



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de las proteínas E1 y E2 de VPH18 en la modulación de estrés oxidante

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

QFB María Cecilia González García

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Marcela Lizano Soberón

Instituto Nacional de Cancerología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María Elena Ibarra Rubio

Facultad de Química UNAM

Dra. Claudia María García Cuéllar

Instituto Nacional de Cancerología

Ciudad de México. Diciembre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos académicos

A mi *alma mater* la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas y en especial a la Facultad de Química por brindarme la oportunidad y medios para mi formación y crecimiento tanto personal como profesional.

A los profesores e investigadores que marcaron cada etapa de mi camino.

Al laboratorio de Epidemiología y Biología molecular de Virus Oncogénicos, del Instituto Nacional de Cancerología donde se realizó este trabajo.

A mi tutora la Dra. Marcela Lizano Soberón por la confianza depositada en mí y por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto que se logró gracias a su apoyo y enseñanzas.

A los miembros de mi Comité tutorial: la Dra. María Elena Ibarra Rubio y la Dra Claudia María García Cuéllar, por sus aportaciones para que este proyecto tomara su curso.

A los miembros de mi Jurado de Examen: la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, el Dr. José Pedraza Chaverri, el Dr. Vicente Madrid y el Dr. Jaime Berumen, por sus revisiones y comentarios que enriquecieron y dieron forma a esta tesis.

A mi maestro el Dr. Joaquín Manzo Merino por sus valiosas aportaciones, por orientarme y enseñarme todo lo requerido para la realización de este proyecto de principio a fin.

Al CONACyT por otorgarme la beca de formación de posgrado de excelencia, inscrita bajo el número 589812.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para asistir al LVIII ICGB DNA TUMOUR VIRUS MEETING 2015, llevado a cabo en Trieste, Italia para la presentación del trabajo escrito: HPV- E2 DECREASED SOD LEVELS IN HEK293 CELL LINE WHEN WAS COTRANSFECTED WITH HPV-E1.

Al PAPIIT-UNAM (IN206214) y al CONACyT México (CB-166808) por el financiamiento de este proyecto.

Agradecimientos personales

A mi madre Ma. Gloria, gracias corazón por tu incansable esfuerzo, por tu ejemplo de responsabilidad y perseverancia, por mostrarme que, si trabajo lo suficiente, los sueños se vuelven realidad. Agradezco tu amor, tu apoyo incondicional, tu entrega y tu compromiso, ¡gracias mamá por ser mi fuente de inspiración y superación! Y, sobre todo, gracias por creer en mí.

Gracias Papá porque has sido mi ejemplo, porque sembraste en mí esas ganas de seguir aprendiendo en todo momento, porque guiaste mis pasos a través del conocimiento y me mostraste un camino que, aunque ha sido difícil, me ha llenado de satisfacción el recorrerlo.

Gracias hermana por ser un gran apoyo, porque tu amor me permitió levantarme de los momentos menos afortunados y de gran crecimiento, gracias por tus cuidados y atenciones, por tus palabras de aliento.

Gracias Joak por confiar en mí, por ser mi tutor, mi amigo, mi guía. Gracias por llevarme de la mano a dar los primeros pasos en esta travesía llamada ciencia, por mostrarme y llevarme a nuevos horizontes, por siempre exigir lo mejor de mí y por dar lo mejor de ti. Cada enseñanza, cada palabra de aliento, incluso cada reprimenda, todos esos aprendizajes los llevo no sólo en mi mente, sino en mi corazón, porque no solo me mostraste a trabajar en excelencia, sino también a amar lo que hacemos ¡Grazie mille!

Agradezco a mis compañeros de laboratorio que más que eso, considero mis amigos, con los que compartí tantos días de trabajo tan divertidos y enriquecedores, gracias por hacer de mi estancia en el laboratorio una de las mejores aventuras y retos de mi vida, gracias por enseñarme tanto. Alfred, te agradezco las incontables anécdotas que vivimos, el ser mi compañero en este proyecto, el compartir tanto, gracias por tan buenas pláticas y fructíferas discusiones, por tan gratos momentos. Gracias Omar, porque de ti me llevo la pasión que pones en el quehacer de la ciencia. Gracias Leslie porque tu calidad y calidez humana me mostraron que además del trabajo duro este camino se hizo para disfrutarlo. Gracias Cesar por tu apoyo, tu compañía y por nuestras pláticas de horas y horas. Gracias Leito por ser mi amigo, porque incluso los días de trabajo incansable se me hacían pasajeros, gracias por tu compromiso que es contagioso y por apoyarme tanto. Gracias Elenaé, Fredy, Ime y Adelita por apoyarme y por recibirme en su laboratorio.

Dedicatoria

A mi madre, mi ser de luz,
con amor y admiración.

...A hombros de gigantes.

Índice

Contenido	Página
Abreviaturas	i
Resumen	ii
1. Marco teórico	1
1.1. Cáncer cervicouterino	1
1.2. Etiología del cáncer cervicouterino	1
1.3. Virus del papiloma humano	2
1.4. Organización del genoma viral	3
1.5. Proteína E1	5
1.6. Proteína E2	7
1.7. Ciclo viral	8
1.8. Carcinogénesis cervical	10
1.9. El estrés oxidante como factor para la carcinogénesis	12
1.10. Estrés oxidante	13
1.11. Especies reactivas de oxígeno	15
1.12. Fuentes de especies reactivas de oxígeno	16
1.13. Daño generado por el estrés oxidante	18
1.14. Sistema antioxidante	19
2. Antecedentes	21
3. Justificación	23
4. Hipótesis	24
5. Objetivo	24
5.1. Objetivo general	24
5.2. Objetivos particulares	24
6. Materiales y Métodos	25
6.1. Diseño experimental	25
6.2. Plásmidos	26
6.3. Transformación	26
6.3.1. Bacterias competentes	26
6.3.2. Transformación	26
6.3.3. Aislamiento y purificación de DNA de plásmidos	27
6.4. Líneas celulares	27
6.5. Transfección	28
6.6. Western Blot	29
6.6.1. Extracción de proteínas	29
6.6.2. Determinación de la concentración de proteínas	30
6.6.3. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	30
6.6.4. Transferencia	30
Contenido	Página

6.6.5. Bloqueo de membrana	30
6.6.6. Incubación con anticuerpos	31
6.6.7. Reconocimiento de anticuerpos	31
6.7. Inmunofluorescencia	31
6.8. Detección de especies reactivas de oxígeno	32
6.9. Análisis estadístico	33
7. Resultados	34
7.1. E1 y E2 de VPH18 se expresan en las líneas celulares HEK-293 y U-2 OS	34
7.2. E1 y E2 de VPH18 modulan niveles de enzimas antioxidantes	37
7.3. Las proteínas de expresión temprana E1 y E2 de VPH18 incrementan los niveles de especies reactivas de oxígeno	39
7.4. E1 y E2 de VPH18 inducen daño a DNA medido por fosforilación de H2AX	40
8. Discusión	42
9. Conclusiones	49
9.1. Conclusiones particulares	49
9.2. Conclusión general	49
10. Perspectivas	50
11. Referencias bibliográficas	51
12. Anexos	57
12.1. Anexo 1: Soluciones y medios de cultivo	57

Efecto de las proteínas E1 y E2 del
Virus del Papiloma Humano tipo 18
en la modulación de estrés oxidante

Abreviaturas

VPH	Virus del papiloma humano (<i>HPV, Human papillomavirus</i>).
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
RNA	Ácido ribonucleico.
dsDNA	DNA de doble cadena (del inglés <i>double strain DNA</i>).
VPH-AR	Virus del papiloma humano de alto riesgo.
VPH-BR	Virus del papiloma humano de bajo riesgo.
DBD	Dominio de unión a DNA.
TAD	Dominio de transactivación.
IARC	Agencia Internacional para la investigación en cáncer (del inglés <i>International Agency for Research in Cancer</i>).
cGMP	Guanosinamonofofosfato cíclico.
SIL	Lesiones intraepiteliales escamosas (del inglés <i>squamous intraepithelial lesion</i>).
ATP	Adenosintrifosfato.
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>Reactive oxygen species</i>).
CAT	Catalasa.
SOD	Superóxido dismutasa.
GPX	Glutación peroxidasa.
GSH	Glutación reducido.
GSSG	Glutación oxidado.
GRX	Glutación reductasa.
NOXs	Dinucléotido de nicotinamida y adenina fosfato oxidasas (del inglés <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases</i>).
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
RIPA	Amortiguador de radioinmunoprecipitación.
Cbp	Cuanto baste para.
PBS	Solución salina amortiguador de fosfatos.
HA	Hemaglutinina.
mitDNA	DNA mitocondrial.

RESUMEN

La infección persistente por los tipos de alto riesgo del Virus del Papiloma Humano (VPH) está asociada al desarrollo de cáncer cervicouterino (CaCu), cáncer de vulva, vagina, pene, ano y algunos tipos de cáncer de cabeza y cuello. En la búsqueda de los mecanismos que le brindan al virus esta capacidad oncogénica, se ha encontrado que la actividad de las oncoproteínas E6 y E7 es esencial para el proceso de transformación maligna y que la integración del genoma viral al genoma celular, un evento que promueve la sobreexpresión de E6 y E7, puede ser un evento detonante de la carcinogénesis inducida por VPH. Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de las infecciones por VPH progresan a cáncer, resaltando el hecho de que, además del virus, se requieren factores genéticos y/o ambientales para el desarrollo de una neoplasia. Estos factores aún no se han elucidado por completo, pero diversos estudios sugieren que el estrés oxidante podría jugar un papel importante en el desarrollo de los diversos tipos de cáncer inducidos por el VPH. Se ha encontrado que hay un aumento en los niveles de estrés oxidante aunado a una disminución en los niveles de compuestos antioxidantes en muestras de pacientes con CaCu y en líneas celulares derivadas de éste cáncer, contrario a lo observado en muestras de sujetos sanos. A pesar de estos datos, la contribución del estrés oxidante al desarrollo del cáncer cervicouterino se ha sido poco explorado y aún no se conoce en su totalidad el papel que las proteínas virales pudieran ejercer en este proceso. Por dichos motivos decidimos evaluar si las proteínas E1 y E2 del VPH tipo18 (VPH18), que se expresan tempranamente durante la infección, son capaces de modular el estado redox celular.

En este trabajo encontramos que las proteínas E1 y E2 del VPH18 inducen una disminución estadísticamente significativa de la enzima antioxidante superóxido dismutasa 2 y que esto se refleja en un incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células transfectadas que expresan individualmente o en conjunto E1 y E2 de VPH18. En contraste, E1 del VPH11 (uno de los principales tipos de VPH de bajo riesgo carcinogénico) no generó este efecto. Además, encontramos un aumento en la ruptura de la doble cadena de ácido desoxirribonucleico (DNA) que podría estar asociado al incremento de los niveles del anión superóxido, probablemente debido a la inhibición que ejercen las proteínas virales sobre la SOD2.

Estos resultados plantean un nuevo escenario por elucidar en el que las proteínas no oncogénicas E1 y E2 de los virus del papiloma humano de alto riesgo, puedan participar en el desarrollo del tumor mediante la generación de alteraciones metabólicas, daño oxidante a moléculas clave, alteración de vías de señalización o daño al DNA.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una de las neoplasias más frecuentes en el mundo, tan solo en el 2012 se informaron 528 000 nuevos casos y más de la mitad de estas pacientes fallecieron, ocupando así la cuarta causa en incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres¹. De acuerdo con la Agencia internacional para la investigación en cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), los países más afectados, en los que se presentan cerca del 85% de pacientes, son aquellos con menor nivel de desarrollo². En nuestro país, el CaCu representa un grave problema de salud pública puesto que anualmente se reportan 13,960 casos nuevos³, siendo entonces la segunda causa en incidencia y mortalidad por neoplasias en mujeres^{2,4}. Así mismo, la importancia social de esta enfermedad se acentúa por la temprana edad promedio de muerte, alrededor de los 50 años, cuando las mujeres frecuentemente aún están en la crianza de sus familias^{5,6}.

El desarrollo del CaCu es un proceso gradual que en etapas precancerosas presenta lesiones caracterizadas por un crecimiento anormal de células epiteliales. Estas lesiones van desde un grado menor a uno severo⁷. En la actualidad, existen varios esquemas de tamizaje que buscan detectar estas lesiones tempranas que preceden al cáncer, a los cuales se ha aunado la administración de las vacunas profilácticas Cevaxix® (Glaxo Smith Kline) dirigida contra el virus del papiloma humano (VPH) de los tipos 16 y 18 y Gardasil® (Merck & Co) dirigida contra VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18, las cuales previenen infecciones primarias. Estas vacunas junto con la exploración citológica frecuente se han establecido en algunos países como parte de su infraestructura de salud pública. Sin embargo, como se mencionó, el CaCu continúa teniendo altas tasas de mortalidad y morbilidad⁸.

1.2. Etiología del cáncer cervicouterino

En los años 70 Zur Hausen y colaboradores aportaron evidencias, mediante numerosos estudios epidemiológicos y moleculares, que establecieron al VPH como el agente etiológico del cáncer cervicouterino⁹⁻¹¹. Más adelante, otros estudios reconocieron al VPH como el principal factor de riesgo de desarrollo de otros tumores como lo son el cáncer de vulva, vagina, pene, ano y algunos de los cánceres de cabeza y cuello^{12,13}. Esto permitió definir y reconocer absolutamente al VPH como un agente carcinógeno¹⁴.

De esta manera, ahora se sabe que la infección persistente con ciertos tipos del virus del papiloma humano es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervicouterino y los otros tipos de cáncer asociados¹⁵.

La infección por el VPH se transmite principalmente por vía sexual a través del contacto directo entre piel-piel o piel y mucosas^{16,17}. Se considera una enfermedad de transmisión sexual muy común en todo el mundo, dado que la mayoría de las personas sexualmente activas son infectadas por algún tipo de VPH alguna vez en su vida ^{6,18,19}. Entre los factores de riesgo de infección por VPH se encuentran un alto número de parejas sexuales, una edad temprana de inicio de relaciones sexuales, el consumo de tabaco y el uso prolongado de anticonceptivos orales^{6,20}.

A pesar de que numerosos esfuerzos han generado un progreso significativo en los conocimientos de los mecanismos oncogénicos de este virus, aún existen mecanismos por descubrir⁷ que, aunados a la vacunación y tamizaje, podrían permitir el desarrollo de estrategias terapéuticas contra el CaCu, de ahí la importancia de la comprensión de las bases moleculares de la carcinogénesis promovida por el VPH.

1.3. Virus del papiloma humano

Los papilomavirus humanos son una familia de virus no envueltos pertenecientes a la familia *Papillomaviridae*, de alrededor de 55 nm. Presentan una cápside icosaédrica de 72 unidades que en conjunto rodean al genoma circular de DNA de doble cadena de aproximadamente 8,000 pb^{21,22} (figura 1).

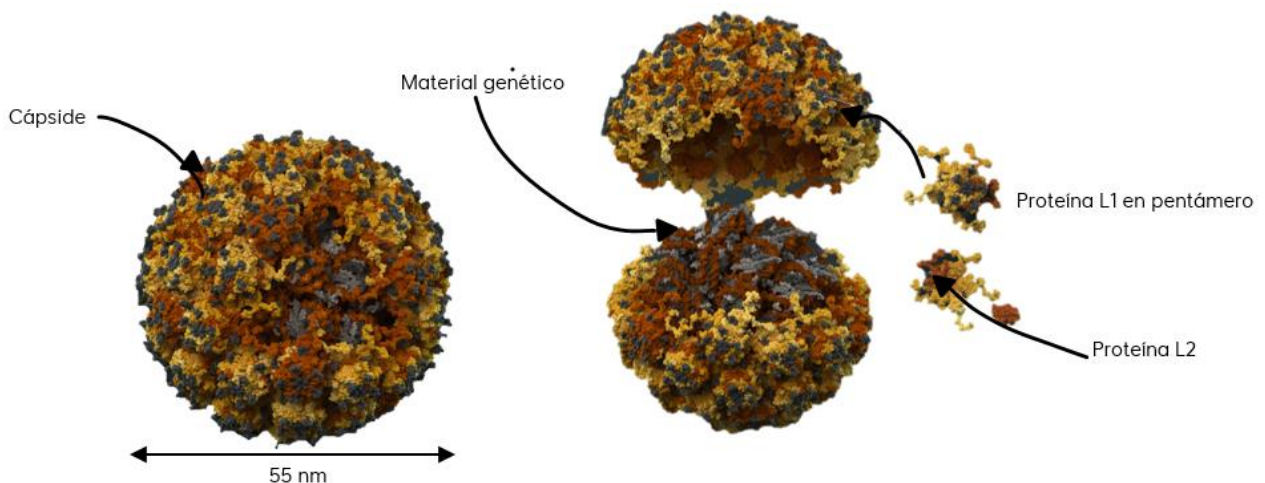


Figura 1. **Modelo tridimensional del VPH.** Se muestra el material genético (dsDNA) rodeado de la cápside, conformada por 72 unidades conocidas como capsómeros, que a su vez están constituidos por las proteínas L1 y L2. Tomado de <http://visual-science.com/projects/human-papillomavirus/3d-model/> Konstantinov, I., et al²².

A la fecha se han identificado 174 tipos de VPH que infectan al humano²⁰, alrededor de 40 de ellos infectan epitelios de la región anogenital y presentan un tropismo característico por un tejido mucoso o escamoso (cutáneo)²³. Los papilomavirus causan tumores benignos (verrugas o papilomas) en estos epitelios y, como se mencionó, en algunas ocasiones estas proliferaciones progresan a cáncer.

En consecuencia, los papilomavirus que infectan al humano se clasifican en tipos de alto o bajo riesgo de acuerdo con su potencial oncogénico, esto con base en su presencia en lesiones cervicales de bajo grado (premalignas), o en lesiones de alto grado y cáncer invasor. Los VPH del tipo 16 (VPH16) y del tipo 18 (VPH18) son los tipos virales más frecuentemente encontrados en cáncer, se les atribuye el 70% de los casos de CaCu y por lo tanto se consideran como tipos de alto riesgo (VPH-AR). Mientras que, aquellos tipos de virus que raramente se encuentran en lesiones cancerosas y que causan verrugas genitales son considerados de bajo riesgo (VPH-BR)., tales como el 11 y el 6 En la [tabla 1](#) se presenta esta clasificación de los VPH^{15,13}.

Tabla 1. Clasificación de los tipos de VPH por su oncogenicidad cervical	
Virus de alto riesgo (VPH-AR)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Virus probablemente de alto riesgo	26, 53, 66, 68, 73, 82
Virus de bajo riesgo (VPH-BR)	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Tomado de Munoz, et al.¹⁹

1.4. Organización del genoma viral

El genoma del VPH ([figura 2](#)) presenta una organización que es similar en los distintos tipos virales y está comprendida por tres regiones funcionales: la región de expresión temprana E (del inglés *early*) codifica para las proteínas no estructurales E1, E2, E4, E5, E6 y E7; la región de expresión tardía L (*late ídem*), que codifica para las proteínas estructurales mayor L1 y menor L2 de la cápside; y una región no codificante larga de control LCR (por sus siglas en inglés), que contiene el origen de replicación y las secuencias de elementos de regulación de la expresión del genoma viral, la cual se encuentra intermedia entre las otras dos regiones²¹.

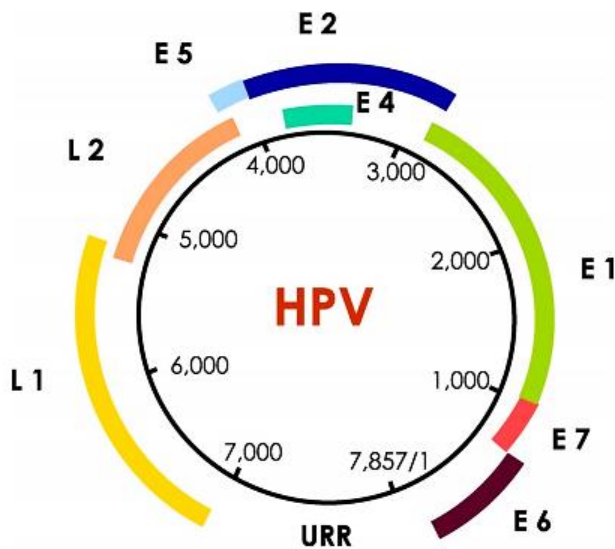


Figura 2. **Esquema de la organización del genoma circular del VPH.** En colores se muestran los distintos marcos abiertos de lectura (ORF's) para los genes de expresión temprana E6 (guinda), E7 (rosa), E1 (verde), E2 (azul), E4 (turquesa), E5 (azul claro); y para los genes de expresión tardía L2 (anaranjado) y L1 (amarillo). También se muestra la región larga de control LCR o URR (Upstream regulation region) Tomado de Munoz, *et al.*¹⁹

Las proteínas de expresión temprana son necesarias para la replicación viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular, esto último en el caso de los VPH-AR. Por otro lado, la región larga de control es una secuencia URR (Upstream regulatory region) que contiene una gran cantidad de elementos de regulación que rigen la expresión y replicación de los genes virales y carece de marcos abiertos de lectura. La función de cada proteína viral se resume en la [tabla 2](#), sin embargo, este trabajo se centra en el papel de las proteínas E1 y E2 que se explican a mayor detalle más adelante.

Tabla 2. Principales funciones de las proteínas del VPH

Proteína	Función en el ciclo viral	Actividad
E1	Replicación del genoma viral	Actividad de unión a DNA, helicasa y ATPasa
E2	Transcripción de genes virales Replicación del genoma viral Mantenimiento del genoma viral	Transactivación/trans-represión, actividad de unión a DNA, segregación mitótica del DNA viral
E4	Participa en la fase productiva del ciclo viral, se asocia al proceso de liberación de partículas virales	Destrucción de la red de queratina e inducción de arresto del ciclo celular en fase G ₂ M
E5	Involucrada en la proliferación e inhibición de la apoptosis	Interviene en varias vías de señalización celular asociadas a factores de crecimiento.
E6	Reactivación de los mecanismos celulares de replicación, proliferación, inmortalización, inhibición de la apoptosis. Mantenimiento del genoma viral.	Interacción e inducción de la degradación de varias proteínas celulares como p53, E6AP, c-Myc, FADD, Caspasa 8 y proteínas con dominios PDZ.

E7	Reactivación de los mecanismos celulares de replicación, proliferación, immortalización. Mantenimiento del genoma viral.	Interacción e inactivación con varias proteínas celulares como Rb, HDAC, E26F, p21, p27, CDK/ciclina, ATM, ATR.
L1	Principal proteína de la cápside	Proteína mayoritaria que conforma los capsómeros.
L2	Proteína menor de la cápside	Proteína minoritaria que conforma los capsómeros, además participa en la introducción del genoma viral dentro del núcleo y posteriormente en el encapsulamiento del mismo en las etapas tardías de la replicación viral.

Modificado de Kajitani *et al.* ²⁴

1.5. Proteína E1

La proteína E1 es la única enzima codificada en el VPH por el gen *E1* que, a su vez, es el gen más grande (~2,000 pb) y conservado entre los papilomavirus, tiene un papel central y esencial en el ciclo del VPH, específicamente en el inicio y catalización de la síntesis del DNA viral.

La proteína E1 presenta de 593 a 681 residuos de aminoácidos con un peso molecular de alrededor de 72 KDa, dependiendo del tipo viral, está conformada por tres segmentos funcionales (*figura 3*): El segmento amino terminal contiene la región regulatoria para la replicación, así como señales que permiten su entrada y salida del núcleo de la célula hospedera, enseguida, en la región central de la proteína, se encuentra el dominio de unión a DNA o DBD (por sus siglas en inglés) que reconoce los sitios del inicio de la replicación. En el otro extremo se encuentra el dominio carboxilo terminal que posee la actividad enzimática de helicasa 3'→5', y de unión e hidrólisis de ATP, por lo que también se le conoce como dominio helicasa o HD (por sus siglas en inglés) ²⁵⁻²⁸.

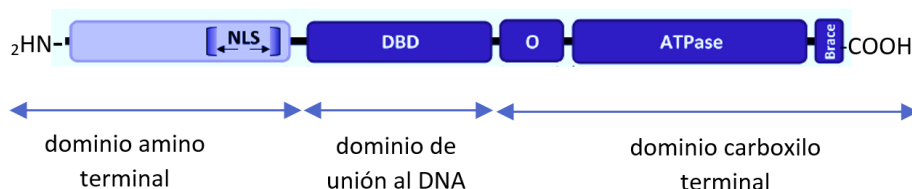


Figura 3. **Diagrama que muestra los diferentes dominios comunes de la proteína E1.** La proteína E1 está constituida por tres dominios: En el dominio amino terminal se encuentra la secuencia de localización nuclear que permite el ingreso de E1 en el núcleo de la célula infectada. El dominio de unión a DNA, DBD, con una estructura de asa y una de hélice de unión a DNA cargadas positivamente y a un costado se encuentra el dominio carboxilo terminal que se puede dividir en tres regiones: la región de oligomerización, O, la región con actividad enzimática helicásica y la de unión e hidrólisis de ATP, al final se encuentra una región conocida como *brace* que estabiliza el oligómero de E1. Tomado de Bergvall, *et al.* ²⁸.

interacción con la proteína viral E2, pues este complejo de E2-E1 posee una mayor especificidad por el origen de replicación, posteriormente E1 forma un homohexámero con mayor capacidad para desenrollar la doble hélice²⁵.

De este modo, con asistencia de E2, la proteína E1 se une específicamente al sitio de origen de replicación en el genoma viral, tras lo cual se induce el ensamblaje de la forma activa de E1 como helicasa de DNA 3'→5', un complejo enzimático que está conformado por un doble hexámero de E1 con ATP's intercalados. Varios factores celulares de replicación son secuestrados, ya sea para su reclutamiento o interacción, y forman un complejo mayor capaz de iniciar la replicación. De este modo con ayuda de E1 y E2 el VPH se vale de la maquinaria de la célula infectada para la síntesis de su propio genoma²⁹. En la [figura 4](#) se representa un modelo del complejo de interacción entre las proteínas E1 y E2.

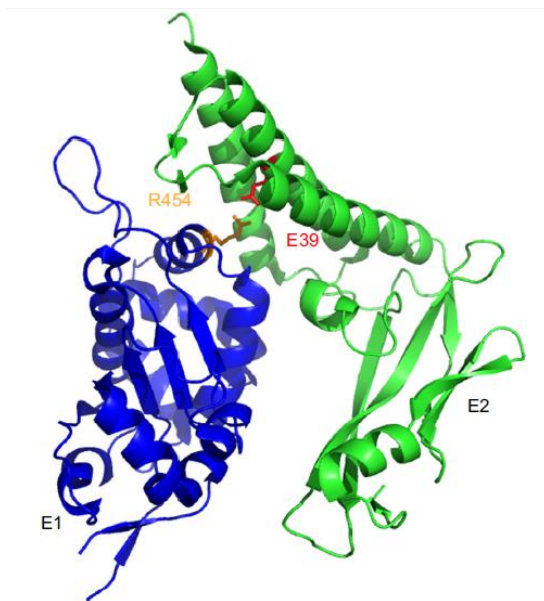


Figura 4. Estructura del complejo E1-E2 de VPH 18 que participa en la replicación del genoma viral. En este complejo se muestra la interacción entre el fragmento carboxilo terminal de E1 con el dominio de transactivación de E2. Este complejo participa en la replicación del genoma viral. En color anaranjado se resalta la arginina 453 de E1 que forma un puente salino interno con el ácido glutámico 39 de E2 resaltado en color rojo. Tomado de McBride, *et al.*³⁰.

Más allá de la unión al DNA y la actividad de helicasa, E1 es capaz de interactuar con muchas proteínas de la célula hospedera, como los factores para inicio de la replicación (DNApol α , SSBs) u otros factores celulares como la histona H1, el complejo remodelador de cromatina Ini-1/SNF5, así como las chaperonas moleculares HSP40 y HSP70, entre otros²⁷. La capacidad de estas múltiples interacciones proteína-proteína y proteína-DNA hacen factible que E1 pueda interactuar con otros elementos de la célula huésped y participar en mecanismos que aún no están descritos.

1.6. Proteína E2

La proteína E2 es una proteína reguladora con capacidad de unión al DNA y a otras proteínas, E2 juega un papel esencial para todos los papilomavirus pues participa en muchos procesos celulares principalmente asociados a la replicación y transcripción del DNA viral.

Esta proteína de 300-500 residuos de aminoácidos consiste en dos dominios conservados, separados por una región intermedia (*figura 5*): en la región amino terminal se encuentra el dominio de transactivación (TAD, por sus siglas en inglés) que consta de alrededor de 200 aminoácidos, este dominio es importante para la regulación de la transcripción de los genes virales, así como para la replicación y para la interacción tanto con E1 (*figura 4*) como con factores celulares; a continuación, en la región carboxilo terminal se encuentra el dominio de unión a DNA y de dimerización (DBD por sus siglas en inglés). Este dominio que tiene de 85 a 100 residuos de aminoácidos, reconoce y se une a secuencias específicas con el motivo palíndromo ACCGN₄CGGT que se localizan principalmente en la URR del genoma viral. Asimismo, a través de este dominio se forman dímeros estables de E2 en diferentes papilomavirus. Entre estos dos dominios se encuentra la región *hinge* o bisagra codificada por una secuencia variable que depende del tipo viral. Esta región no participa en las funciones básicas de replicación y transcripción, se cree que funciona como espaciador entre los dominios DBD y TAD para evitar el impedimento estérico. Sin embargo participa como auxiliar en la localización intracelular, unión a cromatina y estabilidad de E2³⁰.

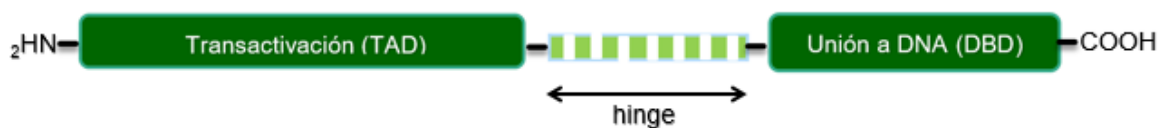


Figura 5. **Esquema que muestra los distintos dominios de la proteína E2.** La proteína E2 consta de tres regiones: La región que une al TAD y DBD es flexible se conoce como *hinge*, se muestra en un tono más claro y punteado porque su longitud es variable y depende del tipo viral. TAD, dominio de transactivación, DBD, dominio de unión a DNA.

La proteína E2 funciona principalmente reclutando factores celulares hacia el genoma viral a través de su unión a la región reguladora. Estos factores celulares están involucrados

principalmente en la transcripción, replicación y segregación mitótica, la regulación de estos procesos depende del contexto de los sitios de unión, así como de los factores celulares reclutados^{31,32}. Además, E2 se asocia con la cromatina transcripcionalmente activa y como factor de transcripción puede regular directamente algunos genes celulares³⁰.

Una de las principales funciones de E2, en términos de su participación en la carcinogénesis, es que actúa como un represor de la transcripción de las oncoproteínas virales E6 y E7³², por lo que su pérdida conlleva a una sobreexpresión de las oncoproteínas, como se mencionará más adelante.

El papel de la proteína E2 en el inicio de la transcripción es ayudar a situar a la proteína E1 en el origen de replicación de manera específica³³. Por otro lado, E2 participa en el mantenimiento y anclaje del genoma viral, ayudando a estabilizarlo en su modo episomal (DNA circular extracromosómico que se puede replicar independientemente del DNA cromosómico) y anclándolo a los cromosomas para su segregación durante la división de las células hospederas, así como en el empaquetamiento para la formación de viriones³⁰, mediante la interacción con proteínas y cromatina de la célula infectada³⁴. Además, E2 induce la activación de la vía de NF- κ B, mientras que la E2 específicamente de VPH-AR induce el aumento de p53, el arresto en la fase G2/M del ciclo celular y apoptosis^{32,35}.

Muller y Demeret³¹ realizaron una recopilación de las interacciones conocidas de proteínas celulares con algunos de los dominios de E2, encontrando un amplio interactoma entre E2 y 57 proteínas celulares. Esto junto con el hecho de que E2 tenga varias funciones adicionales, que son incluso independientes de la unión al genoma viral, sugiere que E2 podría participar en otros procesos celulares, algunos de los cuales podrían estar involucrados en la carcinogénesis.

1.7. Ciclo viral

El ciclo viral del VPH depende de la diferenciación del epitelio escamoso del huésped, por lo que su blanco de infección son los epitelios estratificados. En la [figura 6](#) se muestra el ciclo viral que comienza con el ingreso del VPH a las células epiteliales o queratinocitos específicamente en estado basal y las pequeñas lesiones en el tejido dejan expuestas a las células blanco permitiendo el ingreso del virus. Inicialmente, el VPH se une al heparán sulfato proteoglicano de la membrana basal, e ingresa a la célula³⁶, el DNA se libera de la cápside y es transportado al núcleo donde se mantiene de manera episomal. Enseguida el promotor de transcripción temprano se activa en las células basales, en este momento el material genético viral se mantiene en un bajo número de copias de 50-100 aproximadamente, mientras que la expresión de las

oncoproteínas E6 y E7 está siendo reprimida por E2. A medida que los queratinocitos se van diferenciando, migran de la membrana basal hacia la superficie del epitelio y dejan de dividirse, en aquel momento el promotor dependiente de diferenciación se activa conduciendo al incremento en la expresión de E6 y E7, reactivando la síntesis de DNA celular e inhibiendo la apoptosis. Como consecuencia se generan miles de copias del genoma viral y se desencadena la expresión de los genes de la cápside L1 y L2 para el ensamblaje de los viriones que son liberados tras la muerte de las células que alcanzan la superficie, estos viriones están listos para infectar nuevas células de la capa basal^{7,24,37}.

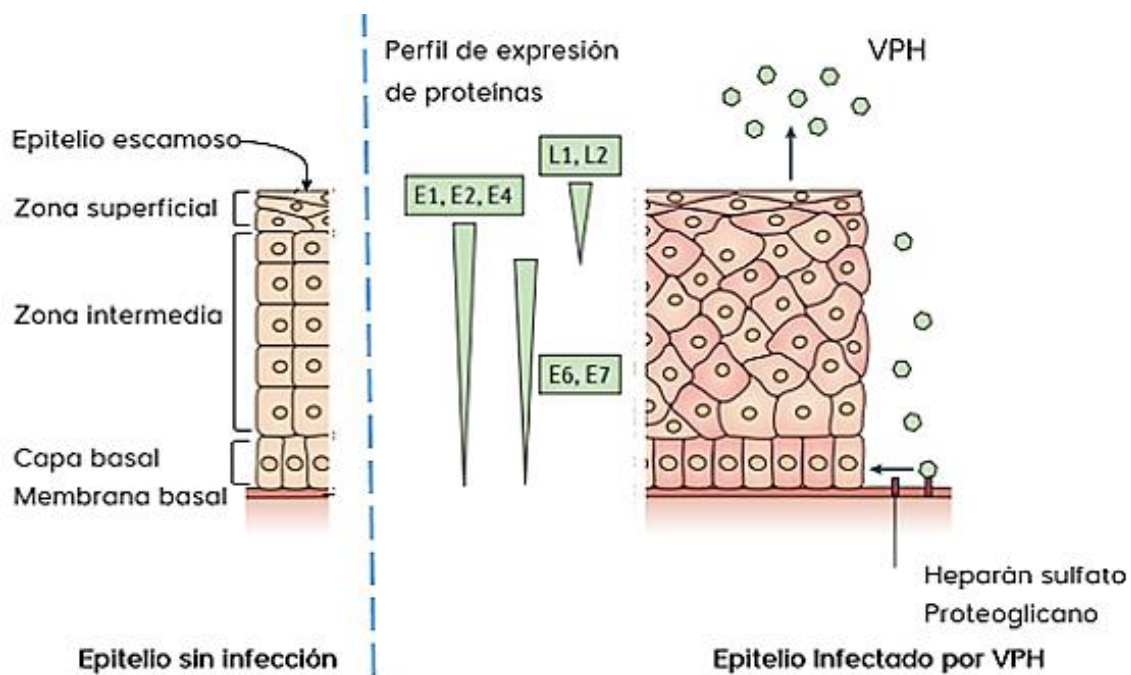


Figura 6. **Ciclo del Virus del Papiloma Humano.** El ciclo viral depende de la diferenciación del tejido escamoso que se puede dividir en 3 zonas: basal, intermedia y superficial. A medida que los queratinocitos se van diferenciando, migran hacia la zona superficial donde, en determinado momento, mueren y se descaman. Cuando el virus ingresa a las células de la capa basal, a través de lesiones, E1 y E2 regulan la replicación del genoma viral manteniendo un bajo número de copias, posteriormente, conforme las células se van diferenciando, E6 y E7 estimulan el crecimiento y división celular para continuar la replicación del genoma viral. Eventualmente, E2 reprime la expresión de E6 y E7, permitiendo a la célula diferenciarse. En esta etapa, en la zona superficial, L1 y L2 se expresan y se ensamblan las partículas virales que son liberadas con ayuda de E4. Modificado de Johansson y Shwartz³⁶.

1.8. Carcinogénesis cervical

La progresión hacia cáncer es un proceso abortivo sin producción de progenie viral en el que las células infectadas permanecen en estado proliferativo evadiendo la apoptosis. En esta fase abortiva se presenta un marcado incremento en la expresión de las proteínas E6 y E7 que impide la regulación del ciclo celular bloqueando el efecto de reguladores negativos a través de la interacción o degradación de ellos.

En el proceso de la amplificación del genoma viral en queratinocitos diferenciados, el VPH altera los mecanismos de proliferación y de diferenciación celular en la que naturalmente la síntesis de DNA está inhibida. Estos mecanismos celulares son controlados por varios factores, principalmente los miembros de la familia Rb. La proteína E7 del VPH se une a estos factores celulares y los marca para su degradación, liberando y activando el factor de transcripción E2F, de esta manera se inicia la expresión de los genes para la síntesis de DNA (fase S del ciclo celular). Si bien todas las proteínas E7 de los diferentes papilomavirus se unen a miembros de la familia Rb, las proteínas E7 de los virus de alto riesgo se unen con mucha mayor afinidad. La unión de E7 a Rb puede conducir a la inhibición del crecimiento celular y apoptosis de manera dependiente de p53. Como resultado, las proteínas E6 de los virus de alto riesgo han evolucionado para marcar a p53 para su degradación, previniendo la inhibición del crecimiento celular. El efecto combinado de las proteínas E6 y E7 de los virus de alto riesgo para mantener la fase S en las células diferenciadas resulta en la supresión de los puntos de control del ciclo celular. En células persistentemente infectadas la sobreexpresión de E6 y E7 conduce a la acumulación de mutaciones que con otros factores favorecen la progresión hacia cáncer. Además, la proteína E5 de alto riesgo coopera con E6 y E7 para promover la hiperproliferación de las células infectadas, facilitando el proceso de transformación maligna³⁸.

Este proceso carcinogénico se puede dividir en las siguientes etapas clínicas: infección por VPH, persistencia del virus por un largo período, progresión a lesiones precancerosas e invasión. Las lesiones precursoras al CaCu conocidas como lesiones escamosas intraepiteliales (SIL, por sus siglas en inglés) se clasifican en grados de acuerdo con su severidad en: lesiones de bajo grado (LSIL, del inglés *low-grade SIL*) o lesiones de alto grado (HSIL, del inglés *high-grade SIL*). Cuando el cáncer es de tipo invasor, las células anormales traspasan la membrana basal e invaden el tejido circundante, pudiendo eventualmente provocar metástasis²¹. En la siguiente página se muestra la [figura 7](#) en la que se esquematiza la carcinogénesis generada por el VPH.

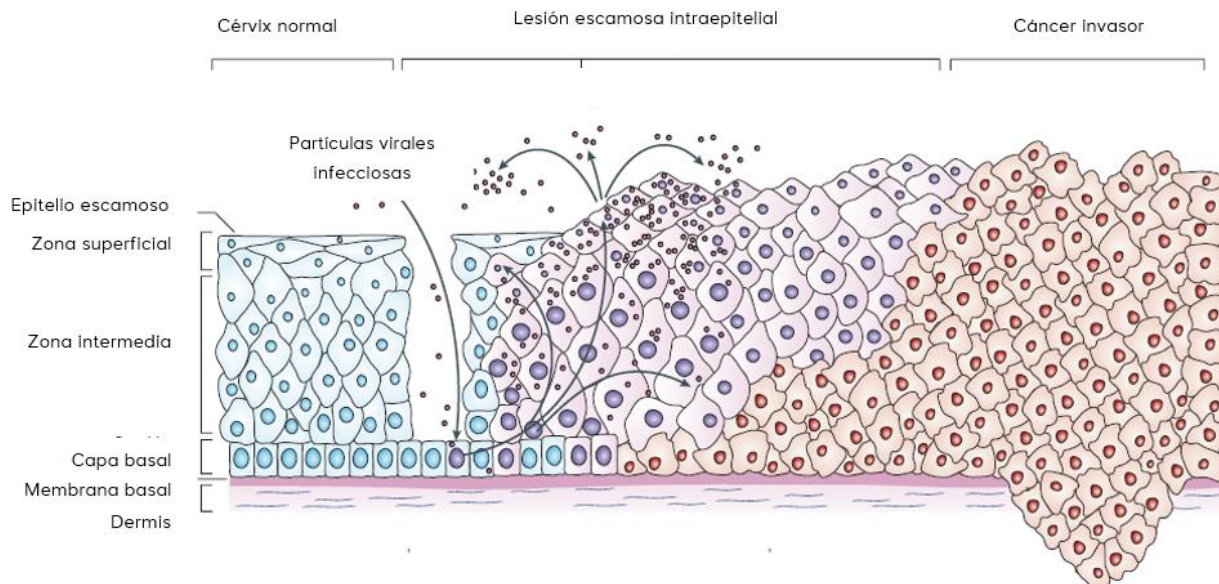


Figura 7. La progresión hacia cáncer mediada por la infección de VPH. Las células coloreadas de azul representan células normales, en morado se representan células infectadas con VPH con su DNA episomal, en rojo se representan células con el DNA viral integrado. Tomado de Woodman *et al.*¹⁶.

En la mayoría de los casos, el sistema inmune es capaz de resolver la infección en un periodo de 6 a 18 meses³⁹, sin embargo, de acuerdo con datos del 2013 de la Organización Mundial de la Salud del 0.3% al 1.2% de las mujeres infectadas con VPH-AR desarrollan cáncer invasor⁷. La infección con VPH de alto riesgo y las funciones de las oncoproteínas E5, E6 y E7 son necesarias, más no suficientes, para la progresión hacia cáncer. Entonces, además de la infección persistente, existen otros factores que participan en la carcinogénesis, entre ellos, la integración del genoma viral al genoma celular se ha postulado como un evento clave en este proceso⁴⁰. Al respecto, se ha observado que el genoma del VPH está presente en forma episomal en lesiones de bajo grado, mientras que en etapas avanzadas de lesiones pre-malignas y en carcinoma invasor se encuentra integrado^{41,42,43}, como se representa arriba en la [figura 7](#) en las células de color rojo.

Por otro lado, se ha observado que las células que contienen el DNA de VPH16 integrado poseen una ventaja selectiva de crecimiento, respecto a las células que contienen el DNA episomal. Así también, la disrupción del gen de E2 incrementa la capacidad de inmortalización del virus. Igualmente se ha reportado que la integración viral conlleva al rompimiento del marco abierto de lectura de E2, por lo que se pierde la regulación negativa de los oncogenes virales E6 y E7, evento que resulta en un aumento en la expresión y estabilidad de los transcritos que los

codifican. Por esto la integración se considera un evento importante para la progresión hacia el cáncer⁴⁴.

Hoy en día, se desconocen en su totalidad las causas que conducen al proceso de integración del genoma del virus o cuáles son los otros factores genéticos y/o ambientales adicionales a la infección por VPH que se requieren para el desarrollo de cáncer, pero se han propuesto eventos candidatos a nivel del virus, del hospedero y de factores ambientales.

1.9. El estrés oxidante como factor para la carcinogénesis

En la carcinogénesis inducida por el VPH el daño al DNA o a otras biomoléculas y los agentes que lo causan juegan un papel importante en el desarrollo de los distintos tipos de cáncer asociados al VPH. Entre estos factores, el estrés oxidante OS (OS, por sus siglas en inglés) es un elemento, poco explorado en este tipo de infecciones, que podría interferir con varios estados del proceso carcinogénico y a través de modificaciones celulares o de eventos moleculares favorecer el daño celular y/o la integración del genoma viral.

El estrés oxidante (OS, del inglés *oxidative stress*) induce un desbalance redox que se ha encontrado presente en células cancerosas comparadas con células normales; se considera que el desbalance redox podría estar relacionado con la estimulación oncogénica⁴⁵ principalmente de dos maneras: el estrés oxidante puede causar daño celular, mientras que en el otro tipo de desbalance redox hay un incremento de los niveles antioxidantes que puede generar la resistencia de las células a respuestas de senescencia y apoptosis, conduciendo a la inestabilidad genómica y carcinogénesis⁴⁶ como se esquematiza en la [figura 8](#).

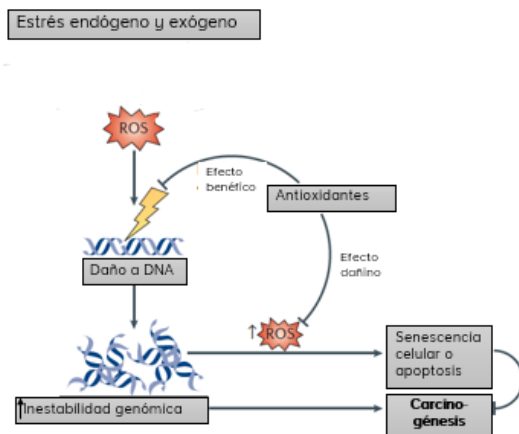


Figura 8. **Efectos potenciales de los oxidantes y antioxidantes sobre la carcinogénesis.** El incremento en los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) puede potencialmente generar daño al DNA y por tanto contribuir a la inestabilidad genómica. Ésta, a su vez frecuentemente dispara el incremento de los niveles intracelulares de ROS que parece ser un efector de la senescencia celular y apoptosis. Tanto la senescencia como la apoptosis pueden limitar las células genéticamente dañadas para evitar proliferación y así limitar la formación de tumores. Por otro lado, los antioxidantes pueden funcionar como agonistas o antagonistas de estas vías, su efecto es benéfico si reducen los niveles de ROS e impiden el daño celular, pero pueden también generar resistencia a la senescencia o apoptosis y acelerar la formación del tumor. Tomado de Holmström, y Finkel⁴⁶.

Por ejemplo, algunos virus como el de la hepatitis C (HCV), han evolucionado para manipular este delicado balance entre oxidantes y antioxidantes; el HCV genera un estrés oxidante sostenido disminuyendo los niveles de antioxidantes y resultando en la oxidación de componentes importantes de la célula como proteínas, lípidos, DNA e incluso en la ruptura de la doble cadena de DNA, estos eventos conducen a la cirrosis y al carcinoma hepatocelular en adultos debido a un daño constante en la infección por HCV⁴⁷.

En este contexto el estrés oxidante podría afectar la historia natural de la infección por VPH y ser un mecanismo que influya en la carcinogénesis⁴⁸ por lo que resulta importante profundizar en este tema.

1.10. Estrés oxidante

En estado fisiológico normal existe un balance entre las especies oxidantes y antioxidantes que mantiene la homeostasis redox en los sistemas vivos. El estrés oxidante se presenta cuando este equilibrio se rompe y predominan las especies oxidantes^{49,50}. Se sabe que el OS tiene un papel importante en la patofisiología de distintas enfermedades, incluido el cáncer⁵¹.

Los organismos aerobios requieren de oxígeno molecular (O_2) como último aceptor de electrones para la producción de ATP en la cadena respiratoria, sin embargo, a pesar de ser vital, el oxígeno puede también generar toxicidad bajo ciertas condiciones a través de moléculas derivadas de él.

Durante el metabolismo, y a partir de otras fuentes, la adición univalente de electrones al O_2 genera moléculas parcialmente reducidas conocidas como especies reactivas de oxígeno, ver [figura 9](#), éstas oxidan varias biomoléculas y pueden generar daño celular⁵⁰.

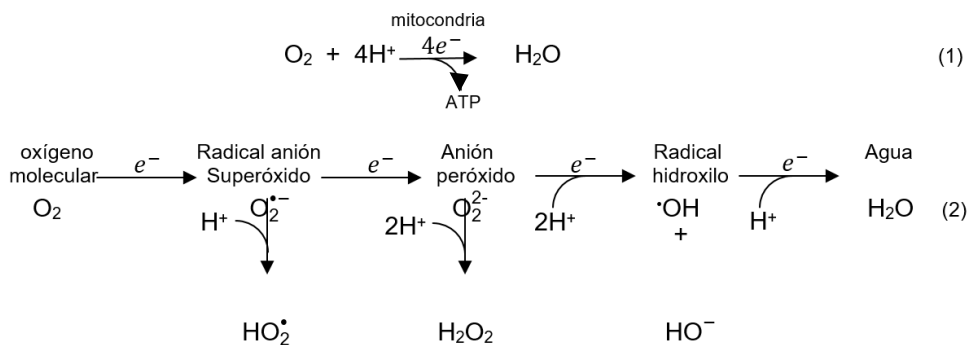


Figura 9. **Generación de especies reactivas de oxígeno** por la reducción univalente de la molécula de oxígeno (2) y reducción tetraelectrónica durante la fosforilación oxidativa en la mitocondria (1).

Al igual que el oxígeno, las ROS juegan un papel dual en los organismos, ya que en condiciones descontroladas pueden oxidar proteínas, lípidos o ácidos nucleicos alterando o inhabilitando su función y, por tanto, pueden conducir a efectos dañinos e incluso muerte celular. Mientras que en estado fisiológico normal las ROS ejercen un efecto benéfico y necesario. Por ejemplo, algunas ROS son requeridas y producidas por los organismos en condiciones fisiológicas para la señalización celular, tal es el caso del $\cdot\text{OH}$, definido más adelante, que participa induciendo a la guanilato ciclasa para que forme el segundo mensajero cGMP; otro papel importante de las ROS es que forman parte de los mecanismos de defensa del sistema inmunitario, el cual requiere la producción de H_2O_2 , $\text{O}_2\cdot^-$, definidos más adelante, y ácido hipocloroso (HOCl) durante el estallido respiratorio para eliminar una infección^{46,50}.

Debido a los múltiples y diversos efectos que la toxicidad del oxígeno puede tener sobre la célula, los organismos aerobios presentan varios mecanismos de defensa antioxidante, como enzimas y moléculas que capturan las ROS y las mantienen en concentraciones adecuadas^{52,53}.

La aparición del estrés oxidante se da cuando la capacidad antioxidante del sistema es sobrepasada por las ROS. Este desbalance puede generarse por cambios en uno u otro lado del equilibrio: ya sea por la disminución en los mecanismos antioxidantes de defensa, o por la sobreproducción y/o incorporación de especies oxidantes del ambiente.

El nivel del daño oxidante está determinado por la tasa en la que las especies oxidantes se generan y son removidas. Así, pequeñas alteraciones en el balance pueden conducir a la adaptación del sistema para mantener la homeostasis redox, mientras que alteraciones mayores pueden conducir a daños irreparables y muerte celular⁵⁴. En la [figura 10](#) se resume el concepto de homeostasis redox, estrés y daño oxidante.

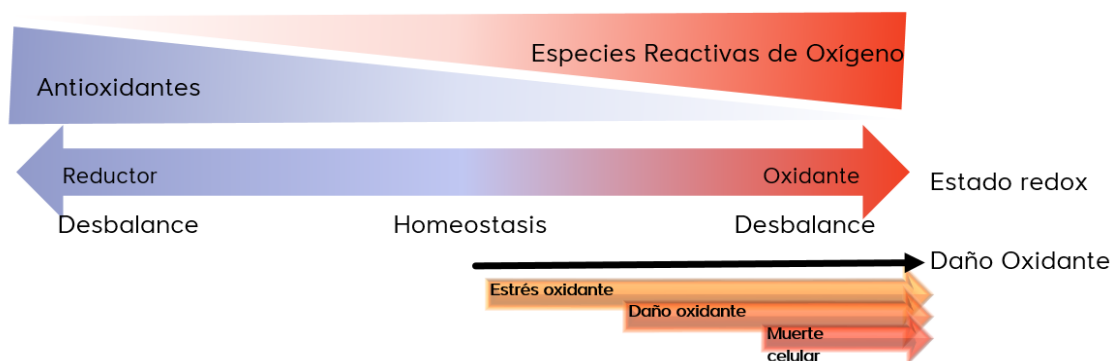


Figura 10. **Esquema del proceso de daño oxidante.** Cuando la concentración de ROS escapa del estado fisiológico normal— por ejemplo, por altos niveles o producción sostenida del $\cdot\text{OH}$ — varias macromoléculas se dañan (estrés oxidante). El daño causado por las ERO puede ser revertido y reparado por el reemplazo, reparación, degradación o secuestro de las moléculas dañadas, manteniendo la homeostasis redox (parte central del esquema). Sin embargo, cuando el daño excede la capacidad de respuesta de la célula puede conducir a muerte celular (lado derecho del esquema).

1.11. Especies reactivas de oxígeno

El estrés oxidante está implicado en la patofisiología de muchas enfermedades porque puede causar daño y subsecuente muerte celular, esto se debe a que las ROS oxidan componentes celulares vitales⁵⁵ como en el caso del carcinoma hepatocelular. Como se mencionó, estas moléculas se generan por la adición univalente de electrones al O₂, esto implica que algunas son radicales libres, mientras que otras se asocian con átomos de hidrógeno o nitrógeno, pero conservan su alta reactividad al ser nucleófilos. Un radical libre es una molécula que posee uno o más electrones desapareados por lo que es muy reactiva, y un nucleófilo es una especie que tiene uno o más pares de electrones libres para reaccionar. Las ROS más comunes son radicales del oxígeno, como el hidroxilo ([•]OH), el anión superóxido (O₂^{-•}), el perhidroxilo ([•]OOH), el peroxilo (ROO[•]) y el óxido nítrico (NO[•]), y otras que no son radicales libres, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el ácido hipocloroso (HOCl), el ozono(O₃) y el peroxinitrito (ONOO⁻)⁵⁰. En la [tabla 3](#) se enlistan las principales ROS y algunas de sus características.

Tabla 3. Especies reactivas de oxígeno	
Especie reactiva de oxígeno	Propiedades
O ₂ ^{•-}	El radical anión superóxido se produce por la adición de un electrón al O ₂ durante la fuga de electrones de los complejos I y III de la mitocondria en la fosforilación oxidativa. Otra fuente es durante el estallido respiratorio, donde la NADPH oxidasa produce O ₂ ^{•-} en los neutrófilos para la destrucción bacteriana. O bien mediante la “activación” del oxígeno por radiación. Este radical es la principal fuente de otras ROS que se producen por procesos catalizados por enzimas o metales, por lo que se considera una ROS primaria.
HO [•]	El radical hidroxilo es la ROS más reactiva, ataca a casi cualquier molécula de las células, incluyendo, lípidos de la membrana y carbohidratos, pero debido a su tiempo de vida media de aproximadamente 10 ⁻⁹ s reacciona sólo en los sitios cercanos a su origen. Se produce por efecto de la radiación ionizante y por hidrólisis de H ₂ O ₂ catalizada por metales de transición (<i>E. g.</i> Fe ²⁺ y Cu ⁺) durante la reacción de Fenton $M^{(n+1)} + H_2O_2 \rightarrow M^n + HO^{\bullet} + HO^{\bullet}$ Esta ERO reacciona tanto con las purinas y pirimidinas como con la desoxirribosa de la molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico), produciendo bases nitrogenadas dañadas o ruptura de la cadena. CONTINÚA EN LA SIGUIENTE PÁGINA

H ₂ O ₂	El peróxido de hidrógeno se produce por la dismutación de O ₂ •. Los peroxisomas son una fuente importante de esta ROS que es considerada la menos reactiva, pero al disponer de un tiempo de vida media más largo, y su alta capacidad de difusión puede atravesar membranas, generando otras ROS. Por ejemplo, reacciona con el Fe ²⁺ para producir •OH y •OH durante la reacción de Fenton.
•ON	El óxido nítrico es un radical libre que se genera en los tejidos por las sintasas de óxido nítrico y durante el estallido respiratorio. Éste radical es una molécula de señalización que participa en procesos fisiológicos como neurotransmisión, regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa, mecanismos de relajación del músculo liso y regulación del sistema inmunológico.
ONOO•	El peroxinitrito es un potente agente oxidante que puede causar fragmentación del DNA y lipoperoxidación. Se forma en la siguiente reacción $\bullet\text{ON} + \text{O}_2\bullet \longrightarrow \text{ONOO}\bullet$

Referencias^{50,56}

1.12. Fuentes de ROS

Los humanos estamos constantemente expuestos a ROS, que provienen de fuentes tanto endógenas como exógenas. Las fuentes endógenas incluyen reacciones enzimáticas del estallido respiratorio en la respuesta inmunológica (de la NADPH oxidasa, xantina oxidoreductasa y mieloperoxidasa), el metabolismo de xenobióticos (citocromo P₄₅₀) y la regulación de la relajación del músculo liso (sintasa de óxido nítrico, NOS)⁴⁹. Mientras que la radiación ionizante, radiación UV, algunos contaminantes (metales pesados como cobre o hierro), fármacos (doxorrubicina, paracetamol), ingredientes de la dieta (ácidos grasos oxidados) y patógenos (virus, bacterias, parásitos) constituyen las fuentes externas. Cabe mencionar que algunas ROS son fuente de otras, al reaccionar con algunos metales como el hierro y el cobre, en la reacción de Fenton por ejemplo para producir HO•, o con algunas biomoléculas como los lípidos, generando una reacción en cadena de formación de radicales libres⁵⁷.

La principal fuente endógena de ROS es la mitocondria, ya que en la fosforilación oxidativa durante el transporte de electrones, algunos de ellos se escapan principalmente de los complejos I y III mitocondriales formando O₂•⁻. Se estima que del 1-3% del oxígeno consumido diariamente causa la generación del radical anión superóxido y otras ROS en la mitocondria⁵⁰. En adición a esto, la monoaminoxidasa que cataliza el metabolismo de aminas biogénicas es una fuente importante de H₂O₂ de la mitocondria⁵⁸.

Por otro lado, algunos patógenos, entre ellos algunos virus, están relacionados con la generación de ROS, por ejemplo, se sabe que el estrés oxidante juega un papel en la patogénesis de la infección por VIH y por el virus de la influenza humana. Mientras que en la carcinogénesis mediada por el virus de la hepatitis C (HCV) y el virus de la hepatitis B (HBV) el estrés oxidante es un evento clave^{51,53,59,60}.

Así, las ROS se pueden formar en los sistemas vivos a través de diversos mecanismos, que se resumen en la *figura 11*.

Todas estas fuentes resultan en una presencia constante de ROS, por lo que los organismos aerobios presentan diversas estrategias no sólo para lidiar con el estrés oxidante, sino que han incluido algunas ROS en vías de señalización y funciones fisiológicas^{50,61}.

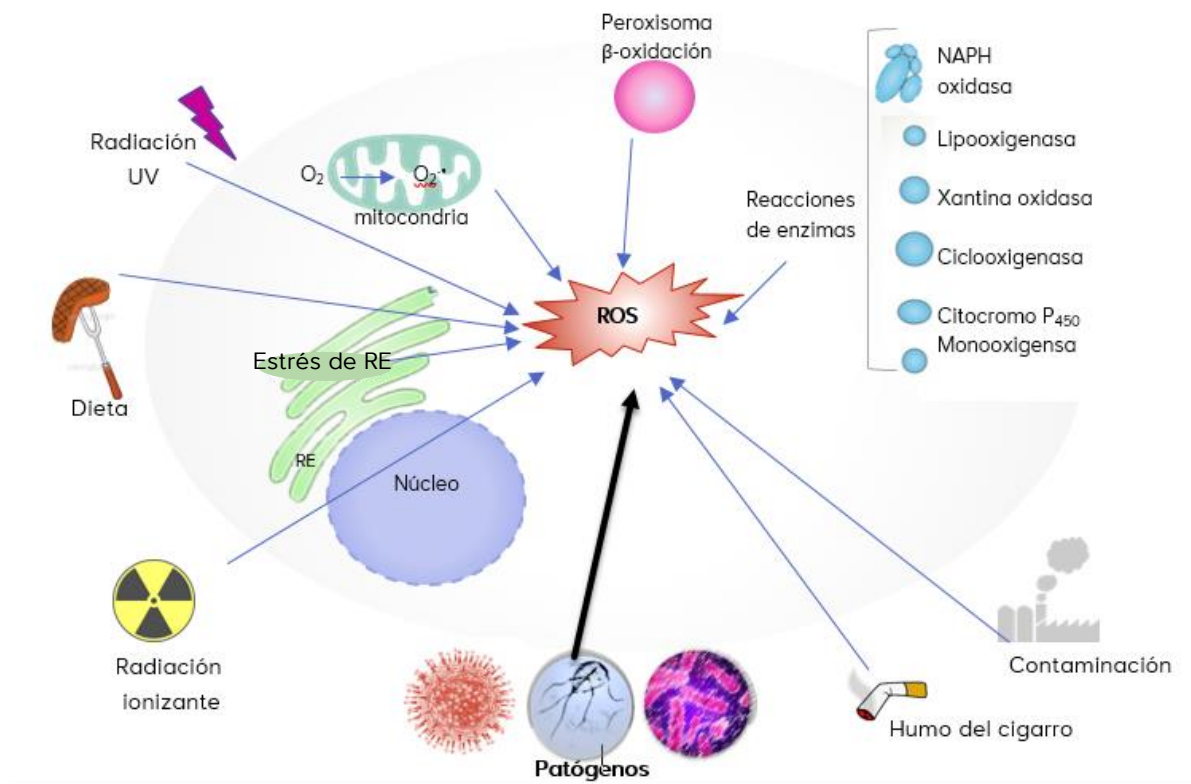


Figura 11. Esquema de fuentes de especies reactivas de oxígeno. Existen fuentes endógenas que incluyen varias enzimas y procesos metabólicos. Así como fuentes externas como la radiación UV e ionizante, algunos compuestos presentes en la dieta, contaminantes, compuestos del humo del cigarrillo y patógenos, incluidos algunos virus.

1.13. Daño generado por el estrés oxidante

Los efectos que tiene el desbalance entre oxidantes/antioxidantes varían gradualmente en los sistemas vivos. Si bien, pequeños cambios en el estado redox inducen adaptaciones del sistema que mantienen la homeostasis, la producción de ROS en espacio o tiempo inapropiados, ya sea por mucho tiempo, en muy altos niveles o de manera inadecuada, conduce inicialmente a cambios reversibles en la función celular. Pero, si el estrés oxidante no se revierte, se genera un daño irreversible de la función celular o ganancia patológica de función y posteriormente si el OS continúa, conlleva a la transformación maligna, en el caso del cáncer, o a la muerte celular⁶⁰. En adición, a través de la perturbación del balance redox, las ROS inducen la activación de varios factores de transcripción sensibles al estado redox, modificando la expresión de genes, y modulando la función de las proteínas sensibles al estado redox, por lo cual las ROS participan en varios procesos agudos o crónico-degenerativos, incluyendo envejecimiento y cáncer⁶².

En altas concentraciones las ROS pueden generar daño oxidante al alterar estructuras celulares, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas⁴⁵. Los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de membrana, por ejemplo, son extremadamente susceptibles a la oxidación por el HO• y el HOO•, que generan a su paso radicales peroxilo (ROO•) y pueden propagar la reacción en cadena hasta generar 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), que es débilmente mutagénico y malondialdehído (MDA), el cual es mutagénico en bacterias y cultivos de células de mamífero, así como carcinógeno en ratas⁵⁰.

Tanto los aminoácidos libres como las proteínas son blancos de daño oxidante, las ROS pueden atacar las cadenas laterales de los aminoácidos formando grupos carbonilo (aldehídos y cetonas), particularmente de la prolina, arginina, lisina y treonina. La cisteína y metionina además contienen un grupo tiol (-SH) en su cadena lateral, que al ser oxidado puede conducir a la formación de puentes disulfuro (S-S) y al plegamiento anormal de proteínas. En particular, el ONOO⁻ reacciona con los residuos de tirosina formando 3-nitrotirosina, lo cual podría implicar alteración o inactivación de la función proteica.

El material genético, esencial en los seres vivos, es altamente susceptible al daño por ROS, pues tanto el DNA como el RNA, son moléculas electrófilas (deficientes en electrones) y las ROS atacan tanto el esqueleto de ribosas como las bases nitrogenadas de estas moléculas. El HO•, O₂⁻, H₂O₂ y el •OOR pueden, ya sea oxidar las ribosas de los ácidos nucleicos y romper su cadena o bien generar aductos y otros derivados oxidados que alteren las bases nitrogenadas.

Una de las principales moléculas derivadas del daño oxidante al DNA es la 8-oxo-7,8-dihidro-2-desoxiguanosina (8-oxodG) y la 2,6-diamino-5-formamida-4-hidroxipirimidina (FapyG) (*figura 12*). También el ONOO⁻, reacciona con la guanina generando 8-nitroguanina y 8-oxodG. Estas alteraciones conducen a la generación de mutaciones por transversión (de G:C a T:A) y presencia de sitios apurínicos^{56,63}. Además los daños oxidantes generados a histonas (proteínas que se asocian al DNA para mantenerlo empaquetado conducen a interferencias en el plegamiento del mismo⁵⁴. Así, el desbalance redox puede resultar en mutaciones o expresión aberrante de genes.

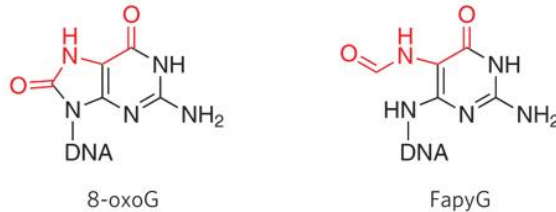


Figura 12. **Estructura de las principales moléculas derivadas del daño oxidante a los ácidos nucleicos.** El color rojo indica la parte de la molécula que sufrió modificación.

Cuando el daño al DNA resulta en mutagénesis sin ruptura de la doble cadena, y el daño a otras macromoléculas vitales es reparado, la consecuencia puede ser la transformación maligna hacia cáncer más que la muerte celular (*figura 10*, lado derecho del esquema)⁶⁰.

1.14. Sistema antioxidante

Como se mencionó, las células poseen un complejo sistema de defensas antioxidantes que busca mantener la homeostasis redox. Sin embargo, la disminución o falla de este sistema antioxidante, representa también una fuente de daño celular y factor para la progresión hacia cáncer. Así también, en ciertas condiciones como altas concentraciones, los antioxidantes pueden presentar efectos perjudiciales para la célula (*figura 8*)⁴⁶.

El sistema antioxidante emplea varios mecanismos para mantener la homeostasis redox: i) remover el O₂, ii) atrapar o catabolizar las especies ROS o sus precursores, iii) inhibir la formación de ROS, iv) capturar iones metálicos necesarios para la catálisis de formación de ROS v) reparar las moléculas dañadas por el estrés oxidante y/o vi) remover o secuestrar las moléculas derivadas del daño oxidante que no pudieron ser reparadas⁶⁰.

Para realizar estos mecanismos este sistema cuenta con moléculas antioxidantes como el glutatión (GSH) o la tioredoxina (TRX) y con enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPX), la glutatión reductasa y la glutatión-S-transferasa (GST), principalmente (*figura 13*).

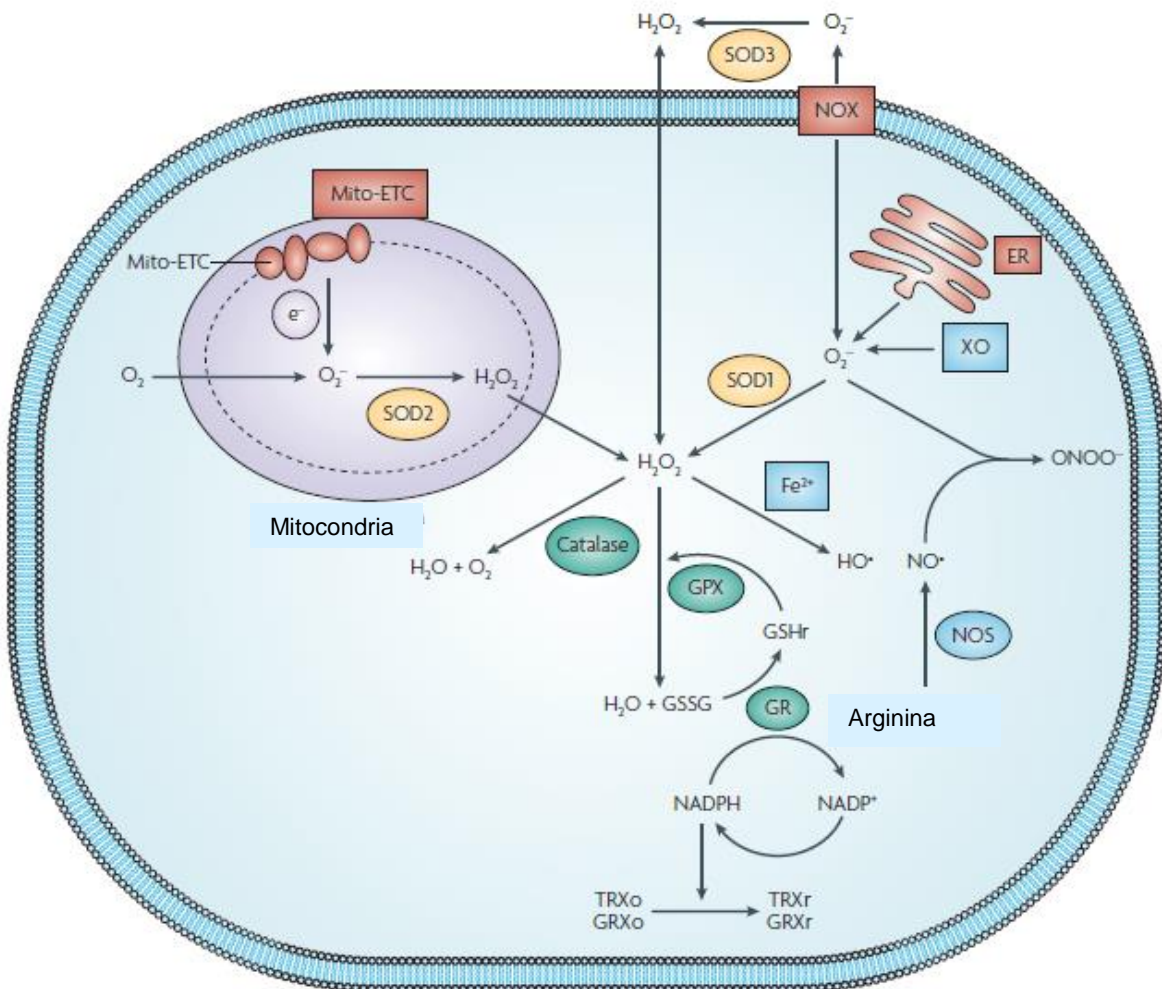


Figura 13. **Homeostasis celular redox.** Los principales sitios de generación de ROS se presentan en rojo e incluyen la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Mito-ETC), el retículo endoplásmico (ER) y el complejo de la NADPH oxidasa. El superóxido ($O_2^{\bullet-}$) es el radical libre principal e inicial y puede ser convertido en otras ROS, por ejemplo, en H_2O_2 por la SOD (amarillo), el cual se puede reciclar para generar más $O_2^{\bullet-}$ o ser transformado en agua por la catalasa. En presencia de metales de transición (como Fe^{2+}), el H_2O_2 puede transformarse en radicales HO^{\bullet} , que son altamente reactivos y causan daños a lípidos, proteínas y DNA. El NO^{\bullet} puede reaccionar con el superóxido para formar $ONOO^-$, una especie no radical que modifica la estructura y función de las proteínas. Para prevenir los efectos perjudiciales de las ROS, las células regulan los niveles manteniendo el balance entre la generación y eliminación de ROS. Las principales enzimas antioxidantes presentan en verde. GPX, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GRXo, glutaredoxina oxidada; GRXr, glutaredoxina reducida; GSHr glutatión (reducido); GSSG, glutatión (oxidado); TRXo, tioredoxina (oxidada); TRXr, tioredoxina (reducida); XO, Xantina oxidasa. Tomado de Trachootham, D. *et al.* 2009⁸⁸

2. ANTECEDENTES

En los últimos años se ha descrito la participación del estrés oxidante en diversas patologías, incluyendo el establecimiento de varios tipos de cáncer^{56,45}. Recientemente Fiachi & Chiarugi⁶⁴ publicaron una revisión al respecto que evidencia al estrés oxidante como una de las características del cáncer, pues participa en la proliferación y crecimiento celular independiente de anclaje, insensibilidad a la apoptosis, angiogénesis sostenida, así como en la alteración del programa de migración/invasión, todas ellas características de un microambiente tumoral. En consecuencia, se ha comenzado a estudiar el papel de las ROS y el estrés oxidante en la infección y cáncer promovidos por el VPH⁶⁴.

En primer lugar, en varios estudios en pacientes con CaCu se han encontrado alterados los niveles de antioxidantes en circulación, por ejemplo se ha descrito niveles disminuidos de GSH, vitamina E, vitamina C y zinc, además se ha observado disminuida la actividad de la CAT, SOD, GPX y GST en eritrocitos de pacientes con CaCu en comparación con muestras de mujeres sanas⁶⁵. Por lo que se refiere a los niveles de oxidantes, varios trabajos indican un incremento en los niveles de lipoperóxidos como MDA, óxido nítrico y cobre en pacientes con CaCu con respecto a pacientes con cervicitis y mujeres sanas⁶⁶⁻⁶⁸. De igual manera, se ha observado que los niveles de proteínas carboniladas son mayores en tejidos displásicos positivos a VPH16 con respecto a tejidos neoplásicos o normales por lo que se infiere un papel del estrés oxidante sobre la carcinogénesis inducida por el VPH⁶².

Tras la infección con VPH16 en células en cultivo organotípico se ha observado que el virus requiere de un gradiente del estado redox, primero oxidante y luego reductor, para la formación de la cápside y la efectividad de infección de nuevo tejido, respectivamente⁶⁹. En adición, Buck y colaboradores⁷⁰ observaron que la maduración de la cápside está dirigida por la formación de enlaces disulfuro entre las proteínas L1 en células transfectadas con VPH16 y que este proceso, que de otra manera es muy lento, se acelera dramáticamente por un ambiente oxidante generado por una solución con GSSG. Esto sugiere que un estado oxidante favorece la formación de los viriones, el proceso infeccioso y posiblemente la persistencia de la infección⁶².

Recientemente se ha demostrado el papel de E6 y E7 de VPH16 en la generación de estrés oxidante y un consecuente incremento de la integración del genoma viral en líneas celulares: Williams y colaboradores⁷¹ encontraron que la isoforma E6* (resultante del corte y empalme de E6) incrementa los niveles de ROS, disminuye los niveles de SOD2, y su expresión se relaciona con un incremento de daño a DNA.

Por otro lado, Marullo y colaboradores⁷² encontraron que la expresión de E6 y E7 de VPH16 induce un incremento de ROS mediado por las dinucleótido de adenina fosfato oxidasas (NOXs, por sus siglas en inglés nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases) causando daño a DNA y aberraciones cromosomales en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello positivas a VPH. Además, en el 2016 se reportó que una disminución en los niveles de GSH (por L-butionina-sulfoximina, un inhibidor competitivo de la síntesis de GSH) eleva los niveles de ROS e incrementa la frecuencia de integración de plásmidos de VPH16 en cultivos de queratinocitos⁷³.

El papel de E1 y E2 de VPH de alto riesgo en la generación de estrés oxidante ha sido poco estudiado. Con respecto a E1 de VPH18 se ha reportado que su interacción directa con el DNA del hospedero puede causar rompimiento de la doble cadena⁷⁴. Al respecto de E2, Lai y colaboradores⁷⁵ demostraron en 2013 que las proteínas E2 de los VPH16 y VPH18 son capaces de cambiar su localización del núcleo al citoplasma e interactuar con la mitocondria, induciendo una alteración en su morfología acompañada de un incremento en los niveles de ROS, evento que no observaron con la expresión de E2 de VPH11. Al momento se desconoce el mecanismo de este incremento de ROS en presencia de E2 de VPH18 y si la ruptura de la doble cadena de E1 está también mediada por una modulación del estado redox.

3. JUSTIFICACIÓN

En muchos países el CaCu continúa siendo un problema de salud pública con altas tasas de mortalidad y morbilidad. Por lo cual, aunado a la introducción de la vacunación y tamizaje citohistológico, se requiere el desarrollo de estrategias contra el cáncer cervical mediante la comprensión de las bases moleculares de la carcinogénesis originada por el VPH.

Los diferentes procesos celulares implicados en el desarrollo de esta neoplasia han sido sujetos de estudios que han permitido conocer aún más el mecanismo carcinogénico inducido por el VPH; sin embargo, el mecanismo completo aún no se conoce en su totalidad. Encontrar nuevos enfoques moleculares que permitan determinar mecanismos desconocidos que participan en la carcinogénesis promovida por el VPH, representa una oportunidad de estudio con gran potencial benéfico.

Al respecto, el papel del estrés oxidante en la infección y carcinogénesis promovida por las proteínas E1 y E2 de VPH de alto riesgo es un campo que ha sido poco explorado, por lo que resulta importante determinar si existe una relación entre la infección por el VPH y el estrés oxidante con el fin de entender su participación en la infección viral y en la carcinogénesis.

4. HIPÓTESIS

Las proteínas E1 y E2 del VPH tipo 18 modifican el estado redox de la célula induciendo estrés oxidante y daño al DNA.

5. OBJETIVO GENERAL

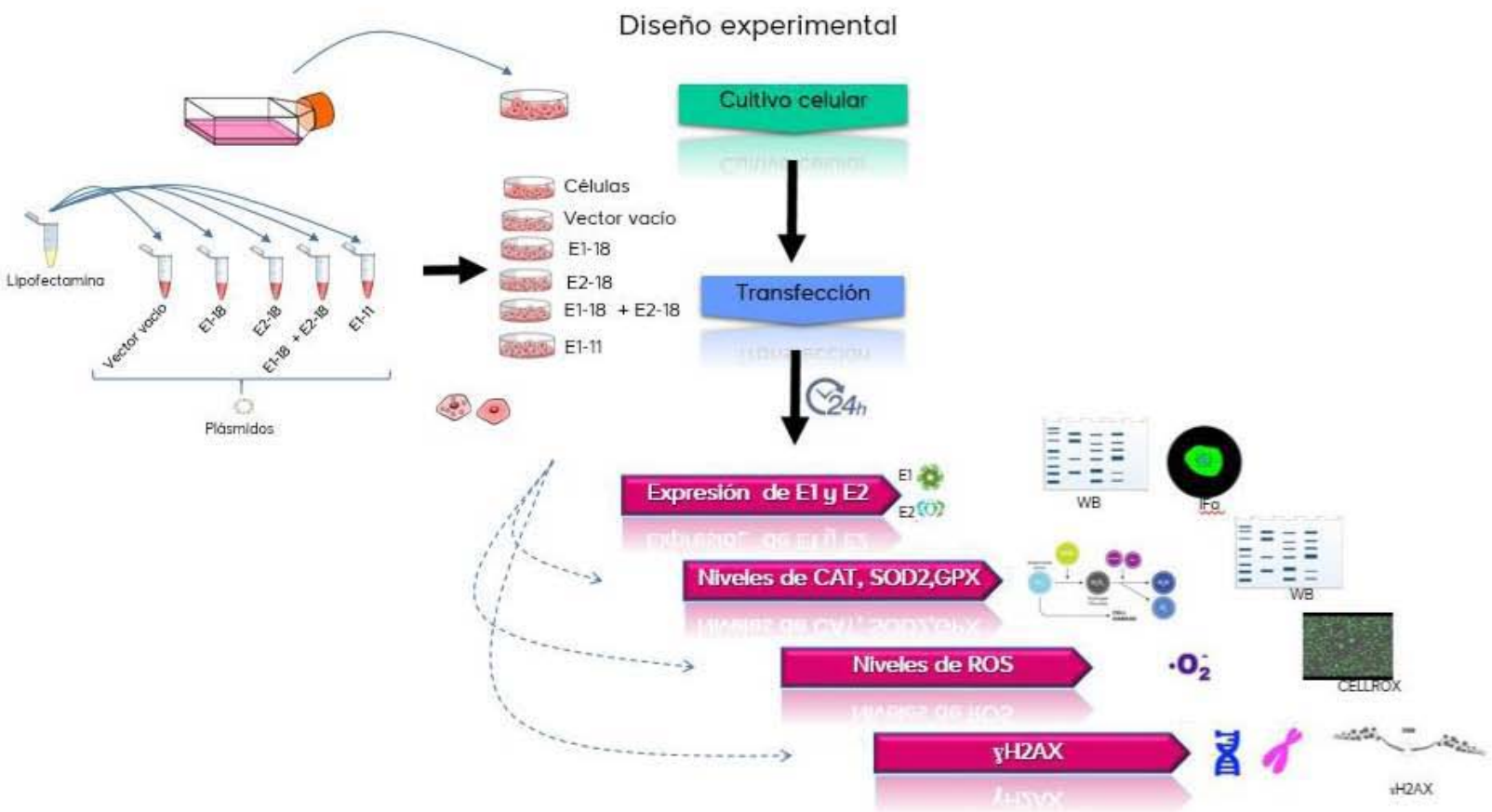
Determinar la participación de E1 y E2 de VPH18 en la modificación del estado redox celular y su efecto sobre el daño al DNA celular.

5.1. Objetivos específicos

1. Establecer el modelo de estudio mediante transfecciones transitorias en líneas celulares HEK-293 y U2OS para la expresión de los genes E1 y E2.
2. Determinar el estado de factores que modulan el estado redox, en presencia de las proteínas virales para lo cual se requiere:
 - i. Evaluar los niveles de proteínas antioxidantes, CAT, SOD y GPX.
 - ii. Determinar el efecto de las proteínas de expresión temprana en los niveles de ROS.
3. Evaluar el daño oxidante sobre DNA producido en células transfectadas con los diferentes genes virales.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño experimental



6.2. Plásmidos

El plásmido pcDNA-HPV18 E1 expresa la proteína E1 del VPH18 bajo el control del promotor CMV y posee el tag HA en su extremo amino terminal. El plásmido pcDNA-HPV18E2, expresa la proteína E2 de VPH18 bajo el promotor CMV. EL plásmido lacZ se empleó como control de transfección y el plásmido pcDNA vacío fue empleado como control de comparación. Los plásmidos corresponden a la colección del laboratorio y fueron creados mediante técnicas de PCR y clonación estándar. El plásmido pMHPV11 E1HA que expresa la proteína E1 de VPH11 contiene HA y fue amablemente donado por el Dr. Mart Ustav del Institute of Molecular and Cell Biology, Institute of Technology, University of Tartu, Estonia⁷⁶.

6.3. Transformación

6.4. Bacterias competentes

Para recuperar los plásmidos se transformaron en bacterias competentes. La cepa DH5 α de *Escherichia coli* se hizo competente mediante el método de CaCl₂. Brevemente, 50 mL de medio Luria Berth (LB) fueron inoculados con las bacterias hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.4 y se incubaron en hielo durante 15 min. Posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm/ 4°C/10 min, el botón celular se resuspendió en una solución fría de CaCl₂-Tris pH 7.5 (anexo 1.2) y se incubó 30 min en hielo, las bacterias se centrifugaron nuevamente a 2500 rpm/4°C/10 min y el botón celular se resuspendió en 3.3mL del mismo amortiguador.

6.5. Transformación

Para este fin se empleó el método de choque térmico. En tubos colocados sobre hielo se agregaron por separado aproximadamente 100 ng de cada plásmido y 200 μ L de las bacterias competentes, esta mezcla se incubó por 30 min en hielo. Después se realizó un choque térmico cambiando rápidamente los tubos del hielo a un baño térmico a 42°C por 2 min, tras lo cual fueron incubados nuevamente en hielo durante 5 min. Después a cada tubo se añadieron 800 μ L de LB estéril y se incubaron 1h a 37°C en agitación constante a 300 rpm. Al finalizar el tiempo de incubación, se sembraron por separado, mediante estría masiva, alícuotas de las bacterias en placas de LB suplementadas con 100 μ g/mL de ampicilina (anexo 1.3) como medio de selección positiva y se incubaron a 37°C toda la noche para la obtención de colonias transformadas.

6.6. Aislamiento y purificación de DNA de plásmidos de expresión

Los diferentes plásmidos fueron extraídos con el estuche Maxi prep Pur PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) basado en una lisis alcalina modificada, siguiendo las instrucciones del proveedor: Una colonia de las placas de selección positiva de transformación fue inoculada por estría aislada en agar LB/con ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C. De este cultivo una colonia aislada se seleccionó e inoculó en 5mL de LB con ampicilina en agitación constante de 6-8 h. El cultivo inicial se diluyó en 300 mL de LB estéril incubándolo a 37° en agitación constante toda la noche. Al día siguiente, las bacterias fueron centrifugadas a 6,000 g por 10 min a 4°C, el botón celular se resuspendió en 10mL del amortiguador de resuspensión R3 con RNAsa A, posteriormente se añadieron 10 mL del amortiguador de lisis L7, mezclando cuidadosamente por inversión y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se añadieron 10 mL de amortiguador de precipitación (N3) mezclando por inversión. El lisado celular resultante se centrifugó a 12,500 g por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se vertió en una columna equilibrada con amortiguador EQ1, permitiendo que la solución se drenara por gravedad. Se añadieron 60 mL de amortiguador de lavado W8 a la columna, cuando todo el fluido se descartó, se añadieron a la columna 15 mL del amortiguador de elusión E4, permitiendo un flujo por gravedad en un tubo estéril. La solución eluida contiene el DNA purificado que fue precipitado con 10.5 mL de isopropanol, posteriormente se centrifugó el tubo a 12500 g por 5 min a 4°C descartando el sobrenadante. El DNA se lavó una vez con 5 mL de etanol al 70%, descartando el sobrenadante. El botón de DNA purificado se resuspendió en amortiguador TE. Se determinó la concentración e índice de pureza y se almacenó hasta su uso a -20°C. Finalmente, los plásmidos fueron secuenciados y alineados con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment sequence Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LC=blasthome.

6.7. Líneas celulares

Se empleó la línea celular embrionaria derivada de riñón humano HEK-293 (Human Embryonic Kidney) (ATCC®, CRL-1573™), la cual está transformada con DNA del adenovirus 5 y es tumorigénica. Además, se empleó la línea celular U-2 OS (Human Osteosarcoma) (ATCC®, HTB-96™) que presenta morfología epitelial y es derivada de osteosarcoma.

Todos los cultivos se mantuvieron en medio Eagle de Dulbecco modificado (DMEM) enriquecido con suero bovino fetal al 10% (anexo 1.4) a 37°C en ambiente húmedo con CO₂ al 5%. Cuando

los cultivos alcanzaron un 85% de confluencia se realizaron pases celulares de la siguiente manera: se aspiró el sobrenadante del cultivo y se lavó con PBS para HEK-293 o PBS/EDTA para U-2 OS y esta solución también fue eliminada. Después se agregó una cantidad adecuada de tripsina al 0.5% (GIBCO®, 59418C), dejándola actuar por hasta 5 min hasta lograr el desprendimiento de las células. Luego se adicionó medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal para neutralizar la acción de la tripsina. La suspensión celular se centrifugó a 1,500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, eliminando la solución de tripsina. Las células se resuspendieron cuidadosamente y se emplearon para los ensayos o se continuaron cultivando en medio fresco.

6.8. Transfección

Para transferir el material genético a las células en cultivo se emplearon dos técnicas de transfección, por el método de precipitación con fosfatos de calcio o mediante lipofección en condiciones estériles.

Se sembraron 8×10^5 células HEK-293 en cajas Petri de 10 cm y se incubaron hasta permitir la adherencia y una confluencia del 70-80% aproximadamente aspirando el medio y añadiendo 2mL de medio de cultivo nuevo, tras lo cual los plásmidos correspondientes se transfectaron junto con 500 ng de plásmido LacZ como control de transfección, mediante precipitación con fosfatos de calcio: Se prepararon soluciones con 2,4,6 u 8 μg del plásmido pcDNAtopo-HPV18 E1, 22 μl de CaCl_2 2.5 M y 190 μl de Tris-EDTA (anexo 1.5). Esta mezcla se agregó gota por gota en 200 μL de solución hepes salina amortiguadora HBS 2x (anexo 1.6) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla final se agregó a las células. 24 h después de la transfección el medio de cultivo fue retirado. Esta técnica se utilizó inicialmente para transfectar la línea celular HEK-293 a partir de la cual se obtuvieron extractos proteicos que fueron utilizados para ensayos de Western Blot (WB) en la evaluación de la expresión de E1.

Posteriormente, se observó que la transfección fue más eficiente utilizando el método de transfección por liposomas. Para la expresión de E1 y E2 se empleó dicho método para lo cual se sembraron 6×10^5 células HEK-293 en cajas Petri de 10 cm o 2×10^5 células U-2 OS en cajas de 6 pozos y se incubaron hasta permitir la adherencia, entonces se cambió el medio de cultivo por 800 μL de OptiMEM (GIBCO®, 31985062). Al presentar una confluencia del 70-80% aproximadamente, se aspiró el medio y se añadieron 2 mL de medio de cultivo nuevo, tras lo cual los plásmidos correspondientes se transfectaron como se muestra en el (anexo 3). Se emplearon

2 tubos para cada una de las transfecciones, al tubo A se añadieron 3 µg de DNA junto con 200 µL de OptiMEM. Se preparó una solución de 6 µL de lipofectamina 2000 (Invitrogen®) y 200 µL de OptiMEM por cada transfección y de esta mezcla se añadieron 200 µL al tubo B. Todos los tubos se incubaron 5 min a temperatura ambiente y luego se mezcló el contenido del tubo A en el tubo B. Se realizó una incubación de 30 min y luego, por goteo en espiral se añadió la solución mezclada a cada caja Petri, incubando por cinco horas a 37°C en ambiente húmedo con CO₂ al 5%. Pasado el tiempo de incubación, se cambió el OptiMEM por 2 mL de medio de cultivo con suero. 24h después de la transfección el medio de cultivo fue retirado. Esta técnica se utilizó para transfectar la línea celular HEK-293 a partir de la cual se obtuvieron extractos proteicos que fueron utilizados para ensayos de Western Blot (WB) y U-2 OS para realizar ensayos de inmunofluorescencia.

Con el fin de determinar los niveles las especies reactivas de oxígeno, las células U-2 OS fueron transfectadas empleando FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega) y siguiendo las instrucciones del fabricante. 3 µg de plásmido fueron resuspendidos en 200 µL de medio e incubados durante cinco minutos, posteriormente la mezcla fue incubada con 8 µL de Fugene-HD durante 20 minutos. Todo el contenido fue transferido a las células e incubado 24 horas, tras lo cual se procedió a realizar el protocolo de Cell ROX, detallado más adelante.

6.9. Western Blot

Para detectar la expresión de las proteínas E1, E2 y los niveles enzimáticos de catalasa, superóxido dismutasa o glutatión peroxidasa, se realizaron ensayos de western blot de las células transfectadas.

6.10. Extracción de proteínas

A partir de las células transfectadas se obtuvieron extractos totales de proteína, para lo cual se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con 2 mL de PBS estéril. Posteriormente las cajas con los cultivos se colocaron sobre hielo y se añadieron 100 µL de amortiguador de lisis RIPA (anexo 1.6) que contenía un coctel de inhibidores de proteasas cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail (Roche®, 05892791001) 1x y se recolectaron las células manualmente raspándolas. El raspado se pasó de 10-15 veces por una jeringa de 1 mL, el lisado resultante se conservó a -70°C.

6.11. Determinación de la concentración de proteínas

Para cuantificar la concentración proteica de cada muestra se empleó el método del ácido bicinonínico. En una placa de 96 pozos se añadieron 2 μL de cada extracto proteico, o albúmina en cantidades crecientes para la curva estándar (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 o 15.0 μL de albúmina de suero bovino 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se añadió RIPA *cbp*. 15 μL . Luego se añadieron 300 μL de solución de trabajo de ácido bicinonílico con sulfato de cobre recién preparada en una relación 100:2 (v:v) (anexo 1.7) a cada pozo. Se incubó la placa a 37°C 1 h en oscuridad y se leyó la absorbencia en un lector de ELISA a 570nm. Se realizaron los cálculos pertinentes para determinar la concentración de las muestras a partir de la curva estándar.

6.12. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes (SDS-PAGE)

Se realizó una electroforesis en medio desnaturizante con el fin de separar, de acuerdo a su peso molecular, las proteínas presentes en las muestras. A cada muestra se le adicionó el volumen necesario de amortiguador de carga (anexo 1.8) con una relación 1:1 (v: v), a continuación, se colocaron en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos. Se cargaron 25 μg de proteína de cada muestra en geles poliacrilamida al 12% (anexo 1.9) siguiendo el método de Laemmli, 1970. La electroforesis se llevó a cabo en un amortiguador de corrida (anexo 1.10) inicialmente a 80 V por 30 minutos para permitir que las muestras se alinearan y posteriormente a 100 V hasta que el frente de corrida salió del gel.

6.13. Transferencia

Una vez que la electroforesis se completó, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de nitrocelulosa con poros de 0.2 μm (Bio-Rad®), en una cámara con solución amortiguador de transferencia frío (anexo 1.11) a 20V durante 1h en frío con agitación constante. Para corroborar la transferencia de proteínas, la membrana se tiñó con una solución de Rojo Ponceau se lavó con agua destilada hasta eliminar el colorante.

6.14. Bloqueo de membrana

La membrana se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche con agitación suave empleando una solución de leche (Svelty 0% grasa®) al 7.5% en una solución salina de

tris amortiguada (TBS-T) 1x. Al finalizar el bloqueo se realizaron 3 lavados con TBS-T 1x durante 10 min c/u, y la membrana fue incubada con los anticuerpos correspondientes durante 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4° seguido de tres lavados de 10 minutos con TBS-T 1X, posteriormente la membrana fue incubada con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 h seguido de 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-T 1X.

6.15. Incubación con anticuerpos

Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti-HA (1:1000) (ROCHE), anti-HPV18 E2 (abcam), anti- β -galactosidasa (1:1000), anti-Catalasa (1:300) (Cell Signaling), anti-SOD2 (1:1000) (Cell Signalling), o anti-GPX (1:100) (Cell Signaling). Los anticuerpos secundarios empleados en este trabajo fueron: anti-conejo (1:10000), anti-ratón (1:10000) o anti-cabra (1:15000) unidos a HRP, según el caso los cuales se encontraban disueltos en TBS-T 1X.

6.16. Reconocimiento de anticuerpos

La detección de las proteínas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia de alta sensibilidad, en este método el peróxido del luminol y un activador son sustratos de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario reaccionan y producen luminiscencia permitiendo la detección con placas radiográficas o mediante un instrumento de detección digital c-Digit (LI-COR).

6.17. Inmunofluorescencia

Las diferentes líneas celulares fueron cultivadas sobre cubreobjetos esterilizados y transfectadas, según el experimento. 24 h post-transfección, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con una solución al 2% de paraformaldehído en PBS durante 15 min a temperatura ambiente en agitación y cubiertas de la luz. Después de 3 lavados de 5 min en agitación con PBS, las células se permeabilizaron con una solución de tritón al 0.25% en PBS por 10 min a temperatura ambiente en agitación, tras lo cual se lavaron nuevamente tres veces con PBS durante 5 min en agitación seguido de tres lavados con glicina 0.1 M. Al finalizar los lavados, se incubaron las células con los anticuerpos primarios 1:50 en PBS en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C como se indica en la [tabla 4](#). Al día siguiente las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios acoplados a los fluoróforos Alexa 488, Rodamina, Alexa 555 y Alexa 647 ([tabla 4](#)) en una dilución 1:700 en PBS, en cámara húmeda por 0.5 h a 37°C cubierta de la luz. Transcurrido el tiempo, se realizaron 3 lavados de 5 min c/u en agitación con PBS y un lavado de 5 min c/u en agitación con agua. Finalmente, para el montaje

de las inmunofluorescencias, se retiró el exceso de agua de los cubreobjetos, se montaron sobre portaobjetos con una gota de medio de montaje con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, ProLong® Diamond Antifade Mountant with DAPI, Molecular Probes, P36962) y se dejaron madurar 2 h, tras lo cual se guardaron a 4°C cubiertas de la luz hasta su observación en el microscopio. Las microfotografías fueron capturadas con un microscopio confocal ZEISS LSM 5 PASCAL de la unidad e microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas y con el microscopio de epifluorescencia EVOS FL (Thermo Fisher Scientific). Las inmunofluorescencias se realizaron para detectar la expresión y co-expresión de E1 y E2, así como para evaluar el daño a DNA empleando como marcador de daño la histona fosforilada γ -H2AX.

Tabla 4.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
HA Roche	Alexa Fluor® 488 burro anti-ratón
HPV18 E2 Santa Cruz	Alexa Fluor® 594 pollo anti-cabra
γ -H2AX P(S139) Abcam o Millipore	Alexa Fluor® 633 cabra anti- conejo

6.18. Detección de especies reactivas de oxígeno

Las células U-2 OS fueron sembradas en cajas de seis pozos con una densidad de 2×10^5 células sobre cubreobjetos estériles. A las 24 h se cambió el medio de cultivo. 48 h después se realizó la transfección cuando el porcentaje de confluencia fue de alrededor del 80% con el método de liposomas con Fugene HD Transfection Reagent® (Promega). 24 h post-transfección se renovó el medio de cultivo. Simultáneamente se añadió una solución de H_2O_2 100 μ M a un pozo, como control positivo de estrés oxidante, y se incubó la placa 2h a 37°C en ambiente húmedo con CO_2 al 5%. Al finalizar el tiempo de incubación, el control positivo se lavó 3 veces con PBS y se renovó el medio de cultivo de todos los pozos. En oscuridad se añadió el reactivo CellROX Green Reagent (Invitrogen, ThermoFisher Scientific,) a una concentración final de 10 μ M y se mezcló con el medio de cultivo, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Tras 0.5 h de incubación con la sonda de detección de ROS, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y fijadas con paraformaldehído frío al 0.25% en PBS, incubando 15 minutos en agitación constante protegida de la luz. Por otro lado, se obtuvieron extractos proteicos de las células adheridas a los pozos que quedaron tras retirar los cubreobjetos para realizar WB y confirmar la expresión de E1

y E2. Finalmente, después de fijar, las células fueron lavadas 3 veces con PBS frío y se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje Fluoromont™ Aqueous Mounting medium y madurando por 2h las inmunofluorescencias. Inmediatamente se capturaron microfotografías en el microscopio de epifluorescencia EVOS FL (Thermo Fisher Scientific), normalizando el tiempo de exposición a la luz de excitación con un cronómetro.

6.19. Análisis estadístico

Para la comparación de resultados se realizaron análisis estadísticos empleando el programa GraphPad Prism 5 aplicando la prueba de Dunnett que compara la media de cada tratamiento con la media del control. Se realizaron 3 ensayos independientes, los datos se expresan como la media +- la desviación estándar, $\bar{x} \pm DE$.

7. RESULTADOS

7.1. E1 y E2 de VPH18 se expresan en la línea celular HEK-293 y U-2 OS

Este trabajo se centra en el papel del VPH18, específicamente de sus proteínas de expresión temprana E1 y E2, además se incluyó a la proteína E1 de VPH11 como modelo de VPH de bajo riesgo. Para el establecimiento del modelo de estudio, inicialmente se recuperaron los plásmidos de expresión de las proteínas de interés transformando bacterias *E. coli* DH5 α . Una vez que se obtuvieron los plásmidos purificados, estos se secuenciaron para comprobar la identidad de los genes clonados.

Una vez comprobada la identidad de los plásmidos se estableció el modelo de estudio expresando de manera individual a E1 de VPH 18 (E1-18 en adelante), E2 de VPH18 (E2-18 en adelante) y E1 de VPH11 (E1-11 en adelante) en la línea celular HEK-293.

Para comprobar la expresión de E1 y E2 en HEK-293 se realizó el western blot ([figura 14](#)). En este trabajo se emplearon proteínas recombinantes de E1 que en su extremo amino terminal tienen fusionada la etiqueta HA que nos permitió detectar mediante un anticuerpo anti-HA comercial a E1, esto debido a la falta de anticuerpos eficientes dirigidos contra E1 de VPH11 y 18. Mientras que para el caso de E2 se empleó un anticuerpo comercial.

La expresión de los plásmidos transfectados fue corroborada mediante western blot. En la [figura 14 A](#)) se observa una banda de aproximadamente 72 KDa correspondiente a E1 del VPH18 o del VPH11. Alrededor de los 116 KDa se observa una banda que corresponde a β -galactosidasa (enzima del operón Lac de bacterias) en las células transfectadas, pues se empleó como control de transfección, para lo cual se co-transfectó al plásmido Lac Z junto con cada plásmido de interés y la expresión de la β -galactosidasa en cada caso indica que nuestras condiciones de transfección fueron exitosas en este modelo. Así bajo estas mismas condiciones, logramos observar la expresión de las proteínas de interés E1 de VPH18 en una banda de alrededor de 72 KDa (panel A, [figura 14](#)) y E2-18 en una banda alrededor de 45 KDa (panel B, [figura 14](#)). En el caso de E1 de VPH11, probamos dos plásmidos donados por el Dr. Mart Ustav, elegimos el que arrojó un patrón de expresión similar a E1-18: *plásmido a*, cuya banda se observó similarmente en 72 KDa en el panel A de la [figura 14](#).

Así mismo en el panel *B)* se presenta la banda correspondiente a E2-18, alrededor de los 45 KDa. Ni las células sin transfectar (HEK-293), ni el vector vacío mostraron las bandas de E1 o E2 con lo que se comprueba la especificidad de los anticuerpos empleados y la expresión de las proteínas E1 y E2.

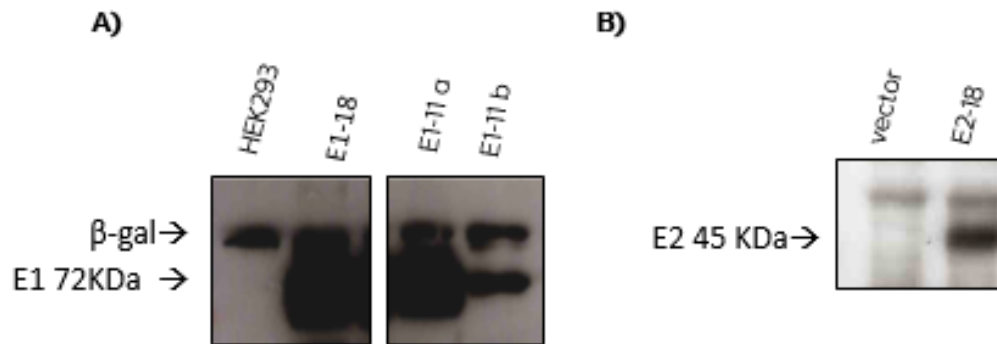
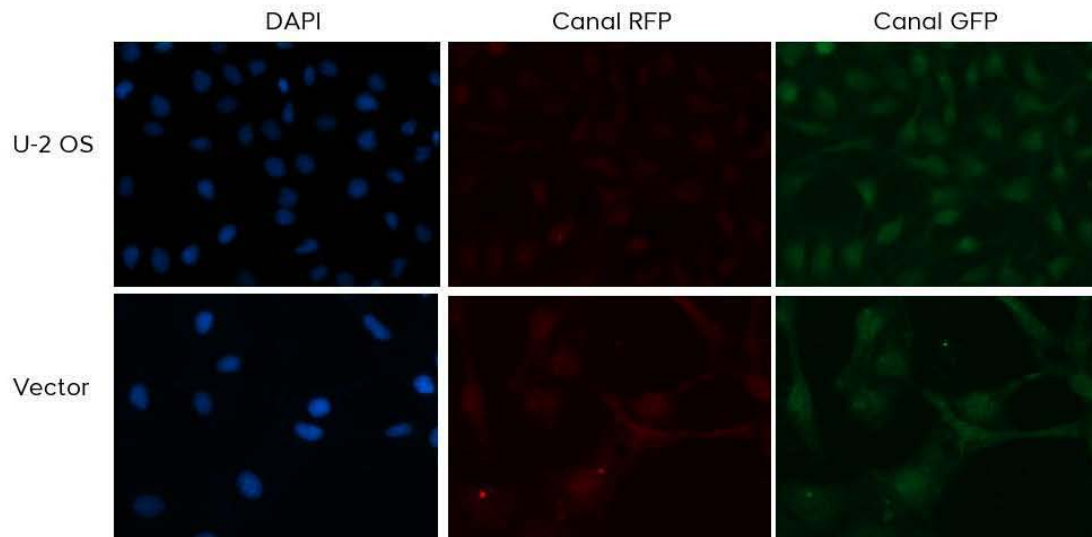


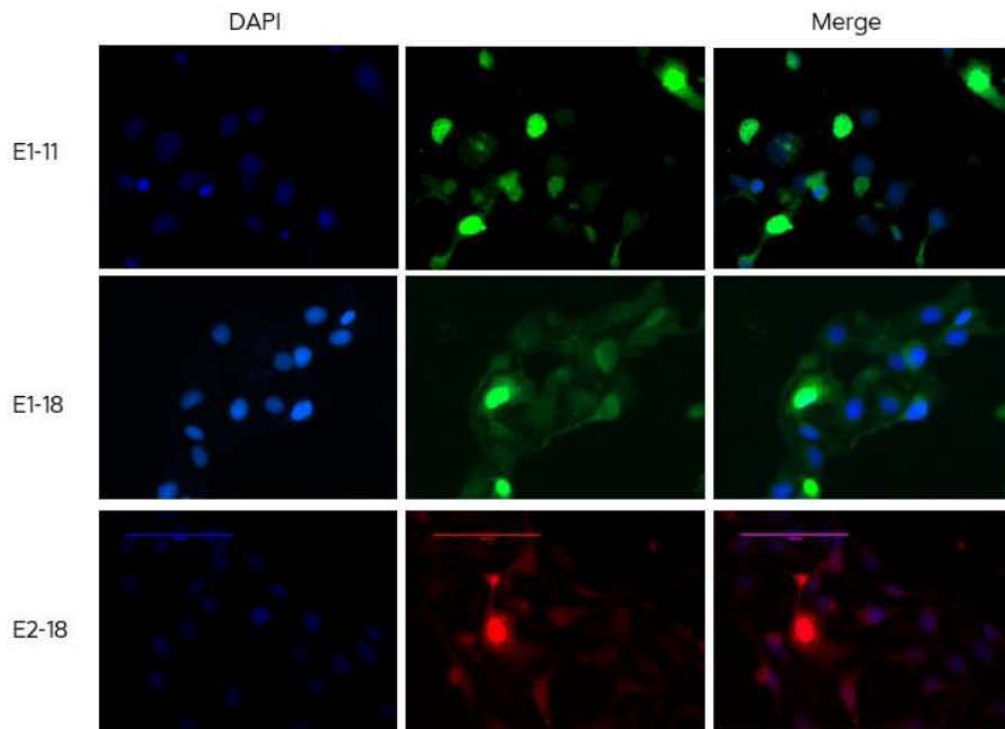
Figura 14. **E1 y E2 se expresan en HEK-293.** El western blot muestra la expresión de las proteínas 24h después de transfectar los plásmidos de interés en la línea celular HEK-293. En el panel A) se observa una banda a 120 KDa que corresponde a β -galactosidasa, con lo que se comprueba la transfección exitosa mediante precipitación por fosfatos de calcio, más abajo, alrededor de los 72KDa, se observa la banda de E1-11 y E1-18 que se encuentra ausente en las células que no fueron transfectadas (primer carril). El panel B) muestra la expresión de E2-18, cuya banda de 42KDa está ausente en células transfectadas con el vector vacío.

Para evaluar el efecto de la interacción de E1 y E2, primero se corroboró la expresión conjunta de E1 y E2 de VPH18 (E1+E2 en adelante) en células U2-OS co-transfectadas, mediante inmunofluorescencia. Así mismo, se transfectaron individualmente los plásmidos de interés. Los resultados que se exponen en la [figura 15](#) muestran en el panel *A)* las células sin transfectar y aquellas que fueron transfectadas con el vector vacío en donde se observa una ligera señal de ruido. En contraste, en la [figura 15 panel B\)](#), se observa la expresión de E1-11 y E1-18 en verde; ambas proteínas presentan una localización principalmente nuclear, como se denota al observar el empalme de las dos imágenes (*merge* en inglés); sin embargo, en aquellas células que sugieren tener mayor expresión de E1, la señal presenta una localización tanto nuclear como citoplasmática. En la última fila se observa la expresión de E2-18 más uniforme entre todas las células, localizándose tanto en el núcleo como en el citoplasma. El panel *C)*, por su lado, muestra la co-expresión de las proteínas E1-18 y E2-18, como se denota por el color amarillo que toman algunas células en la imagen correspondiente al *merge* de ambas señales. Además, se observa una señal mayor para el caso de E1-18 respecto a E2-18.

A)



B)



C)

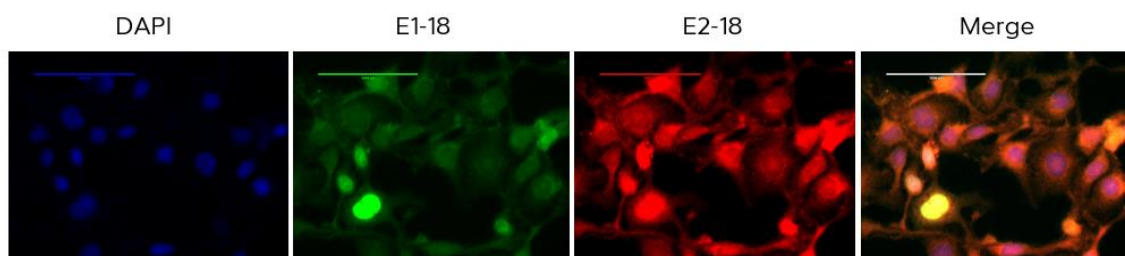


Figura 15. **Análisis de la expresión de E1 y E2 en células U-2 OS.** En el panel **A)** se muestran los controles negativos que corresponden a las células sin transfectar y a las células transfectadas con un vector vacío. El panel **B)** muestra las imágenes de las células transfectadas con los plásmidos que codifican para E1-11 (verde) primera fila, E1-18 (verde) segunda fila o E2-18 (rojo). El panel **C)** muestra la co-expresión de E1-18 (en verde) y E2-18 (en rojo). Los núcleos que fueron teñidos con DAPI se muestran color azul. En todos los casos del panel B) y C) se observa una expresión de las proteínas de interés y una localización tanto nuclear como citoplasmática. Las inmunofluorescencias mostradas fueron realizadas 24 h después de ser transfectadas con Fugene con los respectivos plásmidos de expresión. Las microfotografías se capturaron en microscopio de epifluorescencia y se presentan imágenes representativas de uno de los 3 ensayos realizados.

7.2. E1 y E2 de VPH18 modulan niveles de enzimas antioxidantes

Una vez establecido el modelo de expresión de E1 y E2 se procedieron a evaluar aspectos del estado redox celular. Como ahora se sabe, el estado redox puede modificarse por un lado al variar los niveles de ROS y por el otro, al modificar la cantidad y/o actividad de antioxidantes, así que se evaluaron los niveles de algunas de las principales enzimas antioxidantes, incluyendo la SOD, catalasa y GPX, en presencia de las proteínas virales.

En la [figura 16](#), panel **A)** y **B)** se observa una disminución significativa en los niveles de la superóxido dismutasa 2 (SOD2) en las células que expresan E1-18 y E2-18, este efecto fue mayor en las células co-transfectadas con E1 y E2 de VPH18; mientras que con E1-11, a pesar de que se observan niveles de más bajos SOD2, su disminución no fue significativa respecto a las células transfectadas con el vector.

De manera similar, se evaluaron los niveles de la enzima antioxidante catalasa mostrados en el panel **C)** y **E)**. La catalasa presentó niveles más bajos que los de SOD2, y estos niveles aparentemente no presentan cambios evidentes respecto al vector, sin embargo, parece haber un ligero incremento en E2-18, pero una disminución con E1+E2.

La otra enzima evaluada fue GPX que no presenta cambios notorios entre el vector y las proteínas

de alto riesgo, pero cuando se comparan el vector *versus* E-11 se observa una notoria disminución de los niveles de GPX (panel D y E de la figura 16).

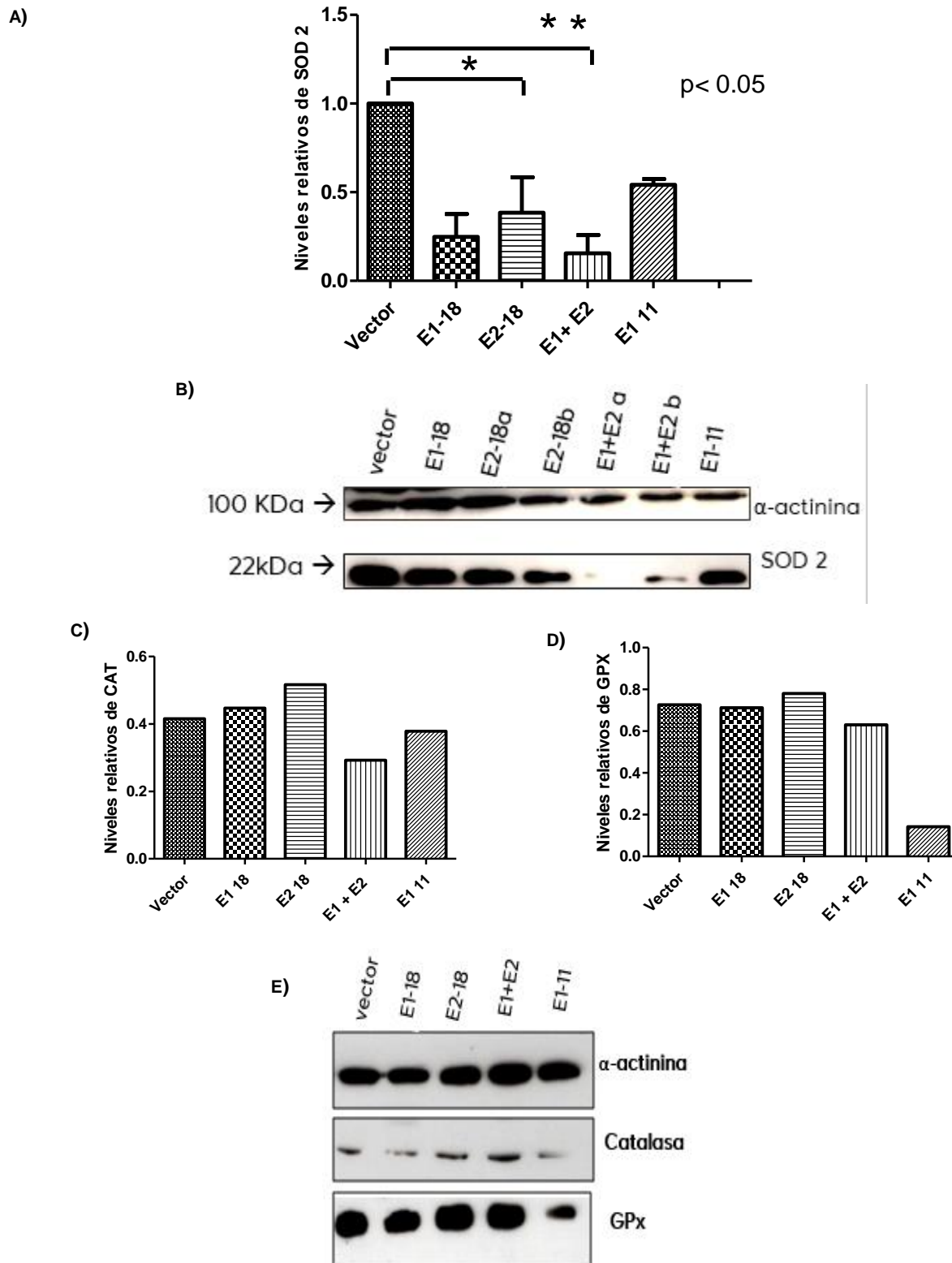


Figura 16. E1 y E2 varían los niveles de enzimas antioxidantes. En el panel A) se presenta la gráfica correspondiente a los niveles de SOD2... CONTINÚA EN LA SIGUIENTE PÁGINA

Figura 16. **E1 y E2 varían los niveles de enzimas antioxidantes.** En el panel **A)** se presenta la gráfica correspondiente a los niveles de SOD2 en relación con el nivel basal de esta enzima antioxidante en células transfectadas con el vector vacío. La gráfica representa 3 repeticiones del ensayo y arroja diferencias significativas entre el vector y E1-18*, E2-18*, y E1+E2**, en contraste, los niveles de superóxido dismutasa 2 (SOD2, 22 KDa) no variaron en vector vs E1-11, (prueba Dunnet $p < 0.05$, las barras de error representan la desviación estándar). En el panel B) se muestra el western blot representativo. Adicionalmente, se evaluaron los niveles de catalasa (60 KDa), panel D), sin observar cambios aparentes como se observa en el panel C) (densitometría promedio de las dos repeticiones, Cat/ α -actinina y GPX/ α -actinina); mientras que los niveles de glutatión peroxidasa (GPX, 22 KDa) disminuyeron notoriamente con E1-11 respecto al vector, se muestran un ensayo de western blot. En los ensayos que corresponden a western blot cada carril se cargó con 25 μ g del extracto proteico obtenido 24 h después de transfectar la línea celular HEK-293 por lipofección, el control de carga es la α -actinina que presenta un peso molecular de 100 KDa.

7.3. Las proteínas de expresión temprana E1 y E2 de VPH18 incrementan los niveles de especies reactivas de oxígeno

Dado que observamos una disminución de la enzima antioxidante SOD2 cuando E1-18 y E2-18 se expresan, el siguiente objetivo fue determinar el efecto de estas proteínas de expresión temprana en los niveles de ROS. Para esto se empleó el reactivo CellROX Green Reagent, una molécula permeable que en su estado reducido no emite fluorescencia, mientras que tras la oxidación es fluorescente (con una excitación/emisión máxima a 485/520 nm). Las microfotografías representativas de uno de tres ensayos se muestran en la [figura 17 A\)](#). En el control, las células transfectadas con el vector muestran una señal débil que concuerda con lo indicado por el fabricante, mientras que el control positivo, al que se incubó previamente 2 h con H_2O_2 100 μ M, muestra niveles elevados de ROS. Por otro lado, se observa que tanto E1-18 como E2-18 presentan niveles de ROS notoriamente elevados respecto al vector e inclusive estos niveles parecen ser mayores a los del control positivo, este incremento también se observa en células con E1-11, pero en menor medida. Los diferentes ensayos muestran un patrón similar de distribución de ROS con puntos que concentran la señal y con una localización aparentemente tanto nuclear como citoplasmática (observando en campo claro, datos no presentados). Para corroborar la expresión de E1 y E2 en este sistema, simultáneamente se obtuvo el extracto proteico de las células que quedaron en cada pozo tras retirar el cubreobjetos y se realizó un western blot, la expresión de ambas proteínas se observa en la figura 17 B).

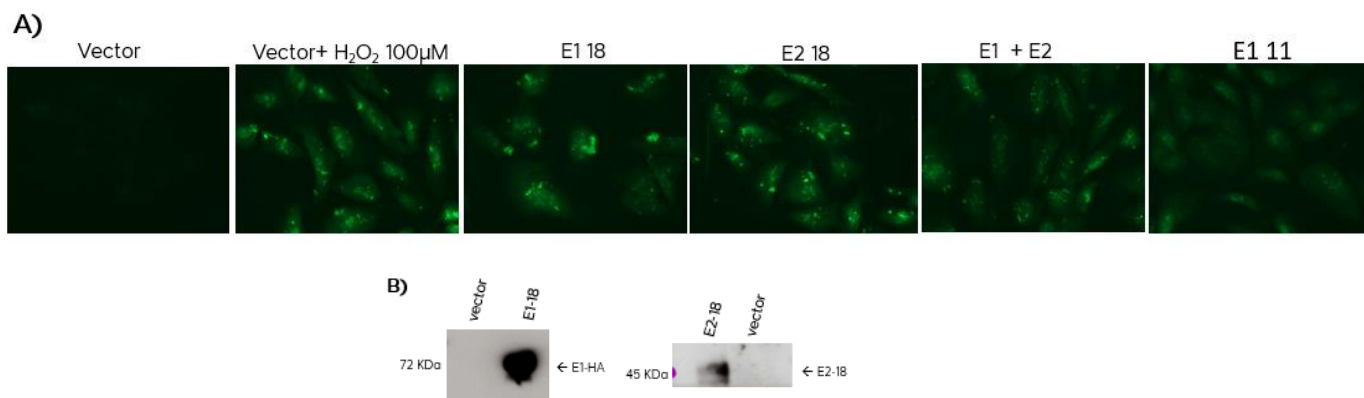


Figura 17. **E1 y E2 de VPH 18 incrementan los niveles de especies reactivas de oxígeno.** **A)** Los niveles de ROS se evaluaron en células U-2 OS 24h después de ser transfectadas. El control positivo fue incubado con H₂O₂ 100µM 2h previas a la adición a toda la placa del reactivo CellROX Green Reagent (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) 10µM durante 0.5h, se muestran imágenes representativas de un experimento. Las microfotografías se capturaron en un microscopio de epifluorescencia cuidando que cada campo estuviese expuesto sólo 30s a la luz emitida. Se muestran imágenes representativas de 3 ensayos distintos. E1-18, E2-18 y E1+E2 presentan los niveles más altos de ROS comparables (o mayores) a los niveles del control positivo (vector+ H₂O₂ 100µM), seguidos de E1-11, con respecto a las células transfectadas únicamente con el vector. **B)** Expresión de E1-18 y E2-18 en las células empleadas en el ensayo de CELLROX.

7.4. E1 y E2 de VPH18 inducen daño a DNA medido por la γ -H2AX

Demostramos que E1 y E2 de VPH18 disminuyen los niveles de la SOD2 y que hay un incremento de los niveles de ROS, en un escenario estos dos eventos podrían estar relacionados. Dado que el estrés oxidante generado por las proteínas virales es una potencial fuente de daño a DNA, se decidió evaluar un marcador de daño. La variante de histona H2AX se fosforila en respuesta a la ruptura de DNA de doble cadena (DSBs, del inglés *double strand breaks*), por lo que se empleó como marcador de daño a DNA un anticuerpo dirigido contra la forma activa fosforilada de esta histona, γ -H2AX (fosforilada en la serina139). Las microfotografías tomadas en un microscopio confocal se presentan en la [figura 18](#). En la segunda fila se observa que en las células que expresan E1-18 (verde) o E1+E2, existe un incremento en la señal de γ -H2AX. Sin embargo, este efecto no se observó cuando las U-2 OS expresaban exclusivamente a E2-18 (rojo). Mientras que tanto las células transfectadas con E1-11, como las transfectadas con el vector, mostraron niveles similarmente bajos de esta señal, que fueron menores a los niveles observados en las células no transfectadas.

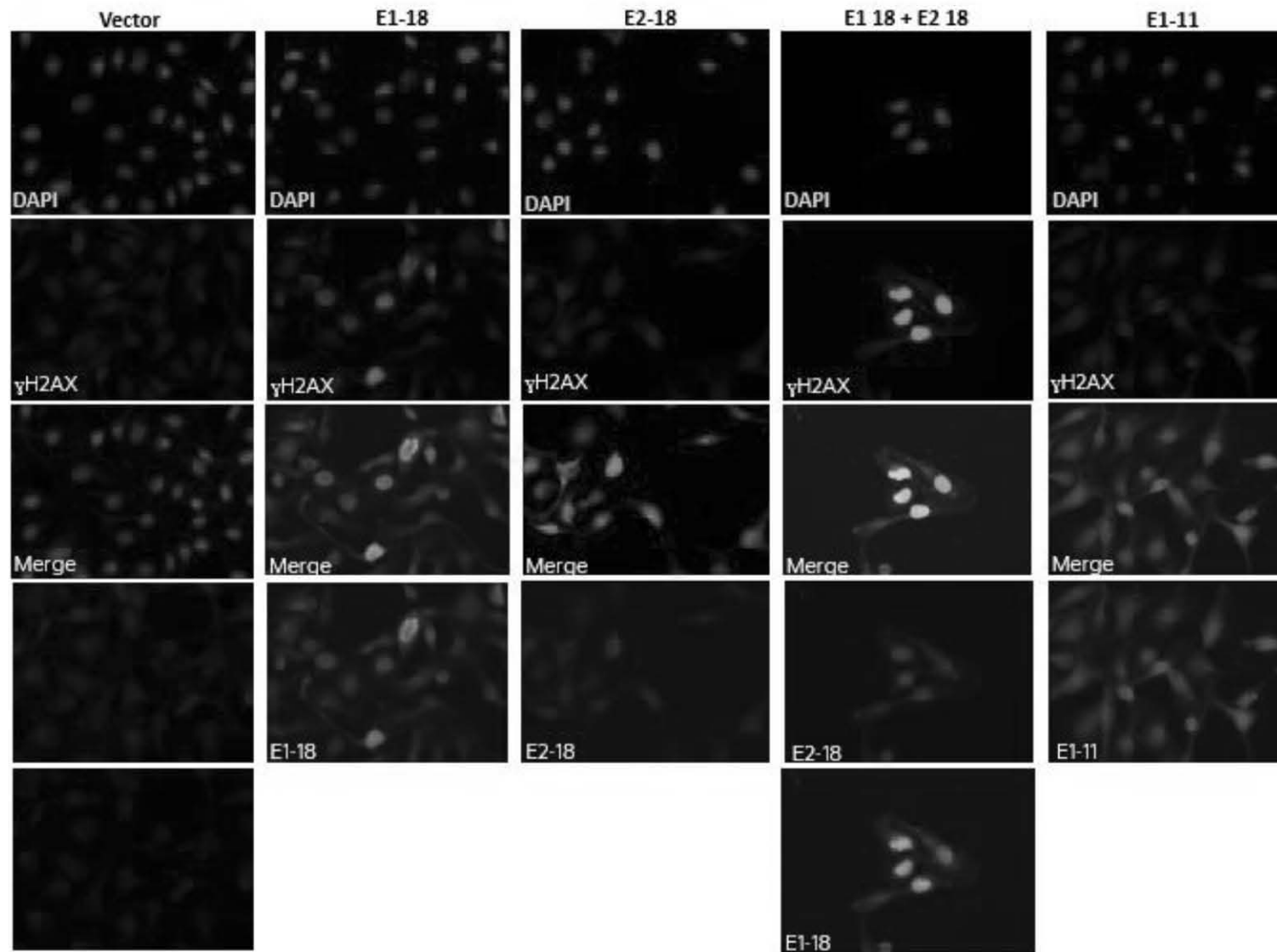


Figura 18. **E1 y E2 de VPH18 incrementan la señal de γ -H2AX.** Células U-2 OS fueron transfectadas con los plásmidos correspondientes mediante lipofección con Fugene. 24 h post-transfección se realizó una inmunotinción (en color magenta) para detectar γ -H2AX como marcador de ruptura de la doble cadena de DNA. E1-18 o E1-11 se observan en color verde, E2-18 en color rojo y los núcleos fueron teñidos

8. DISCUSIÓN

Los avances que ha habido hasta ahora nos han permitido conocer más acerca del cáncer asociado al VPH; sin embargo, dentro de este proceso maligno aún existen aspectos importantes que permanecen desconocidos o poco entendidos. Tal es el caso del evento o los eventos clave que permiten la integración del genoma viral al genoma celular, que permanecen desconocidos y que finalmente son los que conducen a la sobreexpresión de las oncoproteínas virales (E6 y E7) y de esta manera a la progresión hacia cáncer. Entre los factores ambientales, el estrés oxidante es un candidato que se ha propuesto con base en la alteración del estado redox encontrada tanto en muestras de pacientes, como en líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino, en las que se presenta estrés oxidante, a diferencia de muestras de mujeres sanas^{65,77}.

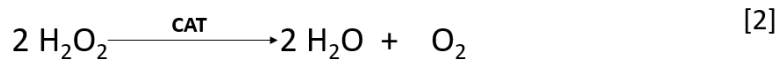
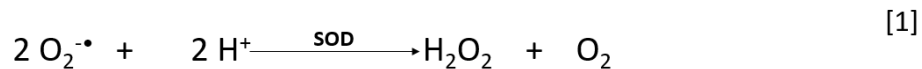
Ahora se sabe que las oncoproteínas virales E6 y E7 de los virus de alto riesgo alteran el estado redox celular⁷¹⁻⁷³ pero poco o nada se sabe acerca de E1 y E2. Por lo cual, es importante conocer si estas proteínas virales, que al igual que E6 y E7 se expresan desde el inicio de la infección, podrían contribuir a la carcinogénesis mediante la modulación del estado redox celular, la inducción de estrés oxidante y/o el daño a DNA.

Para responder estas preguntas se estableció un modelo de expresión de E1 y E2 de VPH18 (uno de los principales virus de alto riesgo) en las líneas celulares HEK-293 y U-2 OS, que previamente han demostrado ser un buen modelo de estudio de los mecanismos de acción de dichas proteínas^{34,74,78,79}. Además, el hecho de que sólo algunos de los virus que infectan al ser humano sean capaces de inducir la aparición de cáncer nos conduce a plantear que existen diferencias y/o ventajas en los virus de alto riesgo que los hace potencialmente oncogénicos. Estas diferencias se sabe que existen, por ejemplo en el caso de E6 y E7 de diferentes tipos de VPH²¹; así que para determinar si en este contexto se presentaba alguna diferencia respecto a E1-18 incluimos en los experimentos a E1 de VPH11, el cual es uno de los virus más comunes de bajo riesgo. Al mismo tiempo, sabíamos que E1 y E2 colaboran en diversas funciones biológicas y nos cuestionamos si, más allá de su papel en la replicación, estas proteínas virales también podrían cooperar entre sí en la modulación del estado redox, por lo que decidimos probar el efecto tanto de la expresión individual, como de la co-expresión de E1 y E2 de VPH18.

Para evaluar el efecto de la presencia de ambas proteínas se eligió co-transfectar células U-2 OS, pues esta línea celular ha mostrado ser un buen modelo para el estudio de proteínas de VPH expresadas de forma exógena⁷⁸. En la [figura 15](#) observamos que ambas proteínas se encuentran

en el núcleo, resultados que consideramos consistentes con la biología del VPH, pues se requiere que ambas proteínas estén en el núcleo para poder llevar a cabo sus funciones en la replicación.

Una vez establecido el modelo de estudio y sabiendo ahora que el estrés oxidante podría ser un vínculo entre las infecciones con VPH y su progresión hacia cáncer, nos dimos a la tarea de evaluar los niveles de tres de las enzimas cuyos niveles están alterados en muestras de pacientes con CaCu: catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa⁶⁵. Las defensas antioxidantes son extremadamente importantes para regular los niveles de ROS y el estado redox celular, impidiendo de esta manera que se genere algún daño oxidante en las células. Dicha protección se lleva a cabo en las células por un sistema complejo en el que los sustratos y las enzimas que los transforman se encuentran en una red de cooperación, como se puede visualizar en el esquema de la [figura 13](#). Los antioxidantes enzimáticos más eficientes incluyen precisamente a la SOD, la CAT y la GPX, cuyas reacciones enzimáticas se encuentran estrechamente relacionadas⁴⁵, como se muestra en las reacciones siguientes:



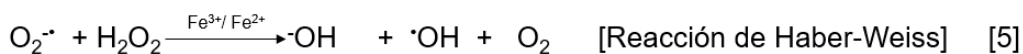
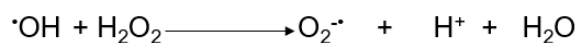
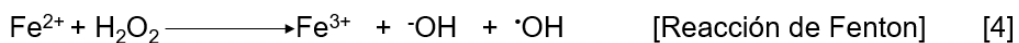
La catalasa (EC1.11.1.6) es una enzima tetramérica que consiste en 4 subunidades idénticas de 60 KDa, cuya banda observamos en la [figura 16](#) panel E. La CAT reacciona muy eficientemente con el H₂O₂ para formar agua y oxígeno molecular (reacción [2]). El peróxido de hidrógeno es detoxificado por la catalasa y por la glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.19), una enzima que contiene selenio-cisteína en sus 4 subunidades que observamos a 22KDa en la [figura 16](#). La GPX cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno utilizando GSH (reacción [3]), que es uno de los mecanismos de defensa antioxidante más esenciales⁸⁰. La GPX1 que estudiamos se localiza en la matriz mitocondrial⁸¹ y sus niveles no presentaron cambios aparentes entre las células que expresaban las proteínas virales de alto riesgo y el control en los dos ensayos realizados; sin embargo, los niveles de esta enzima disminuyeron notoriamente cuando E1-11 se expresaba, y a pesar de que la observación no es concluyente puesto que requiere un mayor número de ensayos, podría indicar que no sólo los virus de alto riesgo son capaces de modular el estado redox, sino que también los VPH de bajo riesgo, aunque probablemente por mecanismos diferentes, pero de algún modo requieren inducir un estrés oxidante para la formación de su

cápside, como sustentan varios autores^{69,70}. Es interesante notar que los niveles de la CAT presentaron variaciones evidentes entre todos los grupos de estudio, sin embargo, pareciera que únicamente cuando E2-18 se expresa, los niveles de catalasa se incrementan ligeramente. Esta sutil variación podría ser en respuesta al incremento de los niveles de ROS observados por Lai y colaboradores⁷⁵ durante la expresión de E2 de VPH18 durante el cambio metabólico en la mitocondria.

Uno de los antioxidantes enzimáticos intracelulares más efectivos es la superóxido dismutasa (EC.1.15.1.1) que cataliza la dismutación del altamente reactivo radical anión superóxido, en peróxido de hidrógeno y en oxígeno molecular, ambas especies menos reactivas (reacción [1])⁴⁵. La regulación de la concentración de $O_2^{\cdot-}$ es tan importante que las células poseen 3 diferentes enzimas SOD codificadas por distintos genes, su naturaleza difiere en la localización y el metal que emplean como cofactor. La SOD1 es principalmente citosólica y emplea como cofactor Cu/Zn, al igual que la SOD3 que es secretada y se encuentra en la membrana citoplasmática, mientras que la SOD2 emplea Mn y se localiza en la matriz mitocondrial. De estos tres compartimientos celulares, la mitocondria cobra mayor relevancia al ser la principal fuente celular del radical $O_2^{\cdot-}$, por la fuga de electrones de los complejos I,II y III durante el proceso de fosforilación oxidativa^{80,82}.

Nuestros resultados revelan que los niveles de la superóxido dismutasa 2 (SOD2) disminuyen significativamente cuando se expresan E1-18 o E2-18 y esta disminución en los niveles enzimáticos es aún más marcada cuando se co-expresan E1+E2 (*figura 16* panel A y B). Interesantemente no se presentó una disminución estadísticamente significativa de los niveles de esta enzima en células que expresan la proteína E1-11 de VPH de bajo riesgo en las mismas condiciones experimentales, lo cual denota ser una función particular de los VPH de alto riesgo.

La disminución de los niveles de SOD puede implicar a su vez una disminución de la actividad enzimática y conducir al incremento de la cantidad de $O_2^{\cdot-}$. Este radical puede oxidar rápidamente a las enzimas, y liberar el Fe^{2+} de los centros catalíticos de otras enzimas que contengan centros de (4Fe-4S) (e.g. 6-fosfogluconato deshidrogenasa) estableciendo el inicio de la reacción de Fenton (reacción[4]) y la reacción de Haber Weiss (reacción [5]), estas dos reacciones producen el radical hidroxilo HO^{\cdot} , la ROS más potente conocida en los sistemas biológicos capaz de atacar virtualmente cualquier blanco celular, incluyendo al DNA ⁵⁶.



Así mismo el $\text{O}_2\cdot^-$ puede reaccionar con el óxido nítrico en la mitocondria y generar más especies reactivas de oxígeno y nitrógeno^{81,83}. De esta manera el $\text{O}_2\cdot^-$ genera intermediarios tóxicos que oxidan lípidos, cofactores metálicos, proteínas y ácidos nucleicos. Entonces la disminución de SOD2 puede traer drásticas consecuencias a la célula debido al daño de estructuras subcelulares clave por las ROS y este daño podría favorecer la carcinogénesis o ser el responsable de algunas características de las células cancerosas⁸⁴.

Los datos que encontramos encajan con el trabajo de Lai y colaboradores⁷⁵ en un posible escenario en el que la alteración de la morfología mitocondrial que encontraron, podría deberse al estrés oxidante generado por la disminución de la SOD2. El efecto de E2 de alterar la morfología mitocondrial únicamente se presenta con E2 de VPH de alto riesgo, la cual es capaz de localizarse tanto en núcleo como en citoplasma, a diferencia de la de bajo riesgo⁷⁵, así el evento que observamos podría ser específico de los virus de alto riesgo oncogénico, en los que E2 es capaz de localizarse en mitocondria y de alguna manera también es capaz de disminuir los niveles de la SOD2 induciendo daño mitocondrial. Esto es factible pues la mitocondria es particularmente susceptible al daño por el radical superóxido y las ROS derivadas de éste atacan los centros de hierro-azufre u otros metales (como el Mn de la SOD2) de varias enzimas mitocondriales y de esta manera, repercutir en la inactivación de los complejos I y V de la cadena transportadora de electrones, la aconitasa, la glutatión peroxidasa y la misma SOD2⁸¹.

Además, los niveles elevados de $\text{O}_2\cdot^-$ en la mitocondria tienen como una de sus principales biomoléculas blanco el DNA propio de este organelo (mitDNA), que es altamente susceptible a daño oxidante no sólo por la cercanía de los sitios de producción del radical, sino que también por la deficiencia de histonas que protejan el mitDNA⁵⁸. Al $\text{O}_2\cdot^-$ se le suman una gran cantidad de lipoperóxidos ya que la mitocondria es rica en ácidos grasos poliinsaturados susceptibles a lipoperoxidación. De este modo especulamos que uno de los primeros efectos del incremento de $\text{O}_2\cdot^-$ y otras ROS derivadas puede ser causa de la disfunción mitocondrial observada por Lai y colaboradores⁷⁵, resultando en una disfunción de los procesos vitales.

De manera similar, la disminución de SOD2 causada por la expresión de E1-18 es un evento que también podría influir en la alteración de los niveles de ROS y este efecto nunca antes se describió para E1. Así, en las condiciones en las que se co-expresan E1+E2 podría haber un efecto cooperador que observamos en una alteración potenciada de los niveles enzimáticos. E1 y E2 son proteínas poco estables cuyo tiempo de vida media se incrementa por la interacción entre sí y que la unión de E2 con E1 de VPH 18 se da a través del dominio N-terminal de E2³⁴ (ver [figura 4](#)), que es un blanco para la degradación proteica vía proteosoma, dado lo cual podría considerarse que E2 queda protegida de la degradación cuando se encuentra unida a E1, así entonces, el efecto mayor que se observa con E1+E2 podría deberse a la estabilización mutua de ambas proteínas. Sin embargo, cabe señalar que esta idea no excluye la posibilidad de que se esté presentando un efecto sinérgico y que por ello se observe un mayor efecto en presencia de ambas proteínas, por lo cual serían necesarios más experimentos que prueben dichas ideas.

La expresión o actividad enzimática alteradas de la SOD2 se ha ligado a muchas enfermedades incluyendo desórdenes neurológicos y cáncer, dado que la mitocondria participa en muchas funciones celulares, incluyendo producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa y otros aspectos del metabolismo, regulación del ciclo celular, respuesta a estrés y apoptosis⁸¹. Así, muchos autores han encontrado niveles de SOD2 alterados a lo largo del proceso carcinogénico de varios tipos de cáncer⁶⁷. En general se observa que los niveles de SOD2 están disminuidos en las células cancerosas en comparación con células normales⁸¹, datos que sustentan nuestra hipótesis.

Además, es importante considerar que la disminución de la SOD2 por las proteínas virales puede favorecer el proceso carcinogénico al inducir la alteración de la función mitocondrial y el desarrollo del fenotipo metabólico observado en las células cancerosas en el efecto Warburg que Lai y colaboradores⁷⁵ encontraron con la expresión de E2 de VPH18. El efecto Warburg es un cambio en la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa a la generación de ATP a través de la glicólisis que es una vía mucho más rápida. Algunos autores mencionan que este evento puede estar favorecido por la alteración de la función mitocondrial debida a la disminución de la SOD2 en las células cancerosas⁸⁵.

Por otro lado, se ha encontrado que algunas de las ROS generadas durante la disminución de la SOD2 pueden atravesar las membranas celulares y difundir⁵⁹, este fenómeno explicaría los niveles incrementados de ROS que observamos cuando se expresan E1-18, E2-18 y E1+E2 en [la figura 17](#). Sin embargo, este efecto de estrés oxidante no se observa tan marcadamente cuando E1-11 se expresa. El reactivo empleado CellROX Green reagent se une al DNA y por esto su

señal está principalmente localizada en el núcleo y en la mitocondria. Planteando un posible escenario, la disminución de la SOD2 por las proteínas virales de VPH18 induce una elevación de los niveles de ROS, niveles que son comparables con el control positivo al que se retó con 100 μ M de peróxido de hidrógeno indicando que las proteínas virales de los VPH de alto riesgo son capaces de inducir incremento de ROS, los mecanismos de estos procesos aún quedan por describirse.

Entonces, considerando que 1) E1 y E2 de VPH18 inducen elevación de los niveles de ROS, 2) las ROS generadas en la mitocondria son capaces de difundir y 3) en otros modelos se ha demostrado que la reducción de los niveles de la SOD2 causa daño a DNA⁸¹, decidimos explorar si las proteínas virales son capaces de producir daño a DNA.

Para evaluar el daño a DNA empleamos como marcador la variante de histona γ H2AX, cuyo estado de fosforilación está asociado al DNA dañado. Como respuesta a rupturas de la doble cadena de DNA (DSB), ATM y/o DNA-PK fosforilan la histona H2AX en la serina 139 para formar γ H2AX, evento crítico inicial para la vía de reparación de DNA dañado⁸⁶. Los resultados obtenidos en el análisis de inmunofluorescencia (*figura 18*) demuestran que la expresión de E1-18 o E1+E2 incrementan los niveles de este marcador, indicando que bajo estas condiciones se induce una ruptura de la doble cadena de DNA. Esta inducción de daño a DNA por proteínas virales, se reportó previamente por Reinson y colaboradores⁷⁴, que mediante un ensayo cometa encontraron daño a DNA cuando se expresaba E1-16 o E1+E2 de VPH16, efecto que no se repitió con E1 de VPH11, estos son resultados semejantes a los obtenidos en el presente estudio con E1 y E2 de VPH18. El daño a DNA inducido por estrés oxidante promovido por estas proteínas virales nunca antes se ha reportado. Por lo que, en este trabajo mostramos un nuevo escenario en el que proteínas del VPH18 que no tienen la capacidad oncogénica *per se*, pueden cooperar con el proceso carcinogénico a través de otros mecanismos mediados por el daño oxidante.

Respecto a las diferencias observadas entre el efecto inducido por las proteínas de VPH18 y el efecto causado por E1 de VPH11 puede deberse a que: 1) el contexto que genera la expresión de todas las proteínas de los virus de alto riesgo induce como respuesta las propiedades transformantes de E6 y E7, a la par de una evolución de E1 y E2 tal que las hace diferentes con su contraparte, un contexto de virus de bajo riesgo oncogénico, hipótesis que es apoyada por Demeret y colaboradores³¹ o a que 2) La estructura secundaria difiere entre E2 de VPH de bajo y alto riesgo³⁰, y este evento podría ampliarse para explicar diferencias entre E1 de virus de bajo y alto riesgo.

Así, en un ambiente en el que las proteínas E1 y E2 de VPH18 disminuyen los niveles de SOD2 y a la par incrementan los niveles de ROS y el daño a DNA, podría implicar el hecho de que la mayoría de los tumores positivos a VPH18 y más de la mitad de los positivos a VPH16 contienen el genoma de VPH integrado, contribuyendo a la progresión tumoral propuesta³⁸.

De este modo la capacidad de las proteínas E1 y E2 de VPH18 de inducir estrés oxidante y su patrón de expresión, que hace que estén presentes desde etapas tempranas y durante la mayor parte del ciclo viral²⁹, podría influir inicialmente en la persistencia de la infección (al generar un mayor título viral favorecida por la formación de enlaces disulfuro en la cápside), y más tarde en la integración del genoma viral (al inducir daño a DNA) o en la adquisición de las características oncogénicas (al modificar procesos mitocondriales como el metabolismo aerobio y dañar biomoléculas esenciales y vías de señalización). Por lo tanto, además de evaluar el daño al DNA en presencia de las proteínas virales, es importante buscar otros efectos celulares, derivados de la disminución de SOD2 e incremento de ROS celulares.

9. CONCLUSIONES

9.1. Conclusiones particulares

Las proteínas E1 y E2 de VPH18, así como E1-11 se expresan eficientemente en células HEK-293 y en U-2OS transfectadas.

La expresión individual o conjunta de E1 y E2 de VPH18 induce una disminución de los niveles de la superóxido dismutasa. Mientras que los niveles de catalasa y glutatión peroxidasa no varían con la expresión de estas proteínas.

La expresión individual o conjunta de E1 y E2 de VPH18 induce un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno.

Se presenta ruptura de la doble cadena de DNA en aquellas células que expresan individualmente E1-18 o conjuntamente E1 y E2 de VPH18.

9.2. Conclusión general

Con estos resultados se concluye que las proteínas E1 y E2 de VPH18 promueven la disminución de superóxido dismutasa 2 en un modelo de líneas celulares, lo que se asocia con un incremento de las especies reactivas de oxígeno. Estos eventos pueden participar en la inducción de daño a DNA observado por el incremento en los niveles de γ -H2AX. De esta manera, las proteínas E1 y E2 podrían promover entre otras cosas, la integración del genoma viral al genoma celular.

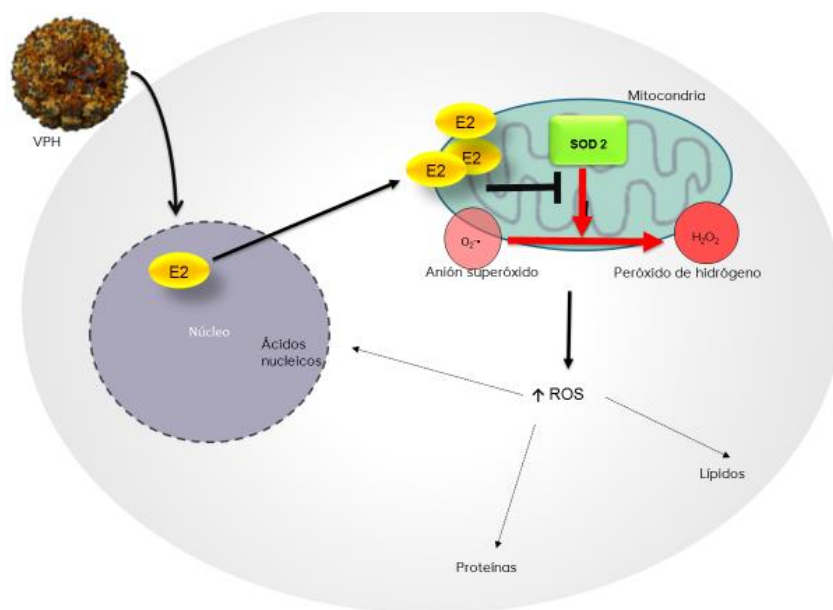


Figura 19. Esquema final. La proteína E2 del Virus del Papiloma Humano se localiza en el núcleo y posteriormente en la mitocondria donde altera los niveles enzimáticos de SOD2 induciendo un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno que a su vez generan daño celular.

10. Perspectivas

Como principal perspectiva de este proyecto es determinar si el daño a DNA observado en este trabajo, se debe directamente a las especies reactivas de oxígeno incrementadas por E1 y E2 de VPH18. Nos encontramos analizando este aspecto, mediante el uso de un antioxidante como la *N*-acetilcisteína (NAC). De este modo si en las células protegidas con NAC el daño a DNA se ve abatido, podríamos demostrar que efectivamente la ruptura de la doble cadena está favorecida por las proteínas de expresión temprana y mediada por estrés oxidante.

Por otro lado, como es conocido, el estrés oxidante puede dañar muchos elementos de la célula; por este motivo proponemos determinar otros posibles efectos del incremento de los niveles de ROS dado por las proteínas de expresión temprana de VPH, como niveles de proteínas carboniladas, lipoperoxidación, y la relación de GSH/GSSG.

Hasta este punto hemos evaluado la posibilidad de que las ROS sean la fuente del daño observado, sin embargo se debe considerar que el daño a DNA pueda incrementar los niveles de ROS como un importante mecanismo de regulación de muerte y supervivencia celular⁸⁶.

11. Referencias bibliográficas

1. World Health Organization, I. H. I. C. Human Papillomavirus and Related Diseases Report WORLD. *HPV Information Centre* 60 (2015).
2. Ferlay J, Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., and M. W. W. I. C. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. *Globocan 2012 v1.0* (2012). Available at: <http://globocan.iarc.fr>. (Accessed: 3rd May 2012)
3. World Health Organization, I. H. I. C. *Papillomavirus, Human Cancers, Related Feb, Fact Sheet Mexico 2016*. (2016).
4. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B, Valencia S, Brotons M, Mena M, C. & R, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S, C. X. *Human Papillomavirus and Related Diseases in Mexico. HPV Information Centre* (2015).
5. Schiff, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C. & Wacholder, S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* **370**, 890–907 (2007).
6. Baseman, J. G. & Koutsky, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology* **32**, 16–24 (2005).
7. Shulzhenko, N., Lyng, H., Sanson, G. F. & Morgun, A. Ménage à trois: An evolutionary interplay between human papillomavirus, a tumor, and a woman. *Trends in Microbiology* **22**, 345–353 (2014).
8. Alliance for Cervical Cancer Prevention. *The Case for Investing in Cervical Cancer Prevention. Cervical Cancer Prevention Issues in Depth No. 3.*, (2004).
9. zur Hausen, H. Papillomavirus Infections: A Major Cause of Human Cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* **1288**, F55–F78 (1996).
10. zur Hausen, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* **384**, 260–265 (2009).
11. Burk, R. D., Chen, Z. & Van Doorslaer, K. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public health genomics* **12**, 281–90 (2009).
12. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer* **100**, 1–441 (2012).
13. Psyrris, A. & DiMaio, D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nature clinical practice. Oncology* **5**, 24–31 (2008).
14. Chen, Z., Su, Y., Zhang, H., Gu, P. & Gao, L. The role of the globular heads of the C1q receptor in HPV-16 E2-induced human cervical squamous carcinoma cell apoptosis via a mitochondria-dependent pathway. *Journal of translational medicine* **12**, 286 (2014).
15. zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews. Cancer* **2**, 342–50 (2002).
16. Woodman, C. B. J., Collins, S. I. & Young, L. S. The natural history of cervical HPV infection:

- unresolved issues. *Nature Reviews Cancer* **7**, 11–22 (2007).
17. Narisawa-Saito, M. & Kiyono, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer science* **98**, 1505–1511 (2007).
 18. IARC. *IARC Handbooks of Cancer Prevention Cervix Cancer Screening. IARC Handbooks of Cancer Prevention* (2005). doi:10.1016/j.ejca.2009.07.021
 19. Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B. & Gissmann, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* **24**, 1–10 (2006).
 20. Bzhalava, D., Guan, P., Franceschi, S., Dillner, J. & Clifford, G. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* **445**, 224–231 (2013).
 21. Doorbar, J. *et al.* The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* **30**, F55-70 (2012).
 22. Ivan Konstantinov *et al.* The Human PApillomavirus. *Visual Science Projects HPV* (2013). doi:10.1172/JCI57149
 23. McLaughlin-Drubin, M. E., Meyers, J. & Munger, K. Cancer associated human papillomaviruses. *Curr Opin Virol* **2**, 459–66 (2012).
 24. Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A. & Sakai, H. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Frontiers in microbiology* **3**, 152: 1-12 (2012).
 25. Stenlund, A. Initiation of DNA replication: lessons from viral initiator proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 777–85 (2003).
 26. Auster, a S. & Joshua-Tor, L. The DNA-binding domain of human papillomavirus type 18 E1. Crystal structure, dimerization, and DNA binding. *The Journal of biological chemistry* **279**, 3733–3742 (2004).
 27. Wilson, V. G., West, M., Woytek, K. & Rangasamy, D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus genes* **24**, 275–290 (2002).
 28. Bergvall, M., Melendy, T. & Archambault, J. The E1 proteins. *Virology* **445**, 35–56 (2013).
 29. Archambault, J. & Melendy, T. Targeting human papillomavirus genome replication for antiviral drug discovery. *Antiviral therapy* **18**, 271–83 (2013).
 30. McBride, A. a. The Papillomavirus E2 proteins. *Virology* **445**, 57–79 (2013).
 31. Muller, M. & Demeret, C. The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network. *The open virology journal* **6**, 173–189 (2012).
 32. Demeret, C., Desaintes, C., Yaniv, M. & Thierry, F. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *Journal of virology* **71**, 9343–9 (1997).
 33. Kurg, R. in *DNA Replication-Current Advances* (ed. Seligmann, H.) 694 (In Tech, 2011).
 34. King, L. E., Dornan, E. S., Donaldson, M. M. & Morgan, I. M. Human papillomavirus 16 E2 stability and transcriptional activation is enhanced by E1 via a direct protein-protein interaction. *Virology* **414**, 26–33 (2011).
 35. Desaintes, C., Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M. & Thierry, F. Expression of the papillomavirus E2

- protein in HeLa cells leads to apoptosis. *The EMBO journal* **16**, 504–514 (1997).
36. Johansson, C. & Schwartz, S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nature reviews. Microbiology* **11**, 239–51 (2013).
 37. Doorbar, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* **445**, 80–98 (2013).
 38. Moody, C. a & Laimins, L. a. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews. Cancer* **10**, 550–560 (2010).
 39. Mosciki, A.-B. *et al.* Updating the Natural History of Human Papillomavirus and Anogenital caners. *Vaccine* **30**, F24–F33 (2012).
 40. Castellsagué, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology* **110**, 4–7 (2008).
 41. Williams, V. M., Filippova, M., Soto, U. & Duerksen-Hughes, P. J. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future virology* **6**, 45–57 (2011).
 42. Cullen, A. P., Reid, R., Campion, M. & Lorinczl, A. T. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in Intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *Journal of virology* **65**, 606–612 (1991).
 43. Wentzensen, N., Vinokurova, S. & Doeberitz, M. V. K. Systematic Review of Genomic Integration Sites of Human Papillomavirus Genomes in Epithelial Dysplasia and Invasive Cancer of the Female Lower Genital Tract Systematic Review of Genomic Integration Sites of Human Papillomavirus Genomes in Epithelial Dyspl. *Cancer research* **64**, 3878–3884 (2004).
 44. Parish, J. L. *et al.* E2 proteins from high- and low-risk human papillomavirus types differ in their ability to bind p53 and induce apoptotic cell death. *Journal of virology* **80**, 4580–90 (2006).
 45. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **160**, 1–40 (2006).
 46. Holmström, K. M. & Finkel, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 411–421 (2014).
 47. Paracha, U. Z., Fatima, K., Alqahtani, M., Chaudhary, A. & Abuzenadah, A. Oxidative stress and hepatitis C virus. 1–9 (2013).
 48. Castle, P. E. & Giuliano, A. R. Chapter 4 : Genital Tract Infections , Cervical Inflammation , and Antioxidant Nutrients — Assessing Their Roles as Human Papillomavirus Cofactors. *Journal of the National Cancer Institute* **7234**, 29–34 (2003).
 49. Apel, K. & Hirt, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373–399 (2004).
 50. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**, 44–84 (2007).
 51. Mena, S., Ortega, A. & Estrela, J. M. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **674**, 36–44 (2009).

52. Irshad, M. & Chaudhuri, P. S. Oxidant-antioxidant system: Role and significance in human body. *Indian Journal of Experimental Biology* **40**, 1233–1239 (2002).
53. Cadenas, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors* **6**, 391–397 (1997).
54. Burton, G. J. & Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **25**, 287–299 (2011).
55. Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E. & Offen, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* **40**, 959–975 (2001).
56. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J. & Telser, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* **266**, 37–56 (2004).
57. Buettner, G. R. & Schafer, F. Q. Free radicals, oxidants, and antioxidants. *Teratology* **62**, 234 (2000).
58. Cadenas, E. & Davies, K. J. a. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. This article is dedicated to the memory of our dear friend, colleague, and mentor Lars Ernster (1920–1998), in gratitude for all he gave to us. *Free Radical Biology and Medicine* **29**, 222–230 (2000).
59. Schwarz, K. B. Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic Biol Med* **21**, 641–649 (1996).
60. Nathan, C. & Cunningham-Bussel, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews Immunology* **13**, 349–361 (2013).
61. Droge, W. & Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* **82**, 47–95 (2002).
62. De Marco, F. *et al.* Oxidative stress in HPV-driven viral carcinogenesis: redox proteomics analysis of HPV-16 dysplastic and neoplastic tissues. *PloS one* **7**, e34366 (2012).
63. Ohnishi, S. *et al.* DNA Damage in Inflammation-Related Carcinogenesis and Cancer Stem Cells. **2013**, (2013).
64. Fiaschi, T. & Chiarugi, P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: A diabolic liaison. *International Journal of Cell Biology* **2012**, (2012).
65. Jiang, B., Xiao, S., Khan, M. A. & Xue, M. Defective antioxidant systems in cervical cancer. *Tumor Biology* **34**, 2003–2009 (2013).
66. Bhuvaramurthy, V., Balasubramanian, N. & Govindasamy, S. Effect of radiotherapy and chemoradiotherapy on circulating antioxidant system of human uterine cervical carcinoma. *Molecular and cellular biochemistry* **158**, 17–23 (1996).
67. Manoharan S., Kolanjiappan K., K. M. Enhanced lipid peroxidation and impaired enzymic antioxidant activities in erythrocytes of patients with Cervical Carcinoma. *Cellular & Molecular Biology Letters* **9**, 699–707 (2004).
68. Naidu, M. S. K., Suryakar, a N., Swami, S. C., Katkam, R. V & Kumbar, K. M. Oxidative stress and antioxidant status in cervical cancer patients. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* **22**, 140–

- 4 (2007).
69. Conway, M. J. *et al.* Tissue-spanning redox gradient-dependent assembly of native human papillomavirus type 16 virions. *J Virol* **83**, 10515–10526 (2009).
 70. Buck, C. B., Thompson, C. D., Pang, Y.-Y. S., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. Maturation of papillomavirus capsids. *Journal of virology* **79**, 2839–46 (2005).
 71. Williams, V. M., Filippova, M., Filippov, V., Payne, K. J. & Duerksen-Hughes, P. Human papillomavirus type 16 E6* induces oxidative stress and DNA damage. *Journal of virology* **88**, 6751–61 (2014).
 72. Marullo, R. *et al.* HPV16 E6 and E7 proteins induce a chronic oxidative stress response via NOX2 that causes genomic instability and increased susceptibility to DNA damage in head and neck cancer cells. *Carcinogenesis* **36**, bgv126 (2015).
 73. Wongworawat, Y. C., Filippova, M., Williams, V. M., Filippov, V. & Duerksen-hughes, P. J. Chronic oxidative stress increases the integration frequency of foreign DNA and human papillomavirus 16 in human keratinocytes. *American Journal of Cancer Research* **6**, 764–780 (2016).
 74. Reinson, T. *et al.* Engagement of the ATR-dependent DNA damage response at the human papillomavirus 18 replication centers during the initial amplification. *Journal of virology* **87**, 951–64 (2013).
 75. Lai, D. *et al.* Localization of HPV-18 E2 at mitochondrial membranes induces ROS release and modulates host cell metabolism. *PloS one* **8**, e75625 (2013).
 76. Kadaja, M. *et al.* Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *The EMBO journal* **26**, 2180–2191 (2007).
 77. De Marco, F. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. *Viruses* **5**, 708–731 (2013).
 78. Isok-Paas, H., Männik, A., Ustav, E. & Ustav, M. The transcription map of HPV11 in U2OS cells adequately reflects the initial and stable replication phases of the viral genome. *Virology journal* **12**, 59 (2015).
 79. Thomas, P. & Smart, T. G. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **51**, 187–200 (2005).
 80. Matés, J. M., Pérez-Gómez, C. & Núñez de Castro, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry* **32**, 595–603 (1999).
 81. Holley, A. K., Dhar, S. K. & St Clair, D. K. Manganese superoxide dismutase vs. p53: regulation of mitochondrial ROS. *Mitochondrion* **10**, 649–61 (2010).
 82. Brand, M. D. *et al.* Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine* **37**, 755–767 (2004).
 83. Fridovich, I. Superoxide Radical and Superoxide dismutases. *Annual JReviews of Biochemistry* **64**, 97–112 (1995).
 84. Fridovich, I. Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **247**, 1–11 (1986).
 85. Che, M., Wang, R., Li, X., Wang, H. Y. & Zheng, X. F. S. Expanding roles of superoxide

- dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discovery Today* **21**, 143–149 (2016).
86. Kang, M. a, So, E.-Y., Simons, a L., Spitz, D. R. & Ouchi, T. DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway. *Cell Death and Disease* **3**, e249 (2012).
 87. Webster, K. *et al.* The Human Papillomavirus (HPV) 16 E2 Protein Induces Apoptosis in the Absence of Other HPV Proteins and via a p53-dependent Pathway. **275**, 87–94 (2000).
 88. Trachootham, D., Alexandre, J. & Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews. Drug discovery* **8**, 579–591 (2009).

12. Anexos

Anexo 1: Soluciones y medios de cultivo

1.1 Medio LB

Bacto-Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	aforar a 1 L

1.2 Amortiguador CaCl₂-Tris pH 7.5

CaCl ₂	100 mM
Tris	10 mM pH 7.5

1.3 Agar LB con ampicilina

Bacto-Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar bacteriológico	1.5% p/v
Ampicilina	100 µg/mL
H ₂ O destilada	aforar a 1 L

1.4 Eagle de Dulbecco modificado (DMEM) enriquecido con suero bovino fetal

DMEM-F12(Gibco)	1 sobre
NaHCO ₃	1.2 g/L
Suero bovino fetal (Gibco)	10% v/v

1.5 Tris-EDTA

Tris-HCl	10 mM pH 7.9
EDTA	1 mM

1.6 HBS 2X

Hepes	50 mM
NaCl	0.28 M
NaHPO ₄ .12 H ₂ O	1.5 mM, pH 7.12

1.7 Solución de trabajo de ácido bicinconínico y sulfato de cobre

Solución de ácido bicinconínico(Sigma) 100 partes

Solución de sulfato de cobre (II) 2 partes

1.8 Amortiguador de carga 2x

Tris-HCl 1 M pH 6.8

Dodecilsulfato de sodio SDS 10% p/v

Azul de bromofenol 20 mg

Glicerol 2 mL

Ditiotreitol (DTT) 308 mg

H₂O destilada aforar a 10 mL

1.9 Geles de acrilamida al 12%

	Gel concentrador	Gel separador
Acrilamida 30%/ N,N'-biscarilamida	400 µL	4 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 6.8	320 µL	----
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	----	2.8 mL
SDS 10% p/v	25 µL	100 µL
Persulfato de amonio 10%	25 µL	66 µL
N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)	2 µL	6 µL

1.10 Amortiguador de corrida 1x

Tris base 3.03 g

Glicina 14.42 g

SDS 1.0 g

H₂O destilada aforar a 1L

1.11 Amortiguador de transferencia

Tris-base	3.03 g
Glicina	14.42 g
SDS	1.0 g
Metanol	25%
H ₂ O destilada	aforar a 1 L

1.12 TBS- T 1x

Tris base	2.42 g
NaCl	8.0 g
Tween-20	1.0%