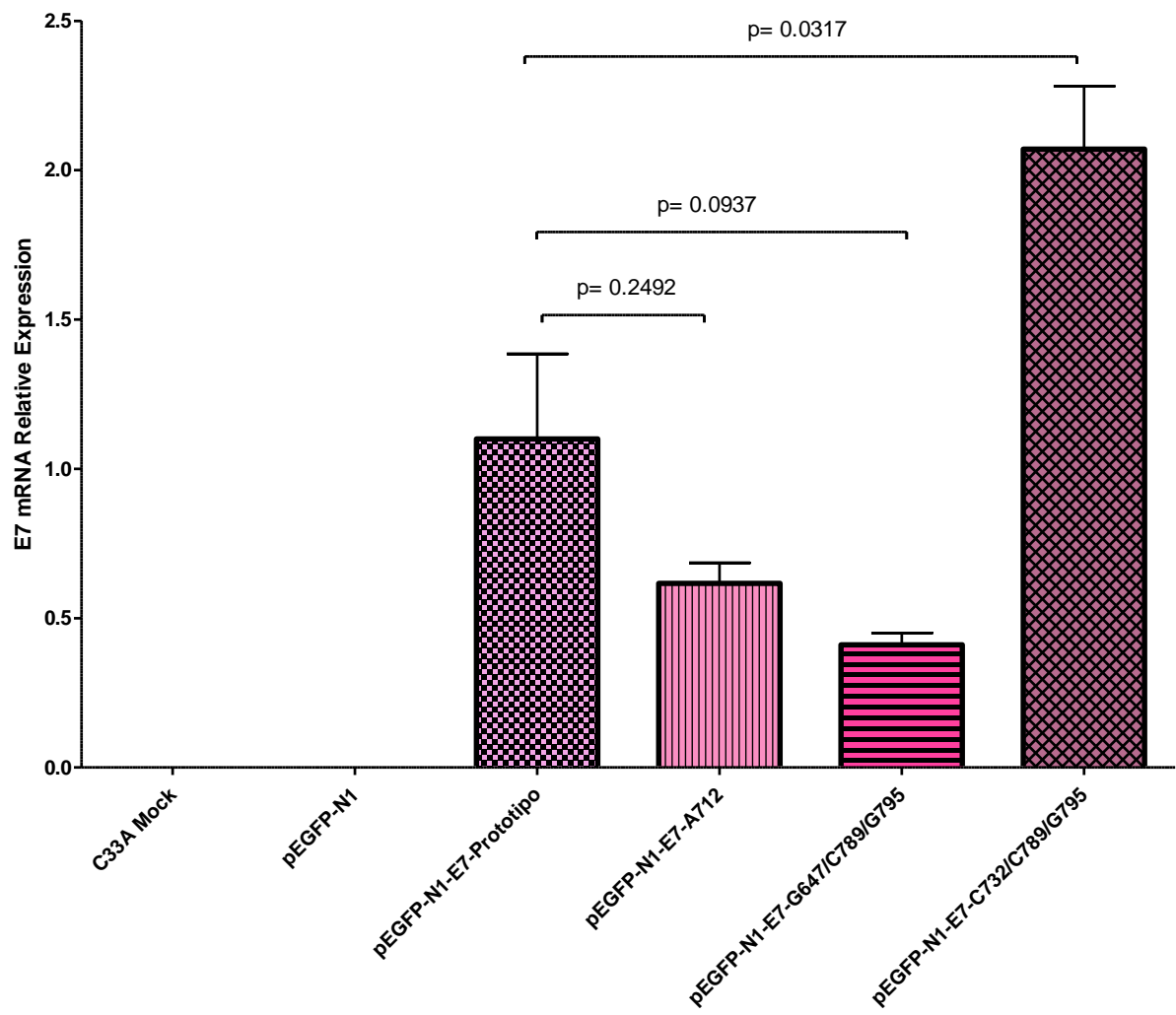


Figura 10. PCR en tiempo real para E7. Análisis de qPCR para determinar la expresión del mRNA de E7 realizada a partir del cDNA obtenido de células C33-A sin transfectar y transfectadas establemente con pEGFP-N1, pEGFP-N1-E7-prototipo, pEGFP-N1-E7-A712, pEGFP-N1-E7-G647/C789/G795 y pEGFP-N1-E7-C732/C789/G795. Se realizaron 3 experimentos independientes por duplicado, los valores se representan como media y desviación estándar y fueron normalizados con GAPDH. Para la comparación entre grupos se empleó el método U de Mann-Whitney considerándose significativo un valor de $p < 0.05$.

Expresión del mRNA de pRb en células C33-A transfectadas establemente con E7-prototipo y sus variantes génicas

Posterior al análisis de expresión de E7 en las transfectantes estables, procedimos a evaluar el nivel de expresión de pRb para observar si había alguna diferencia del resultado obtenido en las transfecciones transitorias. En la figura 11 se puede observar que el nivel de expresión del mensajero de pRb incrementa significativamente en presencia de E7-prototipo y de las variantes génicas (E7-prototipo $p=0.0002$, E7-A712 $p=0.0024$, E7-G647/C789/G795 $p=0.0006$ y E7-C732/C789/G795 $p=0.0036$) en comparación con nuestros grupos controles (C33-A Mock y pEGFP-N1).

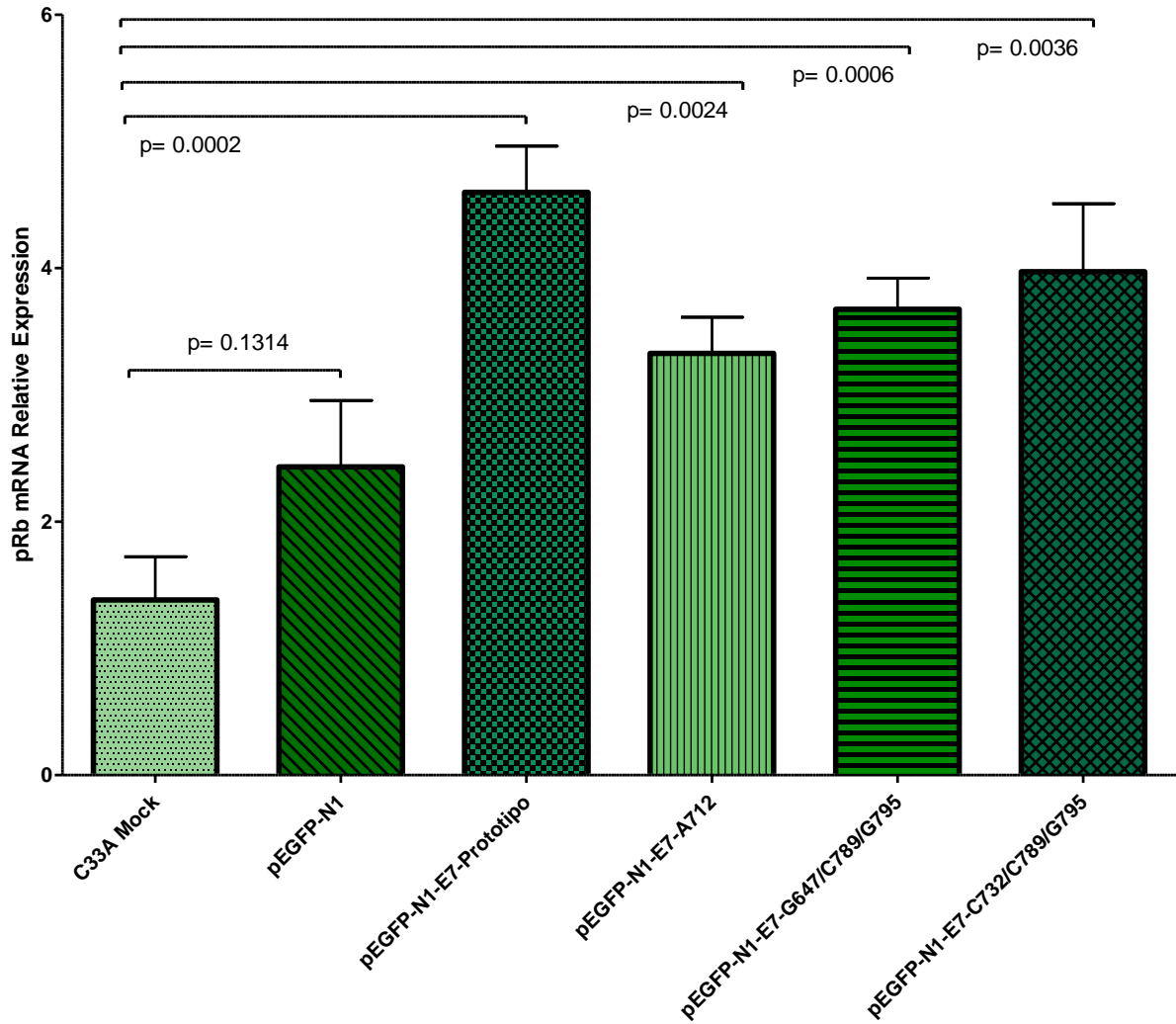


Figura 11. PCR en tiempo real para pRb. Análisis de qPCR para determinar la expresión del mRNA de pRb realizada a partir de cDNA obtenido de células C33-A sin transfectar y transfectadas establemente con pEGFP-N1, pEGFP-N1-E7-prototipo, pEGFP-N1-E7-A712, pEGFP-N1-E7-G647/C789/G795 y pEGFP-N1-E7-C732/C789/G795. Se realizaron 3 experimentos independientes por duplicado, los valores se representan como media y desviación estándar y fueron normalizados con GAPDH. Para la comparación entre grupos se empleó el método U de Mann-Whitney considerándose significativo un valor de $p < 0.05$.

IV. DISCUSIÓN

Diversos autores señalan que el gen E7 es más conservado que su homólogo E6 (Boumba *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2011; Cento *et al.*, 2009), sin embargo, actualmente se sabe que ciertas mutaciones no sinónimas en el gen E7 se encuentran implicadas en el desarrollo del CaCU debido a que presentan mayor interacción con algunas de sus proteínas blanco (El-Abidine *et al.*, 2017). De igual modo, también existen datos que relacionan la frecuencia de mutaciones sinónimas del gen E7 con el desarrollo de CaCU (Lee *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2006; Song *et al.*, 1997). Las mutaciones que presentan las variantes analizadas en este estudio, en su mayoría son sinónimas y, si bien no presentan cambios en la estructura de la oncoproteína E7, si presentan una alta frecuencia en los casos de CaCU, como es el caso de la variante E7-C732/C789/G795 (Antaño-Arias *et al.*, 2020) (Datos no publicados).

Anteriormente se pensaba que las mutaciones sinónimas eran inconsecuentes debido a que se conserva la secuencia primaria de la proteína, sin embargo, actualmente se sabe que dichas mutaciones también están bajo presión evolutiva y que pueden afectar múltiples procesos en los mRNAs como el splicing, la estructura y la estabilidad de los mensajeros (Bali y Bebok, 2015; Hunt *et al.*, 2009). Debido a esto, es que nos propusimos investigar si el hecho de que las variantes presenten una o más mutaciones silenciosas, estaba implicado en que alguna de ellas tuviera menor o mayor expresión de su mensajero comparado con la E7-prototipo. Como se observa en la figura 10, el nivel de expresión de E7 es diferente para cada variante; para el caso de las variantes E7-A712 y E7-G647/C789/G795, el nivel de expresión de sus mensajeros es menor que el nivel de expresión de la E7-prototipo, sin embargo, estos resultados no tienen significancia estadística ($p= 0.2492$ y $p= 0.0937$ respectivamente); por otra parte, se observa un marcado incremento en la expresión del mRNA de la variante E7-C732/C789/G795 comparado con la E7-prototipo, siendo este resultado estadísticamente significativo ($p= 0.0317$).

Hasta el momento, no existen reportes que señalen que las mutaciones silenciosas se encuentren implicadas en la regulación de su mensajero, sin embargo, es importante destacar que la variante E7-C732/C789/G795 presentó un nivel de expresión elevado

comparado con los demás grupos, y este hecho podría correlacionarse con la alta frecuencia que esta variante tiene en muestras de CaCU. Por otra parte, sería interesante analizar cómo estas variantes influyen en procesos post-transcripcionales, ya que se ha demostrado que la mutación de una sola base es suficiente para producir un perfil de splicing diferencial en los mensajeros del VPH 16 (López *et al.*, 2012).

Se sabe que los mRNAs nacientes se pliegan a medida que se transcriben (Frieda y Block, 2012) y considerando que la estructura secundaria del mRNA se basa en apareamiento de nucleótidos, un cambio de nucleótido único puede alterar esta organización considerablemente e influir en gran medida en la formación de la estructura secundaria del mRNA (Bali y Bebok, 2015). Un análisis bioinformático realizado por nuestro grupo de trabajo, observó que en la estructura secundaria de los mRNAs de las variantes E7-A712 y E7-G647/C789/G795 no había alteraciones en el sitio de inicio de la transcripción, sin embargo, para el mRNA de la variante E7-C732/C789/G795, se observaron nuevos apareamientos de bases a lo largo de la estructura del RNA mensajero y a su vez, se observa pérdida de pares de bases en su región 5' (Antaño-Arias *et al*, 2020) (Datos no publicados). Existen reportes de que mutaciones que particularmente se encuentran en la región del sitio de inicio de la traducción, podría alterar la eficiencia de la traducción proteica (Mortimer *et al.*, 2014), además, también se ha demostrado que cambios en la estructura secundaria del mRNA afecta a la afinidad de factores de unión a mRNA como son las proteínas de unión a mRNA (Mitchell y Parker, 2014).

El análisis del nivel de expresión del mRNA de pRb en células C33-A transfectadas transitoriamente con E7-prototipo y las variantes génicas E7-A712, E7-G647/C789/G795 y E7-C732/C789/G795, reveló un incremento en la expresión del mensajero de pRb cuando las células expresaban E7-prototipo y las variantes génicas en comparación con los grupos controles, sin embargo, los resultados obtenidos no tienen significancia estadística. Así mismo, en células transfectadas establemente con los genes de interés, se observa un incremento significativo en la expresión del mensajero de pRb en las células que expresan E7 o las variantes génicas, lo cual sugiere que el hecho de que las células expresen constantemente E7-prototipo o sus

variantes génicas es importante para alterar la expresión del mRNA de pRb. Se ha documentado que el efecto de la oncoproteína E7 con pRb es a nivel proteico (Dick et al., 2000; Songock et al., 2016; Mittal y Banks, 2017), sin embargo, en este estudio se observa un incremento del mRNA de pRb en aquellas células que expresaban E7-prototipo y las variantes génicas.

Se sabe que la línea celular C33-A, que es nuestro modelo de estudio, presenta una forma de pRb mutada; el análisis del mRNA de pRb en esta línea celular, muestra una eliminación de 12 bases en el extremo 5' del exón 20, lo que resulta en la eliminación del marco de lectura de 4 aa. A nivel proteico, esto está implicado en una alteración en la fosforilación de pRb y en una pérdida de su capacidad para formar complejos con la proteína E1A de adenovirus que es homóloga de la proteína E7 del VPH 16 (Scheffner *et al.*, 1991).

Actualmente, existe un estudio donde se analiza el efecto de una variante de E7, la A647G con el cambio de aminoácido N29S, en dicho estudio se describe que esta mutación genera un nuevo sitio de fosforilación para la oncoproteína, confiriéndole una mayor capacidad para interactuar con sus proteínas blanco como pRb e inducir una mayor degradación de esta proteína (El-Abidine *et al.*, 2017), sin embargo, en dicho estudio no se analiza el efecto de las variantes a nivel de mRNA.

Tomando en cuenta los resultados aquí mostrados, pudiéramos inferir que el efecto que se está observando por E7-prototipo y por sus variantes génicas, es como un modulador de la transcripción de pRb. Se ha descrito que E7 interactúa con moduladores de la transcripción, esta oncoproteína puede unirse a las deacetilasas de histonas (HDAC) y desplazarlas de la región promotora para inducir así la transcripción de genes (Longworth *et al.*, 2005), también puede unirse a acetiltransferasas de histonas (HAT) como CBP y P300, los cuales están involucrados en la regulación de muchos genes (Songock *et al.*, 2016). De igual modo, E7 puede unirse a factores generales de la transcripción como TBP y alteran su actividad de unión al DNA (Maldonado *et al.*, 2002), E7 también puede inhibir la actividad del complejo AP-1, contribuyendo a la supresión de genes relacionados con la diferenciación (Gyongyosi *et al.* 2014). Con todo lo anteriormente descrito, es posible inferir que tanto la E7-

prototipo como las variantes aquí analizadas, podrían estar interactuando con alguno de los elementos del proceso de transcripción basal y con ello inducir una mayor producción del mensajero de pRb, sin embargo, es muy probable que aunque las células expresen mayor cantidad de mRNA de pRb, las proteínas que se traduzcan estén siendo eliminadas debido a su degradación por el proteosoma derivada de su interacción con E7 (Liu *et al.*, 2018).

Los datos aquí mostrados, sugieren que el efecto que tiene E7-prototipo y las variantes génicas sobre pRb es como un activador transcripcional indirecto, sin embargo, será necesario analizar su efecto sobre pRb a nivel proteico para poder esclarecer la diferencia de oncogenicidad entre las variantes.

V. CONCLUSIONES

- ❖ Se logró generar una línea celular transfectada establemente con E7-prototipo y con las variantes génicas E7-A712, E7-G647/C789/G795, E7-C732/C789/G795.
- ❖ Las variantes E7-A712 y E7-G647/C789/G795 presentan menor nivel de expresión de su mensajero que la E7-prototipo, sin embargo, la variante E7-C732/C789/G795 presenta una mayor expresión de su mensajero que la E7-prototipo.
- ❖ El nivel de expresión del mRNA de pRb se incrementa en presencia de E7-prototipo y de las variantes génicas E7-A712, E7-G647/C789/G795, E7-C732/C789/G795 tanto en transfecciones transitorias como en las transfecciones estables, siendo más marcado el aumento y con significancia estadística en las transfecciones estables.

VI. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar ensayos de estabilidad de mensajero de los mRNAs de las variantes de E7.
- ❖ Evaluar el nivel de expresión de E7 y pRb a nivel proteico en las transfectantes estables.
- ❖ Realizar un análisis de expresión global de genes en las transfectantes estables para observar si existe alguna diferencia en la modulación de genes entre variantes.
- ❖ Realizar ensayos de proliferación en las transfectantes estables para evaluar si las variantes influyen en que algunas células proliferen más que otras y de este modo observar si existe alguna diferencia en la capacidad oncogénica de cada variante.

VII. ANEXOS

1. Método de extracción de RNA con TRIzol

Homogenizar la muestra habiendo agregado 1 mL de TRIzol.

Reposar el homogenizado durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de proteínas.

Agregar al homogenizado 0.2 mL de cloroformo por cada 1 ml de TRIzol utilizado.

Agitar vigorosamente durante 15 segundos en un vortex.

Incubar el homogenizado durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar la muestra a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C, después de centrifugar la muestra debe estar separada en dos fases, una roja que corresponde a la fase fenol-cloroformo y una fase incolora que corresponde a la fase acuosa, el RNA permanece exclusivamente en esta última fase.

Precipitación del RNA

Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo, guarde la fase orgánica si se desea una posterior extracción del DNA.

Precipitar el RNA de la fase acuosa utilizando isopropanol, agregar 1 mL por cada 1 mL de TRIzol usado en la fase de homogenización.

Incubar las muestras a -80°C durante 60 min.

Centrifugar la muestra a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C, después de centrifugar la muestra, el RNA precipitado a menudo es visible formando un botón al fondo del tubo.

Lavado del RNA

Retirar el sobrenadante y lavar una vez el botón de RNA con 0.75 mL de etanol DEPC al 75% por cada 1 mL de TRIzol utilizado en la homogenización, lavar dando pequeños golpecillos con el dedo en la punta del tubo.

Centrifugar a 7,500 rpm durante 5 min a 4°C.

Decantar el sobrenadante y dejar secar los tubos a temperatura ambiente por 3 min.

Por último, re-suspenda la muestra de RNA en agua libre de RNAsas.

VIII. REFERENCIAS

- Alonso, L.,** Smal, C., Garcia-Alai, M., Chemes, L., Salame, M., y de Prat-Gay, G. (2006). Chaperone holdase activity of human papillomavirus E7 oncoprotein. *Biochemistry*, 45(3): 657–667.
- Antaño-Arias, R.,** Illades-Aguilar, B., del Moral-Hernández, O. (2020). Análisis estructural y funcional de las variantes génicas E7 del VPH 16 presentes en muestras cervicales de mujeres del estado de Guerrero (tesis doctoral, datos no publicados). Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero.
- Asadurian, Y.,** Kurilin, H., Lichtig, H., Jackman, A., Gonen, P., Tommasino, M., *et al.* (2007). Activities of Human Papillomavirus 16 E6 Natural Variants in Human Keratinocytes. *Journal of Medical Virology*, 79: 1751–1760.
- Bali, V.,** y Bebok, Z. (2015). Decoding Mechanisms by which Silent Codon Changes Influence Protein Biogenesis and Function. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 64: 58-74.
- Barbosa, M.,** Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J., Lowy, D., y Vousden, K. (1990). The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *The EMBO Journal*, 9(1): 153–160.
- Bernard, H.,** Calleja-Macias, I. y Terence, S. (2006). Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *International Journal of Cancer*, 118: 1071-1076.
- Boumba, L.,** Assoumou, S., Hilali, L., Mambou, J., Moukassa, D., y Ennaji, M. (2015). Genetic variability in E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus Type 16 from Congolese cervical cancer isolates. *Infectious Agents and Cancer*, 10: 1-7.
- Bray, F.,** Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *A Cancer Journal for Clinicians*, 0: 3–31.
- Bruni, L.,** Diaz, M., Castellsagué, X., Ferrer, E., Bosch, F., y de Sanjosé, S. (2010). Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(12): 1789–1799.
- Buchkovich, K.,** Duffy, L., y Harlow, E. (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*, 58: 1097-1105.
- Cento, V.,** Ciccozzi, M., Ronga, L., Perno, C., y Ciotti, M. (2009). Genetic diversity of Human Papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 genes in italian women with different grades of cervical lesions. *Journal of Medical Virology*, 81: 1627–1634.
- Chau, B.,** y Wang, J. (2003). Coordinated regulation of life and death by RB. *Nature Reviews Cancer*, 3: 130-138.

Cheng, S., Schmidt-Grimminger, D., Murant, T., Broker, T., y Chow, L. (1995). Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes and Development*, 9(19): 2335–2349.

Clemente-Perivan, S., Illades-Aguilar, B., Organista-Nava, J. (2019). Efecto de E7 de referencia y de su variante C732/C789/G795 del VPH 16 sobre la expresión de las isoformas de Oct4 (tesis de maestría). Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero.

De Villiers, E., Fauquet, C., Broker, T., Bernard, H., y Zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1): 17–27.

Dick, F., Sailhamer, E., y Dyson, N. (2000). Mutagenesis of the pRB pocket reveals that cell cycle arrest functions are separable from binding to viral oncoproteins. *Molecular and Cellular Biology*, 20(10): 3715-3727.

Ding, T., Wang, X., Ye, F., Cheng, X., Lu, W., y Xie, X. (2010). Distribution of Human Papillomavirus 16 E6/E7 variants in cervical cancer and intraepithelial neoplasia in chinese women. *International Journal of Gynecological Cancer*, 20(8): 1391–1398.

El-Abidinea, A., Tomaić, V., Rhoumaa, R., Massimic, P., Guizania, I., Boubaker, S., *et al.* (2017). A naturally occurring variant of HPV-16 E7 exerts increased transforming activity through acquisition of an additional phospho-acceptor site. *Virology*, 500: 218–225.

Ewens, K., Bhatti, T., Moran, K., Richards-Yutz, J., Shields, C., Eagle, R., *et al.* (2017). Phosphorylation of pRb: mechanism for RB pathway inactivation in MYCN-amplified retinoblastoma. *Cancer Medicine*, 6(3): 619-630.

Frieda, K., y Block, S. (2012). Direct observation of cotranscriptional folding in an adenine riboswitch. *Science*, 338(6105): 397–400.

Halbert, C., Demers, W., y Galloway, D. (1991). The E7 gene of Human Papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *Journal of Virology*, 65(1): 473-478.

Hunt, R., Sauna Z., Ambudkar S., Gottesman, M. y Kimchi-Sarfaty, C. (2009). Silent (synonymous) SNPs: should we care about them?. *Methods in Molecular Biology*, 578: 23-39.

Hwang, S., Lee, D., Kim, J., Seo, T., y Choe, J. (2002). Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(4): 2923–2930.

Kehn, K., de la Fuente, C., Strouss, K., Berro, R., Jiang, H., Brady, J., *et al.* (2005). The HTLV-I Tax oncoprotein targets the retinoblastoma protein for proteasomal degradation. *Oncogene*, 24: 525–540.

Klingelhutz, A., Roman, A., 2012. Cellular transformation by humanpapillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology*, 424(2): 77–98.

Lazarczyk, M., Cassonnet, P., Pons, C., Jacob, Y., y Favre, M. (2009). The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2): 348–370.

Lee, C., Bae, J., Lee, S., Ho, E., Lee, I., Park, Y., y Park, J. (2011). Distribution of human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variants in the progression of cervical dysplasia in Korean women. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 37(10): 1320–1326.

Liu, H., Wang, J., Liu, Y., Hu, L., Zhang, C., Xing, B., *et al.* (2018). Human U3 protein14a is a novel type ubiquitin ligase that binds RB and promotes RB degradation depending on a leucine-rich region. *BBA-Molecular Cell Research*, 1865(11 Pt A): 1611-1620.

López, E., Valdés, J., Bonilla-Moreno, R., Martínez-Salazar, M., Martínez-García, M., Berumen, J., y 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: 43-53.

Longworth, M., Wilson, R., y Laimins, L. (2005). HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *The EMBO Journal*, 24(10): 1821–1830.

Maldonado, E., Cabrejos, M., Banks, L., y Allende, J. (2002). Human papillomavirus-16 E7 protein inhibits the DNA interaction of the TATA binding transcription factor. *Journal of Cellular Biochemistry*, 85(4): 663–669.

Massimi, P. y Banks, L. (2000). Differential phosphorylation of the HPV-16 E7 oncoprotein during the cell cycle. *Virology*, 276(2): 388–394.

McBride, A. (2017). Oncogenic human papillomaviruses. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 372: 20160273.

McLaughlin-Drubin, M., Huh, K., y Münger, K. (2008). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. *Journal of Virology*, 82(17): 8695-8705.

Mitchell, S. y Parker, R. (2014). Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Molecular Cell*, 54: 547–58.

Mortimer, S., Kidwell, M. y Doudna, J. (2014). Insights into RNA structure and function from genome-wide studies. *Nature Reviews Genetics*, 15: 469–479.

Mittal, S., y Banks, L. (2017). Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutation Research*, 772: 23–35.

Munger, K., Basile, J., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S., Grace, M., y Zacny, V. (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*, 20(54): 7888–7898.

Niccoli, S., Abraham, S., Richard, C. y Zehbe, I. (2012). The asian-american E6 variant protein of human papillomavirus 16 alone is sufficient to promote immortalization, transformation, and migration of primary human foreskin keratinocytes. *Journal of Virology*, 86(22): 12384–12396.

Nolan, T., Hands, R., y Bustin, S. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3): 1559-1582.

Organista-Nava, J., Gómez-Gómez, Y., Ocadiz-Delgado, R., García-Villa, E., Bonilla-Delgado, J., Lagunas-Martínez, A., Santa-Olalla Tapia, J., Lambert, P., García-Carrancá, A., y

Gariglio, P. (2016). The HPV16 E7 oncoprotein increases the expression of Oct3/4 and stemness-related genes and augments cell self-renewal. *Virology*, 499: 230–242.

Organización Mundial de la Salud. (2018). Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. En línea. Consultado 25 de Octubre del 2018. Disponible en: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)

Roman, A., y Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, 445: 138–168.

Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J., y Howley, P. (1991). The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5523-5527.

Shin, M., Balsitis, S., Brake, T., y Lambert, P. (2009). Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21cip1 in cervical carcinogenesis. *Cancer Research*, 69(14): 5656-5663.

Sichero, L., Sobrinho, J. y Villa, L. (2012). Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. *Virology*, 432: 127–132.

Smotkin, D. y Wettstein, F. (1987). The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *Journal of Virology*, 61(5): 1686–1689.

Song, Y., Kee, S., Kim, J., Park, N., Kang, S., Chang, W., *et al* (1997). Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of korean women. *Gynecologic Oncology*, 66: 275–281.

Songock, W., Kim, S., y Bodily, J. (2016). The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription. *Virus Research*, 1-20.

Spencer, P., Siller, E., Anderson, J. y Barral, J. (2012). Silent substitutions predictably alter translation elongation rates and protein folding efficiencies. *Journal of Molecular Biology*, 422(3): 328–335.

Tsakogiannis, D., Papadopoulou, A., Kontostathi, G., Ruether, I., Kyriakopoulou, Z., Dimitriou, T., *et al.* (2013). Molecular and evolutionary analysis of HPV 16 E6 and E7 genes in Greek women. *Journal of Medical Microbiology*, 62: 1688–1696.

Vande, S. y Klingelutz, A. (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 445: 115–137.

Wiest, T., Schwarz, E., Enders, C., Flechtenmacher, C., y Bosch, F. (2002). Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene*, 21: 1510-1517.

Wu, Y., Chen, Y., Li, L., Yu, G., y He, Y. (2006). Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *Journal of General Virology*, 87: 1181–1188.

Yang, L., Yang, H., Wu, K., Shi, X., Ma, S., y Sun, Q. (2014). Prevalence of HPV and variation of HPV 16 / HPV 18 E6/E7 genes in cervical cancer in women in south west China. *Journal of Medical Virology*, 86: 1926–1936.

Zatsepina, O., Braspenning, J., Robberson, D., Hajibagheri, M., Blight, K. J., Ely, S., *et al.* (1997). The human papillomavirus type 16 E7 protein is associated with the nucleolus in mammalian and yeast cells. *Oncogene*, 14(10): 1137–1145.

Zerfass, K., Schulze, A., Spitkovsky, D., Friedman, V., Henglein, B., y Jansen-Dürr, P. (1995). Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *Journal of Virology*, 69(10): 6389-6399.

Zúñiga-Alviar, L., Illades-Aguiar, B., Ortiz-Ortiz, J. (2019). Análisis del efecto de las variantes génicas E7 del VPH 16 en la proliferación celular (tesis de maestría). Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero.