



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría en Ciencias Bioquímicas

TERATOMAS PARA ESTUDIAR EL CRECIMIENTO TUMORAL INDUCIDO POR  
LOS ONCOGENES E6 Y E7 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

DAVID ALEJANDRO RIVERA MIRANDA

**TUTOR**

DRA. CELINA GARCÍA MELÉNDREZ  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA DE LOURDES GUTIÉRREZ XICONTÉNCATL  
[Instituto Nacional de Salud Pública](#)

DR. MARIO ENRIQUE ZURITA ORTEGA  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Marzo, 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles perteneciente al departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Celina García Meléndrez.

La realización de este proyecto fue posible gracias al financiamiento recibido por parte del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (proyecto: 87182, Células troncales embrionicas para estudiar el crecimiento tumoral en tiempo real) y de la Dirección General del Personal Académico, UNAM (proyectos: IN207221, Uso de la bioluminiscencia para estudiar el crecimiento tumoral en teratomas; IN224724, Efecto de la proteína E7 del virus de papiloma humano tipo 16 y de la deficiencia del receptor B para el ácido retinóico (rarB) sobre el inmunofenotipo de células troncales del cuello uterino).

El alumno David Alejandro Rivera Miranda (CVU: 1008809) contó con la beca para estudios de posgrado #762720 otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías.

### **Agradecimientos académicos.**

A la Dra. Celina García Meléndrez por permitirme ser su alumno y guiarme en la realización de los experimentos, las discusiones y las correcciones de este escrito.

Al Dr. Mario Enrique Zurita Ortega y a la Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl por ser parte de mi comité tutor que me asesoró durante la realización del proyecto.

Al Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles por sus comentarios, críticas y sugerencias a lo largo del proyecto.

Al Dr. Heriberto Abraham Valencia González y al Dr. Alejandro Manuel García Carrancá por su apoyo en la formación de teratomas en el Instituto Nacional de Cancerología.

A la MVZ. Graciela Cabeza, al Sr. Sergio González, al Sr. Oswaldo López y a la MVZ. Elizabeth Mata de la Unidad de Bioterio por su apoyo en el mantenimiento de las instalaciones durante la pandemia. Gracias por su servicio durante esa época tan difícil para todos.

Al M. en C. Jorge Arturo Yáñez Ponce de León, al M. en C. Eugenio López Bustos, al Q. I. Santiago Becerra Ramírez y al Dr. Rubén Paul Gaytán Colín de la Unidad de Síntesis y Secuenciación por la síntesis y secuenciación de DNA.



## **PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

**(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

“Teratomas para estudiar el crecimiento tumoral inducido por los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano”

que presenté para obtener el grado de ---Maestría ----- es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

**Atentamente**

**David Alejandro Rivera Miranda. No. de cuenta: 312347004**

## Contenido

Resumen.....	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Virus del Papiloma Humano.....	8
Cáncer cervical.....	13
Células troncales embriónicas, cuerpos embrioides y teratomas.....	17
Sistemas controlados por tetraciclina en el estudio de cáncer.....	21
Antecedentes.....	24
Justificación.....	26
Hipótesis.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos particulares.....	27
Materiales y métodos.....	28
Resultados.....	38
El represor transcripcional tTS disminuye la expresión fuga de E6/E7.....	38
Las clonas de células troncales embriónicas que expresan E6 y E7 tienen mayor capacidad proliferativa.....	41
Los cuerpos embrioides que expresan E6 y E7 tienen un mayor tamaño y no presentan alteraciones en la expresión de genes de diferenciación.....	45
Formación de teratomas a partir de células troncales embriónicas A1-Venus y C1-Venus.....	50
Discusión.....	53
La disminución de la expresión fuga de E6 y E7 por el represor transcripcional tTS es dependiente del tipo celular.....	53
La expresión de los oncogenes E6 y E7 indujo la proliferación en células troncales embriónicas y cuerpos embrioides.....	57
Los teratomas para estudiar los efectos de E6 y E7 en tejidos diferenciados.....	62
Conclusiones.....	65
Perspectivas.....	65
Referencias.....	67
Apéndice.....	74

## Resumen

El virus del papiloma humano es el principal agente etiológico asociado al cáncer cervical. Los efectos oncogénicos del VPH son producidos por sus oncoproteínas viral E6 y E7, las cuales inducen la degradación de los principales supresores tumorales p53 y pRb, respectivamente. En tumores cervicales de mujeres, las oncoproteínas se encuentran altamente expresadas. En ratones transgénicos que expresan E6 y E7 en las capas del epitelio cervical, los oncogenes inducen la proliferación de las capas del epitelio y finalmente cáncer. Se ha propuesto que la vía de señalización Sonic Hedgehog interactúa con los oncogenes para promover la carcinogénesis cervical. Si se desea continuar con el modelo de ratones transgénicos se necesitaría crear dobles o triples animales transgénicos, lo cual aumenta el precio y tiempo de estudio. Debido a lo anterior, es necesario desarrollar nuevos modelos que nos permitan entender el mecanismo de interacción entre esta vía, y otras vías propuestas, con los oncogenes virales E6 y E7 y cómo promueven la carcinogénesis en un tiempo relativamente corto. En el presente trabajo proponemos a los derivados diferenciados de las células troncales embrionarias (ESC), los cuerpos embrioides y teratomas, como modelos para estudiar el efecto oncogénico de E6 y E7. Se crearon diferentes líneas transgénicas de ESC que expresan E6 y E7 y observamos que tuvieron una mayor proliferación posiblemente porque los oncogenes alteraron el ciclo celular. Los cuerpos embrioides transgénicos para E6/E7 alcanzaron mayor tamaño sin alterar su diferenciación. Es posible especular que el aumento en el tamaño se debió a la mayor capacidad proliferativa de las ESC. Los teratomas derivados a partir de las ESC se diferenciaron a tejidos de las tres capas embrionarias y expresaron las oncoproteínas. Además, el crecimiento de los tumores se puede seguir *in vivo* mediante bioluminiscencia. Debido a la sencilla manipulación genética de las ESC y a la generación de los cuerpos embrioides y teratomas a partir de ESC transgénicas, se podría estudiar la interacción entre los componentes de la vía de Sonic Hedgehog y E6/E7.

**Abstract.**

The human papillomavirus is the principal etiological agent associated with cervical cancer. The E6 and E7 viral proteins are the oncogenic effectors of HPV, targeting the degradation of the tumor suppressors p53 and pRb, respectively. The oncoproteins are highly expressed in cancer tissues. In transgenic animals expressing E6 and E7 in the cervical epithelium, the oncogenes promote the proliferation of the epithelial layers and finally produces cancer. It has been postulated that the Sonic Hedgehog signaling pathway interacts with the oncogenes to promote cervical carcinogenesis. The experimental strategy using transgenic mice implies the development of new animals with various genetic modifications. In the end, this produces major costs and time for studying. Because of this, it is necessary to develop new models focused on understanding the mechanisms by which the signaling pathway and the viral oncogenes work together to promote carcinogenesis in a relatively short time. In this study, we propose embryonic stem cells (ESCs) and their differentiation derivatives, the embryoid bodies, and teratomas, as a new model to study the oncogenic effects of E6/E7. Transgenic ESC lines expressing E6 and E7 were created, and it was observed that they had higher proliferation, possibly due to the oncogenes shortening the cell cycle. The embryoid bodies with E6/E7 overexpression had a larger volume than the control group and developed no abnormalities in the differentiation process. One can speculate that the bigger volume in embryoid bodies was due to the induction of proliferation in ESC. The E6/E7 expressing ESCs-derived teratomas were developed normally with tissues corresponding to germinal layers, and they expressed the oncogenes. Finally, the growth of the tumors can be tracked *in vivo* because of the bioluminescence activity of the ESC. Due to the easy genetic manipulation of the ESC and the generation of the embryoid bodies and teratomas from transgenic ESC, it can study the interaction between Sonic Hedgehog pathway and the oncogenes E6 and E7.

## Introducción.

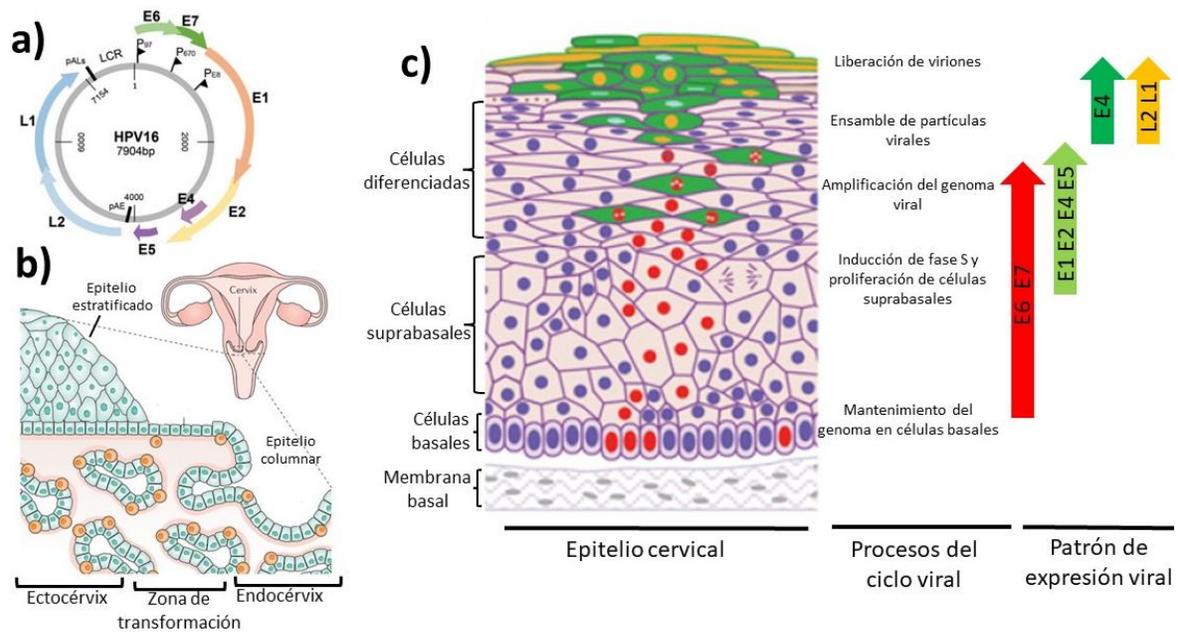
### *Virus del Papiloma Humano.*

Los papilomavirus son virus no envueltos de DNA circular que infectan epitelios de vertebrados. Estos virus se clasifican en cinco genotipos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ ) con base en la secuencia de su proteína de cápside L1. En el genotipo  $\alpha$  se clasifican la mayoría de los virus que infectan las mucosas del tracto anogenital en humanos, mientras que en el genotipo  $\beta$  se clasifican los virus que infectan principalmente epitelios cutáneos (Doorbar *et al.*, 2016). Los virus del papiloma humano (VPH) se clasifican como bajo y alto riesgo dependiendo de su asociación con el cáncer; los virus que se asocian con el cáncer son los de alto riesgo. Los tipos de alto riesgo 16 (VPH16) y el 18 (VPH18) se asocian con el 55% y 15% de cáncer cervical, respectivamente (Graham, 2017). La descripción de sus características, ciclo viral y su papel como carcinógenos cervicales se basará en los tipos carcinogénicos de alto riesgo, principalmente el VPH16 debido a su importancia médica.

Los VPH tienen un genoma de DNA de 8 kb que se divide en tres grandes regiones: la región temprana (E), la región tardía (L) y la región larga de control (LCR, por sus siglas *long control region*) (Graham, 2017; Scarth *et al.*, 2021). En la región 5' de la LCR se localiza la señal de terminación de la transcripción de los elementos de la región tardía (L1 y L2). En la región 3' se localiza el origen de replicación y el promotor E6. El origen de replicación consiste en sitios de unión E1 y E2. El promotor E6 está constituido por una caja TATA seguido del sitio de inicio de transcripción dependiente de la RNA polimerasa II (denominado P97 en VPH16) y controla la expresión de los genes de la región temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7). Además, cascada arriba se localizan elementos *cis* que controlan la actividad del promotor. Cabe señalar que estos elementos reguladores confieren la especificidad epitelial, es decir, acoplan la expresión génica de manera temporal, espacial y cuantitativa al programa de diferenciación de las células infectadas (Bernad *et al.*, 2013). Para entender mejor las funciones de las proteínas virales de la región temprana y tardía se debe analizar su patrón de expresión en el epitelio cervical durante el ciclo viral.

El cérvix forma parte del aparato reproductor femenino y se divide en dos regiones: 1) el exocérnix es la parte superior del canal vagina y está constituido por un epitelio

estratificado en cuya base se localizan células basales que proliferan, se diferencian y migran hacia las capas suprabasales para mantener su estructura y función (Fig. 1); 2) el endocérnix es la parte inferior del canal uterino y está constituido por un epitelio columnar glandular. La zona de convergencia entre estos epitelios se reconoce como zona de transformación (Schiffman *et al.*, 2016; White, 2019).



**Fig. 1 | Modelo del ciclo viral del VPH en el epitelio cervical.** a) Mapa del genoma del VPH16. b) El cérvix une la parte superior del canal vaginal y la parte inferior del canal uterino. Esta región se divide en endocérnix, constituido por un epitelio columnar, y el exocérnix, constituido por un epitelio estratificado en cuya base se localizan células que se diferencian en queratinocitos maduros y migran hacia las capas suprabasales. Se sugiere que el VPH entra a través de microlesiones en epitelio e infecta las células basales. c) Una vez que las células empiezan su programa de diferenciación epitelial, se induce el programa de expresión viral. Las proteínas del virus inducen alteraciones en las células suprabasales para permitir su replicación, ensamble y propagación (Modificado del Doorbar, 2006; Schiffman *et al.*, 2016).

Debido a que los tejidos cervicales positivos al VPH se encuentran en diferentes etapas de infección en el momento de su diagnóstico, ha sido difícil estudiar el ciclo viral de los papilomavirus humanos, por lo que su estudio se ha producido en modelos *in vitro* que tratan de recapitular la arquitectura del tejido cervical, en modelos animales infectados con papilomavirus que infectan dichas especies (ej. conejos, ratones) y que difieren de los virus que infectan humanos y en modelos animales transgénicos que expresan todo o solo alguna parte del genoma viral. Es necesario mencionar lo anterior para describir el modelo del ciclo viral (Fig. 1).

El modelo más aceptado para explicar que el virus del papiloma humano se establezca es que debe infectar las células basales del epitelio cervical. Se ha propuesto que el VPH ingresa a través de micro abrasiones del epitelio estratificado en las células basales epiteliales. También se postula que pueden infectar directamente a las células troncales de la unión entre el endocérvix y el exocérvix (Graham, 2017; Scarth *et al.*, 2021). A nivel molecular, la proteína mayor de cápside L1 se ancla a receptores proteoglicanos de heparina sulfato localizados en la membrana basal y en la superficie celular. Una vez anclado, la isomerasa ciclofilina B causa un cambio de conformación que expone la proteína L2 en la superficie de la cápside para que pueda ser segmentada por las enzimas furina o PC 5/6. Esto permite la unión a receptores secundarios de membrana (ej. receptores del factor de crecimiento epidermal, integrinas, lamininas, vimentina) que activan vías de señalización para inducir la entrada a la célula por un mecanismo similar a la micropinocitosis (Raaf *et al.*, 2013; Scarth *et al.*, 2021). En el endosoma se desensambla la cápside y el genoma forma un complejo con las proteínas L1 y L2 para transportarse a través del tráfico intravesicular hasta llegar al núcleo donde permanece como un episoma estable (Sapp *et al.*, 2009; Scarth *et al.*, 2021).

Una vez en las células basales, el virus se amplifica transitoriamente en bajas cantidades (Doorbar *et al.*, 2016). Para ello es necesario la expresión de las proteínas E1 y E2 en bajo número que promueven la replicación viral. La proteína E1 es la única enzima que codifica el genoma de los papilomavirus (Bergvall *et al.*, 2013). La proteína E2 es la principal reguladora de la transcripción y replicación viral (McBirde, 2013). Como se ha señalado, el origen de replicación localizado en el LCR contiene sitios de unión a E1 y E2 (Bernad *et al.*, 2013). La proteína E2, al unirse a sus sitios, promueve el ensamble de la helicasa E1 en conformación de hexámeros dobles sobre el origen de replicación. Por un mecanismo que involucra hidrólisis de ATP del dominio de helicasa E1, la proteína E2 es desplazada y el complejo E1 inicia la desnaturalización de DNA y el reclutamiento de factores de replicación (ej. DNA polimerasa  $\alpha$  primasa, topoisomerasa I) para iniciar la replicación viral (Bergvall *et al.*, 2013). Cabe señalar que las células basales, al ser capaces

de dividirse, son susceptibles a la replicación viral que depende de la actividad mitótica de estas células (Doorbar, 2006).

Las células basales pueden dirigirse hacia dos destinos celulares: mantener su identidad como célula basal, o empezar el programa de diferenciación epitelial para convertirse en queratinocito (Fig. 1; White, 2019). El ciclo viral de los papilomavirus depende de la diferenciación del epitelio cervical por lo que el programa de expresión viral se acopla temporal y espacialmente a la diferenciación (Doorbar *et al*, 2016). El mecanismo que controla el acoplamiento de la expresión viral y la diferenciación epitelial involucra el control de elementos regulatorios en la LCR y elementos localizados a lo largo de la región temprana E (ej. sitios de splicing alternativo, sitios regulatorios en la región no traducida de los transcritos, sitios de poliadenilación; Schwartz, 2012).

La diferenciación terminal se caracteriza por la salida permanente del ciclo celular, la migración a las capas suprabasales del epitelio y la adquisición de un fenotipo completamente diferenciado (Moody, 2017). La salida del ciclo celular involucra el establecimiento de una fase del ciclo celular denominada G0 que es iniciada y mantenida por la alta expresión de inhibidores de cinasas dependientes de ciclina (CDKi, del *inglés cyclin dependent kinases inhibitors*), la disminución de ciclinas de G1 y la presencia de la familia de proteínas de retinoblastoma (Padgett & Santos, 2020). Brevemente, la familia de proteínas de retinoblastoma (pRb, p107, p130) reprime la actividad de la familia de factores transcripcionales E2F, los cuales son requeridos para la progresión del ciclo celular en la fase G1-S porque activan transcripcionalmente los genes que codifican para proteínas de replicación y reguladores del ciclo celular. Los reguladores cascada arriba de Rb son cinasas dependientes de ciclina (CDK2, CDK4, CDK6). Las cinasas CDK fosforilan e inhiben la proteína Rb, reduciendo su habilidad para reprimir los factores E2F (Sharpless & Sher, 2015). Por otra parte, existen dos grupos de inhibidores de CDK: INK y CIP/KIP. Los primeros (p15, p16<sup>INK4A</sup> y p18) inhiben las CDK4/6, mientras que el segundo grupo de inhibidores CIP/KIP (p21<sup>WAF1/Cip1</sup> y p27<sup>Kip1</sup>) antagonizan la actividad de Cdk1 y Cdk2 (Padgett & Santos, 2020; Herranz & Gil, 2018).

Este cambio en el estado celular induce la expresión génica viral y la replicación del episoma viral. Sin embargo, la replicación viral necesita de la maquinaria celular de replicación que se encuentra en células mitóticamente activas (Doorbar *et al.*, 2016). Los VPH codifican dos proteínas, E6 y E7, que inducen la entrada al ciclo celular, inhiben la apoptosis y retrasan la diferenciación. A nivel molecular, E7 se une e inhibe a la proteína pRb y otros miembros de la familia de proteínas Rb. Con esto, los factores transcripcionales E2F inician la activación transcripcional de proteínas involucradas en replicación celular y la regulación del ciclo celular. Así, al inhibir a la proteína pRB se produce como consecuencia la entrada a la fase S del ciclo celular de las células suprabasales en proceso de diferenciación (Doorbar *et al.*, 2016; Graham, 2017). La oncoproteína E6 induce la degradación de p53 por el sistema ubiquitina proteasoma y evita la apoptosis en las células en diferenciación que proliferan (Doorbar *et al.*, 2016). En otras palabras, los oncogenes desacoplan la proliferación del proceso de diferenciación para permitir la replicación viral (Moody, 2017). Una vez que las células suprabasales adquieren la habilidad para proliferar son capaces de permitir la replicación viral. La helicasa E1 y la proteína reguladora E2 inducen la replicación de un alto número de episomas virales y promueven su retención y distribución en las células suprabasales (Bergvall *et al.*, 2013; McBride, 2013).

Además de regular la replicación viral, la proteína E2 es un importante regulador transcripcional que actúa dependiendo de su concentración. En bajos niveles, E2 induce la activación transcripcional del promotor temprano P97 localizado en la LCR. En altas concentraciones actúa como un represor transcripcional de P97, silenciando la expresión de los oncogenes E6 y E7. La alta expresión de E2 en las capas superiores del epitelio induce el silenciamiento de los oncogenes (Doorbar, 2013). También produce la activación de las demás proteínas de la región temprana. Por ejemplo, el gen E5 se expresa en altos niveles en las células diferenciadas de las capas más superiores (DiMaio & Petti, 2013). E5 es una proteína de membrana que se inserta en el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y la membrana plasmática. Esta proteína viral incrementa los niveles del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) sensibilizando a las células al ligando EGF, lo que promueve la síntesis de DNA y la proliferación y supervivencia celular (DiMaio & Petti, 2013). Se ha

propuesto que E5 modula o aumenta las funciones oncogénicas de E6 y E7 (Scarth *et al.*, 2021).

Con el silenciamiento transcripcional de los oncogenes E6 y E7 inducido por E2, las células infectadas continúan con el proceso de diferenciación, que involucra el arresto del ciclo celular en la fase G2, mientras que el virus continúa con su ciclo (Doorbar, 2013). En esta etapa se induce la expresión de las proteínas de la región tardía mediante la activación transcripcional del promotor tardío p670 en HPV16. La expresión de L1 y L2 requiere un cambio en el uso del promotor, cambiar la señal de poliadenilación y cambio en el uso de sitios de *splicing*, que dependen del programa de diferenciación epitelial (Schwartz, 2013). La proteína L1 se ensambla en capsómeros en el citoplasma y se importa al núcleo celular donde se une a L2 para encapsidar los episomas virales y producir viriones. El ensamble de partículas virales continúa con la degradación nuclear y la liberación de virus en las células terminalmente diferenciadas que se desprenden del epitelio cervical (Doorbar *et al.*, 2016). La proteína E4 facilita la liberación y transmisión del virus al asociarse a fibras de queratina que altera la red intracelular de queratina de las células superficiales (Doorbar, 2013).

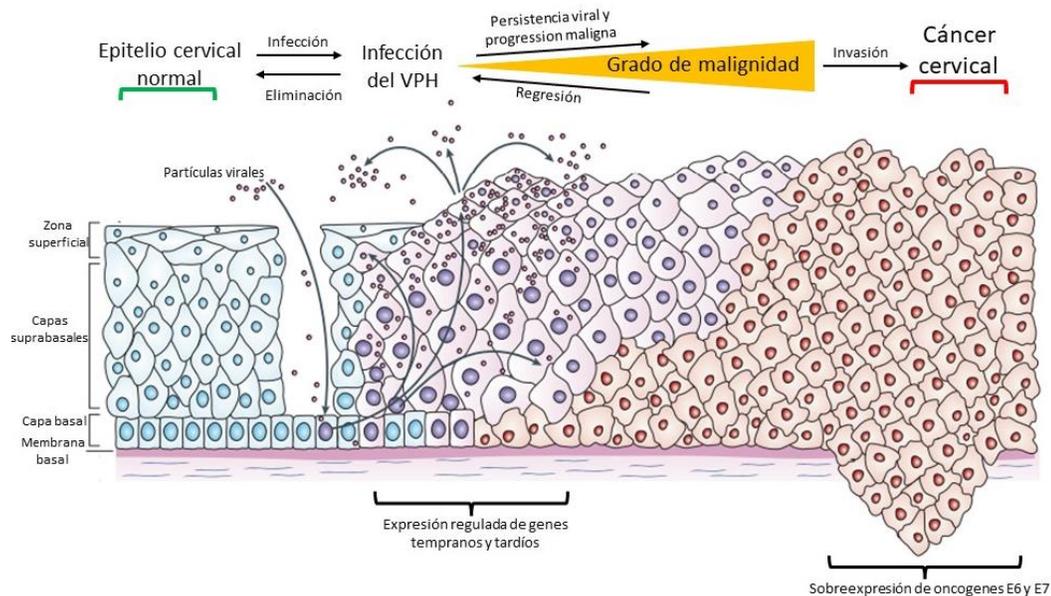
#### *Cáncer cervical.*

El principal agente etiológico asociado al cáncer cervical es el virus del papiloma humano (Schiffman *et al.*, 2016). La carcinogénesis cervical necesita la infección persistente del VPH de alto riesgo, pero no es suficiente para inducirla. La infección persistente del virus por un período de varios años junto con la asociación de alteraciones genéticas en las células infectadas y otros factores de riesgo pueden causar cáncer (Litwin *et al.*, 2017; Schiffman & Wentzensen, 2013; TGCA, 2017).

La historia natural del cáncer empieza con la infección del virus del papiloma humano (Fig.2). El virus se transmite sexualmente por lo que la incidencia en la población se produce principalmente al inicio de la vida sexual. Se estima que la mayoría de la población sexualmente activa se infecta con algún VPH del tipo de alto riesgo. En estudios epidemiológicos de mujeres jóvenes se ha observado que el 80-90% de ellas resultan negativas 2 años después del primer diagnóstico positivo al VPH (Schiffman & Wentzensen,

2013), por lo que la mayoría de las infecciones son transitorias ya que son eliminadas por el sistema inmune (Stanley, 2012).

Una infección transitoria se puede convertir en una infección persistente. Un factor que favorece la persistencia es el ciclo viral único que se distingue por no provocar viremia, inflamación o muerte celular (Stanley, 2012). Aunado a la capacidad del VPH para inhibir el reconocimiento por el sistema inmune innato y adaptativo (Stanley, 2012), el virus no es reconocido adecuadamente por el sistema inmune, lo que permite que se mantenga como una infección persistente. En mujeres que presentan una infección persistente, el virus puede inducir anomalías o lesiones en el epitelio cervical que tardan varios años, o décadas, para desarrollarse. Estas lesiones se diagnostican a la edad de 25-35 años y puede tratarse clínicamente (Schiffman *et al.*, 2016). No obstante, solo el 25%-30% de los casos positivos VPH de alto riesgo presentan lesiones cervicales (Schiffman & Wentzensen, 2013).



**Fig. 2 | Historia natural del cáncer cervical.** La infección persistente del VPH induce lesiones en el epitelio cervical que adquieren diferente grado de malignidad que se caracterizan por la proliferación de las células suprabasales en diferenciación. La expresión desregulada de los oncogenes E6 y E7 aumenta la malignidad del tejido, el cual puede progresar a cáncer (Modificado de Crosbie *et al.*, 2013).

Se han creado sistemas de nomenclatura histológica y citológica para clasificar las lesiones en el cérvix. Las clasificaciones citológicas se basan en el grado de pérdida de maduración citoplasmática, cambios en el tamaño y forma nuclear y figuras mitóticas

anormales de las células cervicales. Las clasificaciones histológicas se basan en el grado de reemplazamiento del epitelio diferenciado por epitelio indiferenciado proliferativo. Conforme persiste la infección, el grado de malignidad de las lesiones aumenta hasta tener un fenotipo premaligno. No todas las lesiones con un alto grado de malignidad progresan a cáncer, sino que solo un número reducido de ellas invaden la membrana basal del epitelio cervical, es decir, producen cáncer escamoso cervical. El período de tiempo en el que las lesiones preneoplásicas progresan en cáncer cervical, el cual se manifiesta como carcinoma celular escamoso y adenocarcinomas, abarca alrededor de 30 años (Doorbar *et al.*, 2016; Schiffman *et al.*, 2016). Es importante señalar que el desarrollo de cáncer es un evento contraproducente para el virus debido a que el tejido tumoral no es capaz de soportar el ciclo viral.

El desarrollo de cáncer cervical necesita de la infección persistente del VPH de alto riesgo, pero no es suficiente para que se produzca. Existen otros factores de riesgo que contribuyen a la progresión del cáncer, como el uso prolongado de anticonceptivos hormonales, tabaquismo, multiparidad e inflamación crónica. Para que una infección premaligna avanzada se convierta en cáncer requiere de alteraciones genéticas adicionales para completar su progresión maligna (Schiffman *et al.*, 2016).

La carcinogenicidad de los papilomavirus de alto riesgo está dada por las oncoproteínas E6 y E7. La principal función de los oncogenes al inducir la entrada al ciclo celular de las células suprabasales es permitir la amplificación del genoma viral. Una vez permitido esto, E6 y E7 son silenciadas transcripcionalmente por E2. La expresión continua de las oncoproteínas y, en consecuencia, la proliferación de células suprabasales no es compatible con el ciclo viral debido a que requiere de la diferenciación epitelial terminal para completarse. Por lo tanto, la infección persistente, al producir un aumento en las capas proliferativas suprabasales a costa de disminuir las capas diferenciadas, impide el ciclo viral. A mayor número de capas suprabasales proliferativas mayor es el grado de malignidad de las lesiones y mayor el riesgo de progresión a cáncer (Doorbar *et al.*, 2016; Graham, 2017).

Las oncoproteínas se encuentran altamente expresadas en queratinocitos suprabasales de lesiones intraepiteliales y en células indiferenciadas anormales de tumores invasivos y carcinomas *in situ* (Doobar *et al.*, 2016). La sobreexpresión de E6 y E7 se debe, en parte, a la pérdida de la proteína reguladora E2. Es común que las infecciones con un mayor grado de malignidad presenten la integración del genoma viral en el genoma de las células infectadas. La integración se produce en la región de E2, provocando la pérdida de esta proteína. Como consecuencia, no hay inhibición de E6 y E7 sino su sobreexpresión (Doorbar *et al.*, 2016; Schiffman *et al.*, 2016).

En adición a su papel para alterar la señalización de p53 y pRB, las oncoproteínas E6 y E7 alteran otras vías de señalización para promover la carcinogénesis cervical. Mediante su unión con la ligasa de ubiquitina E6AP, E6 induce la degradación de la proteína proapoptótica Bak para inhibir la apoptosis, contribuyendo al efecto debido a la eliminación de p53. La oncoproteína E6 también induce la activación transcripcional de la subunidad catalítica de la telomerasa para permitir indefinidamente la proliferación celular. La oncoproteína E6 induce la activación de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina al promover la estabilización de  $\beta$ -catenina por mecanismos que disminuyen su degradación e inducen su localización nuclear. La vía PI3K/ATK también es activada por E6 mediante la inhibición de reguladores negativos. Las vías Hippo y JAK/STAT también son alteradas por E6. Para el caso de E7, la promoción de la proliferación celular provoca inestabilidad genómica lo que contribuye a lesiones en el DNA y promueve la carcinogénesis. También, los oncogenes disminuyen la diferenciación epitelial al inhibir las vías de señalización que regulan la diferenciación. En resumen, la capacidad de inducir la proliferación celular e inhibir la diferenciación de los oncogenes promueve la carcinogénesis, pero otras alteraciones en vías de señalización también promueven este proceso (Scarth *et al.*, 2021; White, 2019; Yao-Teh *et al.*, 2018). Es importante identificar y estudiar aquellas alteraciones que promueven la carcinogénesis en miras de buscar tratamientos terapéuticos efectivos.

Relacionado a lo anterior, en estudios de secuenciación del cáncer cervical humano, se ha demostrado que los tumores adquieren un gran número de alteraciones genéticas adicionales, las cuales son eventos tardíos en la carcinogénesis. Mutaciones en proto-

oncogenes y supresores tumorales (ej. *KRAS*) y sobre-activación en diferentes vías de señalización que controlan proliferación, crecimiento celular y diferenciación (ej. RTK/PI3K/MAPK) se encuentran ampliamente representadas. Lo anterior señala que mutaciones en genes transformantes son necesarias para promover el proceso de transformación inducido por el VPH (TGCA, 2017; Litwin *et al.*, 2017).

#### *Células troncales embriónicas, cuerpos embrioides y teratomas.*

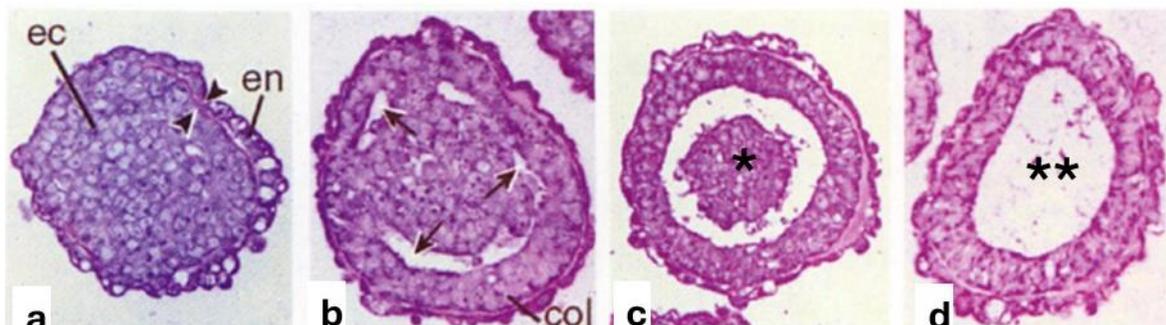
Las células troncales pluripotentes (PSC, del inglés *pluripotent stem cell*) tienen la capacidad de autorrenovarse indefinidamente conservando su identidad celular y la capacidad de diferenciación en células de las tres capas germinales del embrión. Existen diferentes tipos de células pluripotentes que provienen de diferentes orígenes: las células troncales embriónicas (ESC, del inglés *embryonic stem cells*) se derivan de la masa celular interna de embriones en etapa de blastocito; las células troncales pluripotentes (iPSC, del inglés *induced pluripotent stem cell*) inducidas se derivan de la reprogramación de células somáticas diferenciadas; células troncales derivadas del epiblasto post-implantación. Las ESC se han aislado de humano y de diferentes especies, entre ellas el ratón (mESC; Blum & Benvenisty, 2008).

La capacidad de renovación de las ESC requiere de un ciclo celular único que se caracteriza por fases G de muy corta duración. Se estima que en las mESC el ciclo celular dura 10 horas y que en cultivo más del 50% de las células se encuentran en las fases S y M. (Ben-David & Benvenisty, 2011; Padgett & Santos, 2020). Los mecanismos regulatorios que controlan este ciclo celular único son los siguientes: 1) dinámicas no oscilatorias de activación de las cinasas dependientes de ciclinas, 2) sobreexpresión de ciclinas, 3) reducida actividad de inhibidores del ciclo celular y 4) controles checkpoints alterados. El regulador maestro de la transición G1/S es la cinasa Cdk2. En el ciclo celular de células somáticas, las Cdk2 y su ciclina de asociación, la ciclina A, se expresan oscilatoriamente exclusivamente en la transición G1/S2. En las mESC, la Cdk2 está constitutivamente activa debido a la expresión constitutiva de la ciclina A. Por otra parte, la proteína Rb que resguarda la transición G1/S se encuentra hiperfosforilado y, por lo tanto, en su forma inactiva. Esto provoca la expresión constitutiva de los genes que regulan la replicación celular debido a la activación de los

factores E2F. Un factor que coadyuva a este fenómeno son los inhibidores de cinasa dependientes de ciclina CDKi que no se encuentran expresados en ESC. Todos estos factores hacen que el checkpoint de la transición G1-S no sea funcional (Padgett & Santos, 2020).

Cuando las ESC se cultivan en suspensión forman agregados tridimensionales, llamados cuerpos embrioides (EB, del inglés *embryoid body*), que se dividen y diferencian en células progenitoras de las tres capas embrionarias (Brickman & Serup, 2017; Zeevaert *et al.*, 2020). La primera etapa de formación de EB es la agregación de las células en suspensión. Al continuar con el cultivo (Fig. 3), las células de la periferia empiezan a diferenciarse en endodermo primitivo, las cuales expresan altos niveles de genes específicos de endodermo como laminina. La especificación de esta capa endodermal es inducida por la señalización FGF (*fibroblast growth factor*) (Murray & Edgar, 2004). Siguiendo con la diferenciación, el endodermo primitivo produce una membrana basal que envía señales de crecimiento a las células internas del EB. Aquellas células en contacto con la membrana basal forman un epitelio columnar que expresa marcadores de ectodermo primitivo. Concomitante a la diferenciación del ectodermo primitivo, el endodermo primitivo se diferencia hacia endodermo visceral y parietal, las cuales ayudan a la especificación del ectodermo primitivo. Por otra parte, el ectodermo primitivo continúa con su diferenciación a células que especifican a progenitoras de las tres capas germinales, mientras que las células más internas mueren por apoptosis (Fig. 3). Lo anterior provoca la formación de una cavidad quística (Zeevaert *et al.*, 2020). Se puede evaluar la diferenciación del EB mediante la medición de marcadores de las capas embrionarias: el endodermo expresa *Afp*, *Foxa2*, *Pdx1*, *Gata4*; el mesodermo expresa *Brachyury*, *Runx1*, *Bmp4*, *Hand1*; y ectodermo expresa *Fgf5*, *Sox1*, *Gfap*, *Nestina*. La expresión de marcadores de diferenciación aumenta durante el desarrollo de los cuerpos embrioides, mientras que los marcadores de pluripotencia disminuyen (ej. *Pou5f1*, *Nanog*, *Rex1*, *Sox2*; Sheridan *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2016). En estudios más recientes de transcriptómica se ha encontrado que los EB están compuestos de células que expresan conjuntos de genes asociados a progenitoras neurales, hepáticas, endoteliales, musculares, epiteliales y estromales.

Además, también se localizan células indiferenciadas que expresan marcadores de pluripotencia como *Oct4* (Guo *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2018; Rhodes *et al.*, 2022).



**Fig. 3 | Proceso de formación de cuerpos embrioides.** Las células troncales embrionarias, cuando se cultivan en suspensión, forman agregados celulares que se denominan cuerpos embrioides, los cuales presentan una capa externa de endodermo (*en*) y una masa de ectodermo (*ec*) separada por una membrana basal (**a**). Con el desarrollo posterior, los EB empiezan a formar un lumen o cavidad (flechas) por un proceso de cavitación (**b, c**) que involucra la activación de una vía muerte celular programada (\*). Los cuerpos embrioides completamente cavitados (\*\*) presentan un epitelio columnar rodeando la cavidad (**d**; Modificado de Coucouvanis & Martin, 1995).

La diferenciación de los EB recapitula aspectos del desarrollo embrionario en la etapa de pre-implantación, por lo que se ha postulado que el desarrollo de EB puede ser un modelo para estudiar la función génica en el desarrollo y diferenciación, procesos que son difíciles de estudiar *in vivo* específicamente en humanos (Brickman & Serup, 2017; Han *et al.*, 2018). Por ejemplo, la diferenciación endodermal y ectodermal en el EB recapitula las etapas iniciales de diferenciación de la masa celular interna, mientras que la formación de la cavidad quística recapitula la formación de la cavidad proamniótica (Murray & Edgar, 2004). Estudios más recientes han señalado los EB como un modelo para estudiar, mediante secuenciación masiva y bioinformática, la regulación génica en un gran número de progenitores celulares que recapitulan el desarrollo (Rhodes *et al.*, 2022). Además, se ha propuesto que pudieran servir como un modelo para evaluar el efecto de drogas y la toxicidad ambiental en el desarrollo embrionario. Por ejemplo, Guo *et al.* (2019) estudiaron el efecto de la nicotina sobre el desarrollo de los cuerpos embrioides. Se encontró que la nicotina, el principal constituyente químico del tabaco, disminuye la viabilidad celular y altera el ciclo celular de los progenitores en el EB. De esto surge la idea que los EB pueden ser un modelo para estudiar los efectos de oncogenes sobre una gran variedad de células.

Las ESC son células tumorigénicas, es decir, producen tumores cuando se trasplantan en ratones inmunodeficientes. Los tumores a los que dan origen las ESC son de un tipo particular llamados teratomas. Estos tumores se describieron inicialmente porque ocurren de manera espontánea en individuos adultos y se ha determinado que se originan de células germinales. Los teratomas también se pueden inducir experimentalmente al trasplantarse en ratones. Los teratomas son tumores benignos con tejidos completamente diferenciados de las tres capas germinales. En ellos se pueden distinguir tejido muscular, neuronal, epitelios glandulares y estratificados entre otros (Blum & Benvenisty, 2008). Cabe señalar que la inducción experimental de estos tumores es el estándar por excelencia para determinar la capacidad de diferenciación de las células troncales pluripotentes.

Si se cultivan por un largo período de tiempo o se someten a estrés, las células troncales embrionarias adquieren aberraciones cromosómicas similares a las que ocurren en el cáncer. Este fenómeno se denomina adaptación al cultivo y es similar al proceso de transformación maligna en células cancerígenas (Na *et al.*, 2014). Las ESC con aberraciones cromosómicas también son tumorigénicas cuando se trasplantan en animales inmunodeficientes, pero desarrollan un tumor maligno que, además de presentar tejidos de las tres capas germinales, tienen una población de células malignas indiferenciadas, llamadas células de carcinoma embrionario (ECC, del inglés *embryonal carcinoma cells*) que se caracterizan por la expresión de marcadores de pluripotencia (ej. Oct4, Nanog). Estos tumores se denominan teratocarcinomas y se consideran la contraparte maligna de los teratomas (Blum & Benvenisty, 2008).

El desarrollo de teratomas y teratocarcinomas en ratones es influido por el sitio de trasplante, el número y naturaleza de las células, el fondo genético del ratón receptor, la matriz que contienen las ESC (ej. matrigel, PBS, medio celular), así como otras células (ej. fibroblastos) que acompañen a las células troncales pluripotentes (ISCI, 2018). La inyección puede ser intramuscular, subcutánea, bajo de la capsula del testículo, o bajo la capsula del riñón. Los teratomas se desarrollan con más eficiencia si el número de células inyectado es mayor. Hay diferentes cepas de ratones inmunodeficientes que difieren en su capacidad para permitir el desarrollo de tumores (SCID, Nude Nu/Un, SCID beige), aunque también

pueden ser empleados los ratones inmunocompetentes (C57BL/6). El número mínimo de células trasplantadas puede ser  $1 \times 10^3$  hasta  $1 \times 10^6$  para producir tumores. La tasa de proliferación y la capacidad de diferenciación también influyen. Finalmente, se ha observado que el trasplante de ESC con fibroblastos o una matriz extracelular, como matrigel, promueven el establecimiento del teratoma (Gordeeva & Nikonova, 2013).

Se ha propuesto que los teratomas pueden servir como un modelo que recapitule la diferenciación de los tejidos de las capas germinales durante el desarrollo embrionario (Blum & Benvenisty, 2008). Además, debido a las aberraciones cromosómicas que pueden adquirir y que son similares a las de las células cancerosas, las ESC se han estudiado en el contexto del cáncer.

#### *Sistemas controlados por tetraciclina en el estudio de cáncer*

La necesidad de tener modelos biológicos que recapitulen la complejidad del cáncer es evidente. Para ello es necesario contar con tecnología que permita un control adecuado de las lesiones genéticas que se deseen estudiar, sus consecuencias biológicas y su importancia en el mantenimiento del fenotipo transformado (Welman *et al.*, 2007). Los sistemas de expresión/supresión controlados por tetraciclina son una de las tecnologías más utilizada que permiten la regulación espacial, temporal, cuantitativa y reversible en un gran número de células *in vitro* y tejidos en ratones transgénicos para el estudio de diferentes fenómenos biológicos (Sun *et al.*, 2007), incluyendo aquellos modelos utilizados en la investigación del cáncer (Welman *et al.*, 2007).

Los elementos de este sistema controlado por tetraciclina son: transactivador dependiente de ligando (rtTA o tTA), el promotor TRE (*tetracycline-responsive element*) y el gen de interés que se desee controlar transcripcionalmente. El activador tTA (*tetracycline-controlled transcriptional activator*) es un factor transcripcional sintético que fusiona el dominio de activación transcripcional de la proteína VP16 del virus herpes simplex y el represor de respuesta a tetraciclina (TetR). El tTA se une a su promotor en ausencia de ligando. El elemento rtTA (reverse-tTA) es un factor transcripcional que se modificó para unirse a su promotor en presencia de su ligando. Ambos factores han sido modificados para

ser altamente sensibles y específicos a la doxiciclina, un antibiótico derivado de la tetraciclina. El promotor TRE es un elemento sintético constituido por un promotor mínimo con una caja TATA y siete secuencias del operador tetO, el cual activa la expresión del gen de interés localizados cascada abajo (Das *et al.*, 2016).

Hay dos variaciones de este sistema: Tet-Off y Tet-On. El sistema Tet-Off se basa en el silenciamiento transcripcional en respuesta a doxiciclina (Dox). Sin Dox, el transactivador transcripcional tTA se une al promotor TRE para inducir la transcripción del gen de interés. En condiciones de inducción, la Dox provoca un cambio conformacional de tTA, permitiendo su liberación del TRE y apagando (Tet-Off) la transcripción del gen de interés. Por otra parte, el sistema Tet-On se basa en la inducción transcripcional del gen de interés en respuesta a Dox. Bajo condiciones sin inducción, el transactivador transcripcional reverso rtTA no puede unirse al elemento TRE y, por lo tanto, no hay expresión del gen de interés. Al inducir con Dox, se forma el complejo rtTA-Dox que se une al promotor TRE y activa la expresión (Sun *et al.*, 2007).

Un problema inherente del sistema Tet-On es la expresión transcripcional fuga en condiciones sin inducción. En algunos casos esta expresión residual no representa grandes problemas para el fenómeno biológico que se desea estudiar, pero en otros compromete el estudio de procesos biológicos complejos como el cáncer. Por ejemplo, si los productos de un transgen son tóxicos o producen grandes alteraciones celulares, el bajo nivel de expresión fuga puede producir inviabilidad de embriones (Sun *et al.*, 2007). Para evitar la fuga transcripcional del transgén se han desarrollado versiones de rtTA más sensibles a Dox, se ha modificado la secuencia del promotor TRE y se han creado silenciadores transcripcionales controlados por tetraciclina (Welman *et al.*, 2007).

El represor transcripcional tTS es un elemento sintético diseñado para disminuir la expresión residual del promotor TRE. El represor está constituido por el dominio represor TetR anclado al dominio KRAB (del inglés *Krüppel-associated box*) proveniente de la proteína Kid1 (Freundlieb *et al.*, 1999). El represor tTS reconoce el promotor TRE mediante su dominio TetR e inhibe la transcripción mediante el dominio KRAB. Gracias a su dominio

TetR, este represor es inhibido por la doxamiclina (Freundlieb *et al.*, 1999). La combinación del sistema Tet-On y el tTS permite disminuir la expresión fuga del gen de interés (Welman *et al.*, 2007). El tTS se une al promotor TRE para inhibir la transcripción residual durante períodos sin inducción. Al inducir con Dox, el tTS se libera el promotor y permite la unión del rtTA-Dox para activar la expresión del gen de interés (Sun *et al.*, 2007).

### **Antecedentes.**

Se ha propuesto que los teratomas y los cuerpos embrioides pueden ser utilizados para modelar etapas tempranas de desarrollo embrionario que, para el caso de los humanos, no pueden estudiarse (Brickman & Serup, 2017; Han *et al.*, 2018; Blum & Benvenisty, 2008). Otro fenómeno biológico imposible de estudiar directamente en humanos es el cáncer. Se ha propuesto a las ESC y sus derivados diferenciados (cuerpos embrioides y teratomas) como modelos para estudiar el cáncer (Zhang *et al.*, 2016), específicamente para estudiar cómo las aneuploidías comunes en diferentes tipos de cáncer afectan la proliferación y diferenciación. Se ha observado que las ESC con trisomías en los cromosomas 6, 8, 12 o 15 muestran mayor proliferación y menor capacidad de diferenciación (Zhang *et al.*, 2016). Los EB derivados de las ESC con trisomías mostraron una menor expresión de marcadores de diferenciación y mayor expresión de marcadores de pluripotencia. La inyección de ESC con trisomías en ratones inmunodeficientes produjo teratocarcinomas que crecieron más rápido, tuvieron mayor volumen y presentaron áreas de tejido no diferenciado (Zhang *et al.*, 2016). Esto señala que las ESC, los EB y teratomas podrían ser un modelo para estudiar los diferentes factores que participan en el inicio y progresión del cáncer.

Por otra parte, los teratomas se han propuesto como un modelo para estudiar la función génica en los linajes de las tres capas germinales (McDonal *et al.*, 2020). Al generar teratomas a partir de hiPSC modificadas genéticamente para silenciar genes involucrados en el desarrollo usando CRISPR-Cas9, se encontró que el silenciamiento de ciertos genes alteró los linajes desarrollados en el teratoma. Por ejemplo, al silenciar *RUNX1*, un gen involucrado en la formación de la cresta neural y la proliferación de mioblastos, los teratomas muestran una disminución de neuronas y células musculares. Si se silencia el gen *KLF6*, involucrado en la activación vascular durante la angiogénesis, los teratomas no desarrollan pericitos (McDonal *et al.*, 2020). Esto señala que los teratomas pueden constituir un modelo para estudiar la función génica en diversos tejidos de manera simultánea (McDonal *et al.*, 2020). Un estudio similar ha señalado el potencial de lo EB para entender la regulación génica en progenitores del desarrollo (Rhodes *et al.*, 2022) y las alteraciones en la diferenciación producidas por drogas (Guo *et al.*, 2019)

En nuestro laboratorio, se han utilizados ratones doble transgénicos para los oncogenes E6/E7 y el reportero de la actividad de Sonic Hedgehog (Shh) (Tg(Gli-Luc); Tg(K6b-E6/E7) (Kimura *et al.*, 2008) para evaluar la participación de la vía Shh en el promoción de la carcinogénesis cervical (Rojo-León *et al.*, 2019). El mecanismo celular en el que participa Shh probablemente es la promoción de la actividad proliferativa de las células suprabasales que entran al ciclo celular por la acción de E6/E7. Por lo tanto, esta evidencia indica que esta vía está involucrada en la progresión y mantenimiento del fenotipo maligno (Rojo-León *et al.*, 2019). Sin embargo, para que podamos corroborar la participación de Shh, es necesario eliminar o sobre-activar la función de diferentes componentes de la vía, lo que implicaría realizar cruzas con ratones transgénicos.

Conocer la participación de Shh podría ayudar al desarrollo de terapias basadas en el uso de inhibidores de la vía (ej. vismodegib), que actualmente se utilizan y están aprobados para el tratamiento de otros tipos de cáncer (Niyaz *et al.*, 2019). Sin embargo, para evaluar su participación en la carcinogénesis cervical, es necesario eliminar o sobreexpresar componentes (ej. Gli, SMO, PTCH) de la vía Hedgehog, principalmente a través de cruzas con ratones transgénicos. Esta estrategia experimental implicaría obtener varias generaciones de dobles o triples transgénicos, expansión de cada colonia y el uso de ratonas para estudiar el cáncer cervical (Heyer *et al.*, 2010). Como en todos los modelos de ratones genéticamente modificados, se traduciría en un mayor tiempo, trabajo, inversión e instalaciones para obtener resultados conclusivos. Además, por causas aún no identificadas, algunos organismos de nuestra línea transgénica (K6b-E6/E7) mueren repentinamente (Escalante-Alcalde *et al.*, 2010), por lo que este fenotipo podría exacerbarse en ratones dobles o triples transgénicos y limitaría la disponibilidad de animales para la investigación. Por lo tanto, necesitamos nuevos modelos que nos permitan evaluar la participación de diferentes vías de señalización (ej. Shh) y los oncogenes E6 y E7 en la carcinogénesis.

## Justificación

A pesar de que existen vacunas contra el VPH de alto riesgo que producen protección contra cáncer y lesiones en el tracto anogenital, el cáncer cervical constituyó el 7.7% de todos los cánceres en mujeres durante el 2020, con 341, 831 casos reportados mundialmente (GLOBOCAN, 2020). En México el cáncer cervical es el tercer cáncer más diagnosticado y que produce más muertes, solo después del cáncer de próstata y de mama (GLOBOCAN, 2020).

Con base a lo anterior, es urgente desarrollar nuevos modelos que permitan evaluar los mecanismos que regulan la carcinogénesis cervical de manera sencilla y en tiempos relativamente cortos. Aquí proponemos estrategias alternativas que involucran la generación de modelos *in vitro* y de formación de tumores a partir de ESC manipuladas genéticamente. Las ESC son fáciles de editar genéticamente (ej. transgénesis de oncogenes, mutaciones en supresores tumorales), su manipulación *in vitro* permite la evaluación sistemática de cada modificación y se puede mantener su potencial pluripotente con el uso de medios de cultivo específicos (Heyer *et al.*, 2010). Por otra parte, los teratomas y cuerpos embrioides son fáciles de generar, crecen en poco tiempo y su estudio es técnicamente sencillo (Gordeeva *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado que los cuerpos embrioides pueden servir como un modelo para estudiar anormalidades genéticas presentes en el cáncer (Zhang *et al.*, 2016) y los teratomas han servido como modelo para estudiar las funciones génicas en un gran número de células diferenciadas (McDonal *et al.*, 2020; Rhodes *et al.*, 2022). Por lo tanto, planteamos en este proyecto que los tejidos diferenciados dentro de los teratomas y cuerpos embrioides pueden constituir un sistema para: a) inducir la carcinogénesis por la acción de las oncoproteínas E6/E7 y b) en un futuro evaluar la participación de la vía de Hedgehog en la progresión del cáncer. Así, se espera que el crecimiento tumoral a partir de ESC que expresen E6/E7 forme teratocarcinomas o carcinomas con una elevada tasa de crecimiento y menor grado de diferenciación.

**Hipótesis**

Los oncogenes E6/E7 promueven la proliferación y transformación durante el desarrollo de los cuerpos embrioides y teratomas derivados de ESC modificadas.

**Objetivo general**

Evaluar el crecimiento de cuerpos embrioides y teratomas que sobreexpresen los oncogenes E6/E7.

*Objetivos particulares*

1. Generar y caracterizar el vector PB-Booster 2 E6/E7.
2. Derivar clonas de células troncales embrionarias W9.5 transfectadas con los transposones PB-TRE-E6/E7 o PB-Booster 2 E6/E7.
3. Caracterizar las clonas de células troncales embrionarias transfectadas con los transposones PB-TRE-E6/E7 o PB-Booster 2 E6/E7.
4. Generar cuerpos embrioides de las clonas de células troncales embrionarias transfectadas con los transposones PB-TRE-E6/E7 o PB-Booster 2 E6/E7.
5. Generar teratomas derivados de las células troncales embrionarias W9.5 transfectadas con los transposones PB-TRE-E6/E7 o PB-Booster 2 E6/E7.

## **Materiales y métodos.**

### *Generación de vector PB-Booster 2.0 E6/E7.*

El vector PB-E6/E7-NeoR (8001 bp) se digirió con las enzimas de restricción XhoI (R0146S, New England Biolabs) y BsrGI (R3575S, New England Biolabs) y se aisló, mediante un kit comercial de aislamiento por gel de agarosa (Thermo Scientific GeneJet Gel Extraction Kit), una banda de 6659 bp que tiene eliminado el promotor PGK y el gen de resistencia a neomicina NeoR. Con esto se obtuvo el fragmento BsrGI-PB-E6E7-XhoI. En otra reacción, este mismo vector PB-E6/E7-NeoR se digirió con las enzimas XhoI (R0146S, New England Biolabs) y PstI (R0140S, New England Biolabs) para aislar el promotor PGK (517 bp) flanqueado por las secuencias de los sitios XhoI y PstI. El represor transcripcional tTS se clonó por PCR punto final a partir del vector pHLab27-egfp, utilizando los siguientes oligonucleótidos: FW-PstI-tTS (5'ATActgcag**CCACCATGTCTAGAT**'3) que contiene la secuencia Kozac (negritas) añadida después del sitio PstI (minúscula); RV-BsrGI-tTS (5'AGAtgtaca**TTACCAGGGATCCTCT**'3) contiene un codón de paro (negritas) añadido después del sitio BsrGI (minúscula). La DNA polimerasa usada para el PCR fue 2x PCR BIO VeriFi Mix (PB10.42-01, PCRBIOSYSTEMS) y la mezcla de reacción se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los parámetros de reacción fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 1 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 s, alineamiento 60°C por 15 s y extensión 72°C por 45 seg. El producto de PCR (857 bp) fue digerido con las enzimas de restricción PstI (R0140S, New England Biolabs) y BsrGI (R3575S, New England Biolabs) y se aisló el producto digerido mediante extracción con kit comercial del gel de agarosa. El fragmento BsrGI-PB-E6E7-XhoI, el promotor XhoI-PGK-PstI y el represor transcripcional PstI-tTS-BsrGI se ligaron con la ligasa T4 DNA (M0202S, New England Biolabs) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El producto de ligación se electroporó (25 µF, 200 ohms, 2.5kV, GenePulser Xcell™ Bio-Rad) en bacterias electrocompetentes DH10b™ (EC0113, Thermo Scientific). Se eligieron colonias de bacterias que fueron resistentes a la selección con antibiótico, se aisló el plásmido y se realizaron análisis de restricción para identificar la ligación de los insertos. El nuevo plásmido se secuenció por la unidad de Síntesis y Secuenciación, IBT, UNAM para verificar la clonación del represor tTS. Este nuevo vector se denominó PB-Booster 2 E6/E7 (descrito en resultados).

### *Transfección química de células HEK293 con vectores PB-TRE-E6/E7 o PB-Booster 2 E6/E7*

Para evaluar el efecto del represor tTS sobre la expresión fuga de E6 y E7 en el nuevo vector PB-Booster 2 E6/E7, se transfectó químicamente la línea celular HEK293. Debido a que el vector PB-Booster 2.0 E6/E7 no tiene gen reportero, se co-transfectó con el vector PB-Luc-Cherry, el cual expresa constitutivamente la proteína reportera Cherry, para evaluar la eficiencia de transfección (en relación 1:1). Independientemente, el vector PB-TRE-E6/E7 (López-Hernández, 2018) se transfectó para poder comparar su funcionalidad con respecto al nuevo sistema de expresión. Las células HEK293 se cultivaron en medio modificado de

Dulbecco (DMEM, 12100-038, GIBCO) complementado con 10% de suero bovino fetal (26140-079, GIBCO) y se mantuvieron en una incubadora a 37°C con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Las células HEK293 fueron transfectadas químicamente con polietilenimina (1mg/ml, PEI; #23966, Polyscience) de acuerdo con Yang *et al* (2016), con las siguientes modificaciones. La cantidad total de DNA transfectado para células HEK293 en una caja de 21 cm<sup>2</sup> es 9.2 µg. Además, se utilizó 1 µg del vector que contiene la transposasa (pCAG-HYP) por cada 4 µg de los transposones. Se realizaron dos transfecciones independientes utilizando 9.2 µg totales de DNA plasmídico: **1**) pCAG-HYP (1.84 µg), PB-Booster 2.0 E6/E7 (3.684 µg) y PBLuc-Cherry (3.684 µg); **2**) pCAG-HYP (1.84 µg), PB-TRE-E6/E7 (3.684 µg) y PB-Luc-Cherry (3.684 µg). Se hicieron dos réplicas biológicas con una réplica técnica cada una. Se utilizó 28.70 µg PEI para 9.21 µg DNA. Para la transfección: sembrar 1x10<sup>4</sup> células por cm<sup>2</sup> en una caja de cultivo celular de 60 mm de diámetro (21.5 cm<sup>2</sup>) un día antes del procedimiento. Remover medio de cultivo, lavar con PBS y agregar 2 ml de medio DMEM complementado con 2% de suero fetal bovino e incubar por 2 horas. Suspender el DNA en PBS, obteniendo un volumen final de 100 µl. Mezclar el PEI con PBS, obteniendo un volumen final de 100 µl. Mezclar las soluciones DNA+PBS y PEI+PBS con vortex por 1 minuto y dejar reposar por 10 min a temperatura ambiente. Mezclar las soluciones de DNA y PEI y dejar reposar por 5 min para permitir la formación de complejos DNA-PEI. Adicionar por goteo el complejo PEI:DNA a las células, mezclar ligeramente e incubar por 3 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, aspirar el medio de transfección, lavar dos veces con PBS y adicionar medio de cultivo. Se observó la fluorescencia de las proteínas reporteras con un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Observer.Z1 después de 24 horas de transfección. Se usó el objetivo EC Plan-Neofluar 10x/0.30, los reflectores Rhodamine (excitación BP 546/12 nm; divisor óptico FR 560 nm; emisión BP 575-640 nm) para observar la proteína Cherry y Yellow Fluorescent Protein (Excitación BP 500/12 nm; divisor óptico 515 nm; emisión 535-30 nm) para monitorear la proteína Venus. A las 24 h de la transfección las células HEK293 se subcultivaron en nuevas cajas de 21.5 cm<sup>2</sup> para inducir la expresión de los oncogenes con doxiciclina (Dox, Sigma). Se realizaron tres tratamientos: 0 ng, 50 ng y 150 ng de doxiciclina por mililitro de medio. La incubación con Dox se realizó por 24 horas, posteriormente se aisló el RNA y se generó cDNA (ver más adelante) para determinar el nivel de expresión de los oncogenes E6/E7.

#### *Extracción de RNA.*

La extracción de RNA se llevó a cabo por el método de trizol de acuerdo con las especificaciones del fabricante (RiboEx™, GeneAll) con las siguientes modificaciones. Para células en monocapa, retirar el medio de cultivo, lavar con PBS y añadir 500 µl de Riboex™. Dar golpecitos y pipetear para despegar las células y transferir a un tubo de 1.5 ml. Si las muestras no se procesan en ese momento, congelar inmediatamente el tubo con las células resuspendidas en trizol en nitrógeno líquido y almacenar a -60° C. Incubar las muestras homogenizadas por 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación de los complejos de nucleoproteína. Añadir 100 µl de una solución de cloroformo y alcohol

isoamínico (49:1), agitar por inversión y dejar reposar por 5 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 12,000 x g por 15 min a 4°C. Tomar la fase acuosa superior, evitando tomar la fase intermedia, y transferir a un nuevo tubo. Medir la cantidad de fase acuosa obtenida y agregar un volumen equivalente de Riboex™ a la fase acuosa. Agitar con vortex por 10 s. Agregar 100 µl de cloroformo: alcohol isoamínico (49:1), agitar con vortex 10-15 seg o por inversión y dejar reposar por 5 min a TA. Centrifugar 12,000 x g a 4° por 15 min. Recuperar fase acuosa, evitando llevar la fase intermedia. Agregar 250 µl de cloroformo: alcohol isoamínico y centrifugar a 12,000 x g por 10 min. Recuperar fase superior y agregar un volumen de isopropanol frío. Dejar precipitando el RNA a -20° C durante la noche. Centrifugar a 12000 x g a 4°C por 20 min. Desechar isopropanol y observar pastilla de RNA precipitado. Agregar 0.5 ml de etanol (75%) y mezclar suavemente. Centrifugar a 12000 x g a 4°C por 10 min. Desechar etanol, dejar evaporar en campana y agregar H<sub>2</sub>O de grado biología molecular. Calentar cada muestra por 5-10 min a 55°C y colocar en hielo por 1 min y cuantificar la calidad de RNA ( $A_{260}/A_{280}>1.8$ ) con espectrofotómetro (P300, IMPLÉN).

#### *Síntesis de cDNA*

La síntesis de cDNA se realizó con la enzima transcriptasa reversa Tribo™ (TBS4006, Tribioscience) con las siguientes modificaciones. Debido a que inicialmente sólo se requería la determinación de la expresión de E6/E7, se realizó el cDNA a partir de solo 200 ng de RNA. La mezcla de reacción fue la siguiente: 7 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl transcriptasa Tribo™ y 200 ng RNA. El tubo de reacción se incubó: 25°C por 5 min, 50°C por 30 min, 85°C por 5 min.

#### *Reacción de PCR de punto final contra E6/E7 y E6.*

La PCR de punto final se realizó con la enzima 2x Kappa Ready Mix Robust (KR0381\_S, KapaBiosystems) siguiendo las especificaciones del fabricante con las siguientes modificaciones. Los oligonucleótidos para identificar el transcrito completo de E6/E7 son: E6/E6E7-F (5'TTTTATGCACCAAAGAGAACTG3') y E6/E6E7-R (5'TACCTGCAGGATCAGCCATG3'). Los oligonucleótidos contra los transcritos de E6 son: E6/E6E7-F (5'TTTTATGCACCAAAGAGAACTG3') y E6-R (5' GTATCTCCATGCATGATTACAG3'). Los oligonucleótidos contra el transcrito E6\*II fueron E6/E6E7-F (5'TTTTATGCACCAAAGAGAACTG3') y E\*II-R (5'TACGTGTTCTTGATCTCACGTC'3). Hacer la mezcla de reacción: 7.5 µl Kappa Ready Mix, 1 µl mezcla de oligonucleótidos (10 µM), 5.5 µl H<sub>2</sub>O y 1 µl cDNA total. Condiciones de reacción por 25 ciclos: 95° C - 15 s desnaturalización, 57°C – 15 s alineamiento, 72°C – 15 s extensión. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa (1%) teñido con Hydragreen en amortiguador TAE 1x y las imágenes se analizaron con el software ImageJ para obtener la densidad relativa de cada banda.

#### *Inactivación mitótica de MEF o generación de células alimentadoras.*

Sembrar fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) de la cepa C57BL/N9 y esperar que proliferen. Adicionar 10 µg/ml de Mitomicina C (Roche) incubar entre 2-4 horas a 37° C.

Remover medio, lavar dos veces con PBS y cultivar en cajas cubiertas con gelatina o congelar para su uso posterior. Para cultivar se siembran 35,000-40,000 por pozo en placa de 96 pozos,  $2.5-3 \times 10^5$  en placa de 24 pozos,  $6-7 \times 10^5$  en la caja de 35 mm de diámetro,  $1.2 \times 10^6$  en una caja de 60 mm de diámetro,  $2.5 \times 10^6-3 \times 10^6$  en una caja de 10 cm de diámetro.

#### *Cultivo de células troncales embriónicas de ratón W9.5*

Las células troncales embriónicas W9.5 fueron cultivadas sobre células alimentadoras en medio modificado de Duplecco (denominado M15) complementado con 15% suero bovino fetal, 1mM glutamina, 50 U/ml penicilina, 40 µg/ml estreptomina, 1% aminoácidos no esenciales, 1 mM piruvato de sodio y 0.1 mM β-mercaptoetanol y 1000 U/ml del factor inhibidor de leucemia (LIF, del inglés *leukemia inhibitor factor*). Las células se cultivaron en una incubadora a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Este medio M15 fue utilizado para el cultivo de las ESC.

#### *Electroporación de células troncales embriónicas.*

Con el objetivo de generar las clonas de células troncales embriónicas W9.5, se transfectaron las células mediante electroporación. En el laboratorio se ha establecido un protocolo para la transfección de fibroblastos de ratón (Sánchez-Cázares, 2020) que también ha servido para las ESC Cas<sup>-/-</sup> (C57BL/N6) (Rivera, 2022) con eficiencias de 30% de electroporación. Por lo tanto, se utilizó este protocolo para transfectar las células troncales embriónicas W9.5.

Debido a que el vector PB-Booster 2.0 E6/E7 no tiene gen reportero, se co-transfectó con el vector PB-Luc-Cherry, el cual expresa constitutivamente la proteína reportera Cherry, para evaluar la eficiencia de transfección (en relación 1:1). Además, se utilizó 1 µg del vector que contiene la transposasa (pCAG-HYP) por cada 4 µg de los transposones. Se realizaron dos electroporaciones: **1)** pCAG-HYP (1 µg), PB-TRE-E6/E7 (2 µg) y PB-Luc-Cherry (2 µg); **2)** pCAG-HYP (1 µg), PB-Booster 2 E6/E7 (2 µg) y PB-Luc-Cherry (2 µg). Por otra parte, con el objetivo de disminuir el número de inserciones de los transposones en el genoma, se redujo la cantidad del vector pCAG-HYP para tener una menor expresión y actividad de la transposasa. Utilizando una relación 1:25 transposasa a transposones, se realizaron dos electroporaciones adicionales: **3)** 0.2 µg pCAG-HYP, 2.4 µg PB-TRE-E6/E7 y 2.4 µg PB-Luc-Cherry; **4)** 0.2 µg pCAG-HYP, 2.4 µg PB-Booster 2 E6/E7 y 2.4 µg PB-Luc-Cherry. Los plásmidos se suspendieron en la solución de electroporación comercial BTXpress (45-0802, BTX) en un volumen total de 100 µl y se mantuvieron en hielo hasta ser utilizados.

El procedimiento de electroporación es el siguiente: tripsinizar células, inactivar la tripsina y centrifugar a 125 x g por 5 min. Retirar el sobrenadante y suspender el botón celular en 3 ml de PBS. Contar el número de células viables con azul de tripano. Transferir  $5 \times 10^5$  células en un tubo de 1.5 ml y centrifugar a 500 x g por 5 min. Aspirar el sobrenadante y suspender el botón celular con la solución de electroporación BTX y los plásmidos. Transferir la suspensión celular a una celda de electroporación BTX de 2 mm (45-0135, BTX), y dar un

pulso de electroporación (170 V, 20 ms, ElectroSquarePorator™ ECM830). Agregar 200 µl de medio M15 y transferir las células a un tubo de 1.5 ml. Incubar por 10 min en una incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Suspender las células electroporadas en medio de ESC y sembrar en una caja de 35 mm de diámetro (8.8 cm<sup>2</sup>) con células alimentadoras. La eficiencia de electroporación se puede estimar contando el número de colonias fluorescentes después de dos días de crecimiento. Posteriormente, cuando las células lleguen a confluencia se pueden cultivar para aislar clonas ESC como se describe más adelante.

#### *Selección y expansión de clonas ESC.*

Como la eficiencia de electroporación es alrededor de 20-30%, la población electroporada de ESC contiene células transfectadas y células que no adquirieron plásmidos. Para obtener una clona de ESC, es decir, una población genéticamente homogénea que se originó a partir de una célula única, se debe aislar una colonia que creció a partir de una sola célula. Este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con Mulas *et al.* (2019) con las siguientes modificaciones: sembrar 500 células de la población electroporada sobre células alimentadoras en una caja de 10 cm de diámetro (56.7 cm<sup>2</sup>) para que las colonias crezcan lo suficientemente separadas y sean de origen clonal. Observar el crecimiento de las colonias por aproximadamente de 10 días para identificar las colonias compactas y con bordes bien definidos, las cuales son las colonias que potencialmente se podrían aislar. Para el caso de las células electroporadas con los vectores PB-TRE-E6/E7 y PB-Luc-Cherry, las colonias seleccionadas fueron aquellas positivas para las proteínas fluorescentes Venus (YFP) y Cherry. Por otra parte, las colonias con la integración de los transposones PB-Booster 2 E6/E7 y PB-Luc-Cherry se seleccionaron con base en la fluorescencia de Cherry. Las colonias están listas para picar cuando se puedan observar a simple vista. Preparar una placa de 96 pozos con células alimentadoras (30,000-40,000 células por pozo) un día antes de aislar las clonas. En una placa de 96 pozos agregar 50 µl de tripsina (0.25%) en cada pozo dependiendo del número de colonias seleccionadas. Lavar la caja de colonias ESC con PBS y cubrir con 3 ml PBS. El aislamiento se realiza fuera de la campana de flujo laminar, por lo que debe realizarse bajo condiciones asépticas. Si es posible se puede realizar utilizando un microscopio invertido para observar las colonias. Con una punta de 200 µl hacer un contorno alrededor de la colonia seleccionada para promover que se desprege de la placa y de las células alimentadoras. Cuando esté desprendida, tomar la colonia de ESC con la micropipeta y transferir a un pozo con tripsina. Una vez colectadas todas las colonias, incubar a 37° C por 10 minutos en incubadora a 37° C. Agregar 50 µl de medio y suspender las células, pipeteando 10 veces con la micropipeta. Transferir las ESC a pozos de 96 con células alimentadoras. Cuando las células troncales en la caja de 96 pozos lleguen a confluencia pasar a placa de 24 pozos. Las células se pueden congelar o continuar expandiendo hasta una caja de 60 mm (21.5 cm<sup>2</sup>).

En total se aislaron 39 clonas que contienen los transposones PB-Booster 2 E6/E7 y PB-Luc-Cherry, de las cuales 17 se electroporaron en una relación 1 a 5 de transposasa a transposón, mientras que 22 se transfectaron con una relación 1 a 25 (Ver Tabla 1 en Apéndice 1). De estas clonas, se seleccionaron la A3 y A6 y se denominaron por simplicidad A3-tTS y A6-tTS debido a que contienen el sistema que expresa el represor transcripcional tTS. Por otra parte, fueron 37 las clonas que contienen los transposones PB-TRE-E6/E7 y PB-Luc-Cherry, 18 con relación 1:5 y 19 con relación 1:25 transposasa a transposón. Las clonas seleccionadas que contienen los transposones PB-TRE-E6/E7 y PB-Luc-Cherry se denominaron por simplicidad A1-Venus y C1-Venus debido a que contienen la expresión constitutiva de la proteína fluorescente Venus. Con estas cuatro clonas (A3-tTS, A6-tTS, A1-Venus y C1-Venus) se trabajó para los experimentos de proliferación celular, formación de cuerpos embrioides e inducción teratomas descritos a continuación.

#### *Imagen de bioluminiscencia in vitro*

El vector PB-Luc-Cherry, el cual se electroporó en las ESC W9.5, expresa constitutivamente la proteína fluorescente Cherry y la enzima luciferasa. Esta enzima oxida el sustrato D-luciferina produciendo la emisión de luz. A este fenómeno se denomina bioluminiscencia. Para determinar si las células troncales embrionicas tienen bioluminiscencia por acción de la luciferasa, se tomaron 40,000 células y se sembraron en pozos de placa de 24 pozos. Después de 1 h del cultivo, las células se incubaron con 1mM de D-luciferina (LUCK-1G, Gold Biotechnology) por 15 min a 37 ° C y se analizó la bioluminiscencia. Este tiempo se definió como hora 0. Las células crecieron por 48 h (denominado hora 48) y se analizó otra vez la bioluminiscencia. La bioluminiscencia se capturó con un cámara CCD instalada en el equipo “in vivo Xtreme” (Bruker), ubicado en el Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA) del Instituto de Biotecnología, UNAM, con los siguientes parámetros: 11.5 cm<sup>2</sup> de campo visual, “binning factor” de 4, apertura 1.1 de f/stop, filtro abierto y tiempo de adquisición de 3 min.

Para cuantificar la señal de bioluminiscencia se definió una región circular en el área de los pozos de placa de 24 pozos. La intensidad de la señal se expresó como la suma total del flujo de fotones (p/s/mm<sup>2</sup>). Las imágenes se procesaron con el software molecular Imaging (Bruker).

#### *Inducción de expresión de E6/E7 en ESC W9.5 transgénicas*

Como parte de la caracterización de las clonas de ESC, se determinó la expresión de los oncogenes E6 y E7 al inducir con doxiciclina. Se sembraron 60,000 células troncales embrionicas (A1-Venus, C1-Venus, A3-tTS, A6-tTS) en pozos (1.9 cm<sup>2</sup>) de placa de 24 sobre células alimentadoras. La expresión de E6/E7 se indujo con 1.5 mg de Dox por ml de medio durante 24 h. Se realizaron tres réplicas biológicas. Se extrajo RNA, se generó cDNA y se analizó la expresión de E6/E7 mediante TR-PCR contra el transcrito E6\*II como se describe más adelante.

### *Ensayo de proliferación celular de células troncales embrionicas*

Los oncogenes E6 y E7 alteran el ciclo celular. Para conocer si las ESC sufren una alteración en su capacidad proliferativa por la sobreexpresión de E6 y E7, se realizó un ensayo de proliferación celular. Se sembraron 40,000 células troncales de en pozos (1.9 cm<sup>2</sup>) de placa de 24 con células alimentadoras. Las células crecieron por 48 h, se levantaron y se contó el número de células viables con azul de tripano en una cámara de Neubauer. Se sustrajo el número de células alimentadoras cultivado ( $2.5-3 \times 10^5$ ) al número total de células viables obtenido. Posteriormente, se volvieron a sub-cultivar 40,000 ESC en un nuevo pozo y se permitieron proliferar por 48 h. El subcultivo se realizó hasta los 16 días de crecimiento. La expresión de E6/E7 se indujo con 1.5 mg de Dox por ml de medio a lo largo de todo el período. Al grupo control no se añadió doxiciclina. Se realizaron tres réplicas biológicas para las clonas A1-Venus, A3-tTS, A6-tTS y C1-Venus. Se determinó el número de células acumulativo adicionando el número de ESC obtenido a lo largo de los 16 días y se graficaron contra el número de días de cultivo.

### *Formación de cuerpos embrioides.*

El protocolo para la formación de cuerpos embrioides se llevó a cabo según Ngondo *et al.* (2020), con las siguientes modificaciones. Se realizaron experimentos con las clonas A1-Venus, C1-Venus, A3-tTS y A6-tTs. El procedimiento inició con ESC cultivadas sobre una caja de 6 cm de diámetro (21.5 cm<sup>2</sup>) con células alimentadoras, luego cultivar  $5 \times 10^5$  ESC en cajas cubiertas con gelatina sin células alimentadoras en medio M15 y con 1000 U/ml LIF por 48 h. Levantar las células y contar el número de células viables con azul de tripano. Sembrar  $5 \times 10^5$  ESC en placas bacteriológicas de 10 cm de diámetro con medio M10 e incubar a 37<sup>o</sup> C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Las células troncales embrionicas sobrantes se suspendieron en 500 µl de RiboEx™ (GeneAll) para la extracción de RNA como se ha descrito anteriormente. Estas células corresponden al día 0 del protocolo de formación (D0). Adicionar 1.5 mg de doxiciclina (Dox) por ml de medio para inducir la sobreexpresión de los oncogenes E6/E7. Al grupo control no se adicionó doxiciclina. Al día 3 (D3), 5 (D5), 8 (D8) y 10 (D10) de diferenciación, cambiar el medio y adicionar nuevamente 1.5 µg/ml de doxiciclina. Para cambiar medio, transferir suavemente los cuerpos embrioides a un tubo de 50 ml con una pipeta de 25 ml y dejar que se sedimente al fondo del tubo por 10 min. Tomar una pequeña muestra de los cuerpos embrioides y suspender en 500 µl de RiboEx™ (GeneAll) para la extracción de RNA como se ha descrito. Aspirar el medio del tubo de 50 ml, agregar 10 ml de medio M10, suspender ligeramente los cuerpos embrioides y transferir cuidadosamente a una nueva caja bacteriológica. El crecimiento y la morfología fueron examinados diariamente usando un microscopio de contraste de fases. Se capturaron imágenes de cada cultivo con un teléfono celular MotoG7 Plus (XT1965-2) con cámara Dual, 16 MP (apertura focal f/1.7, tamaño de píxel 1.22 µm). Las imágenes se analizaron para determinar el diámetro de cada cuerpo embrioides (ver más adelante). Se realizaron 2 réplicas biológicas de cada cultivo control y con doxiciclina de las cuatro clonas transgénicas.

### *Tinción de hematoxilina y eosina de cuerpos embrioides*

Los cuerpos embrioides al día 10 de diferenciación se transfirieron a un tubo de 50 ml, se permitió que sedimentaran por 10 min, se retiró el medio cuidadosamente y se transfirieron a tupos de 1.5 ml. Los cuerpos se fijaron en 1 ml de paraformaldehído (4% peso/volumen) por 2 h a 4º C en constante agitación. Posteriormente, se removió el paraformaldehído, se suspendieron 3 veces en PBS durante 15 min en agitación. Finalmente, se removió el PBS y se suspendieron en sacarosa estéril (30% peso/volumen) durante 12 h en constante agitación. Los cuerpos embrioides se pueden mantener en sacarosa a 4º C hasta su procesamiento.

Para realizar la histología, se tomó una gota de sacarosa con cuerpos embrioides suspendidos y se colocó sobre Parafilm. Se retiró cuidadosamente la sacarosa con una micropipeta y se embebieron en Tissue-Tek (Sakura Finetek), se congelaron en hielo seco y se montaron para cortes en criostato (CM1850, Leica). Los cortes histológicos se realizaron de un espesor de 10 µm y se montaron en cubreobjetos cargados (Fisher Scientific) y fueron almacenados a -20 ºC. Las muestras se tiñeron con hematoxilina por 40 s, se lavaron con agua por 5 min, se incubaron con etanol 50% por 3 min y posteriormente con etanol 70% por 3 minutos. Se incubaron con eosina por 1 min, con etanol 96% por 5 min y con etanol absoluto por 3 min. Se adicionó xileno por 5 min, se cubrieron con entellan y se colocó un portabojetos. Los cortes histológicos se observaron en un microscopio óptico Olympus BX51.

#### *Análisis de expresión de cuerpos embrioides*

Se extrajo el RNA a los días D0, D3, D5, D8 y D10 de formación de los cuerpos embrioides. Se generó el cDNA de 200 ng de RNA, como se ha descrito anteriormente. Una parte cDNA se diluyó con 4 partes de agua, la cual fue utilizada para el PCR de punto final. Para la evaluación de la expresión de E6\*II se utilizaron los oligonucleótidos E6/E6E7-F y E6\*I, como se ha descrito anteriormente. Se midió el nivel de expresión de *Fgf5* (5'CCTTGCGACCCAGGAGCTTA3', 3'CCGTCTGTGGTTTCTGTTGAGG3'). Para la mezcla de reacción: 7.5 µl Kappa Ready Mix, 1 µl mezcla de oligonucleótidos (10 µM), 5.5 µl H<sub>2</sub>O y 1 µl cDNA total. Condiciones de reacción por 30 ciclos: 95° C - 15 s desnaturalización, 57-65 °C – 15 s alineamiento, 72°C – 15 s extensión. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa (1%) teñido con Hydragreen en amortiguador TAE.

#### *Generación de teratomas en ratones NOD-SCID*

La generación de teratomas en ratones NOD-SCID se realizó bajo la supervisión del Dr. Heriberto Abraham Valencia González en las instalaciones del Hospital Nacional de Cancerología siguiendo su protocolo establecido. Debido a que las clonas A1-Venus y C1-Venus mostraron una inducción consistente de los oncogenes E6 y E7 en las células troncales embrionarias y los cuerpos embrioides, se decidió continuar con el trasplante de estas células para la generación de teratomas en ratones NOD-SCID hembras y machos de 9 semanas de edad.

Las ESC crecieron por al menos dos pases para que estuvieran en su etapa de crecimiento exponencial. El procedimiento para el manejo de las células es el siguiente: levantar las células con tripsina al 0.05% durante 5 minutos a 37°C, inactivar la tripsina con medio suplementado. Homogenizar con pipeta y centrifugar a 200 x g por 5 min a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante, suspender el botón celular en medio de cultivo basal F12. El volumen de medio basal depende de la cantidad estimada de células obtenidas y que se inocularán. Contar las células viables con azul de tripano en una cámara de Neubauer. Realizar el cálculo para conocer el volumen necesario que contiene la cantidad de células para inocular. Es recomendable que este volumen sea menor a 200 µl. Colocar la suspensión celular en un tubo estéril de 1.5 ml y agregar medio basal F12 para completar 200 µl. Trasladar las muestras al sitio donde se encuentran los ratones en el menor tiempo posible para asegurar la viabilidad de las células. Remover el embolo de la jeringa ultrafina (jeringa para insulina 1 de ml, 27G x 13 mm) y trasvasar la suspensión celular previamente suspendida y homogenizada con pipeta. El procedimiento para la inyección subcutánea de las células es el siguiente: sujetar al ratón y agarrar la piel sobre los hombros con los dedos pulgar e índice. Desinfectar suavemente la piel dorsal con una torunda de algodón saturada con etanol al 70%. Insertar suavemente la aguja con el bisel hacia arriba en la piel del flanco dorsal para llegar al bolsillo subcutáneo evitando la capa muscular subyacente. Expulsar suavemente el contenido de la jeringa. Después de inyectar el contenido de la jeringa, permanecer unos segundos antes de sacar la aguja y así reducir el riesgo de fuga de la suspensión celular. Retirar la aguja y colocar los ratones en su jaula.

La latencia de crecimiento del tumor fue de 4 semanas. A los ratones se les suplió de agua con 2 mg/ml de doxiciclina de uso veterinario (Tabernil) con 5% de sacarosa a partir del tercer día de inoculación de las células. Se monitoreó la supervivencia de los ratones y el crecimiento del tumor de 2 a 3 veces por semana, midiendo la longitud máxima y longitud mínima del tumor usando un vernier. Los ratones fueron sometidos a eutanasia a las 4 semanas o cuando el tumor creció hasta un diámetro de 200-300 mm en cualquiera de sus dimensiones. El volumen del tumor (VT) se calculó con la siguiente fórmula:  $VT: \frac{1}{2} (L * W^2)$ , donde L es la longitud máxima y la W la longitud mínima del tumor.

#### *Imagen de bioluminiscencia in vivo*

Los ratones se inyectaron vía intraperitoneal con 150 mg/kg de D-luciferina (LUCK-1G, Gold Biotechnology) y la bioluminiscencia se capturó con un cámara CCD instalada en el equipo "in vivo Xtreme" (Bruker), ubicado en el LNAM del Instituto de Biotecnología, UNAM, con los siguientes parámetros: 11.9 cm<sup>2</sup> de campo visual, "binning factor" de 2, apertura 1.1 de f/stop, filtro abierto y tiempo de adquisición de 3 min. La intensidad de la señal se expresó como la suma total del flujo de fotones (p/s/mm<sup>2</sup>). Las imágenes se procesaron con el software molecular Imaging (Bruker).

#### *Análisis estadístico*

Se realizaron pruebas estadísticas con el software GraphPad Prism (9.1.1). La normalidad de los datos de la proliferación celular de las células troncales embriónicas fue evaluada con una prueba de Shapiro-Wilk. Los datos mostraron normalidad por lo que las diferencias entre las muestras control y el tratamiento con doxiciclina se determinó con una prueba de T no pareada de dos colas ( $P=0.05$ ). Los datos se expresaron como media aritmética y desviación estándar en las curvas de crecimiento acumulativo. El diámetro de los cuerpos embrioides fue medido manualmente con el software Photoshop CS6. Si los EB fueron irregulares se midió la distancia más larga de la circunferencia. Se realizó una prueba de Kolmogorv-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos del diámetro de los cuerpos embrioides. Debido a que los datos no fueron normales, se realizó una prueba U de Mann Whitney ( $P=0.05$ ) para probar si había diferencias en el tamaño de los EB con y sin doxiciclina. Los datos se expresan como gráficos de cajas que delimitan del primer al tercer cuartil y los bigotes representan los valores máximos y mínimos.

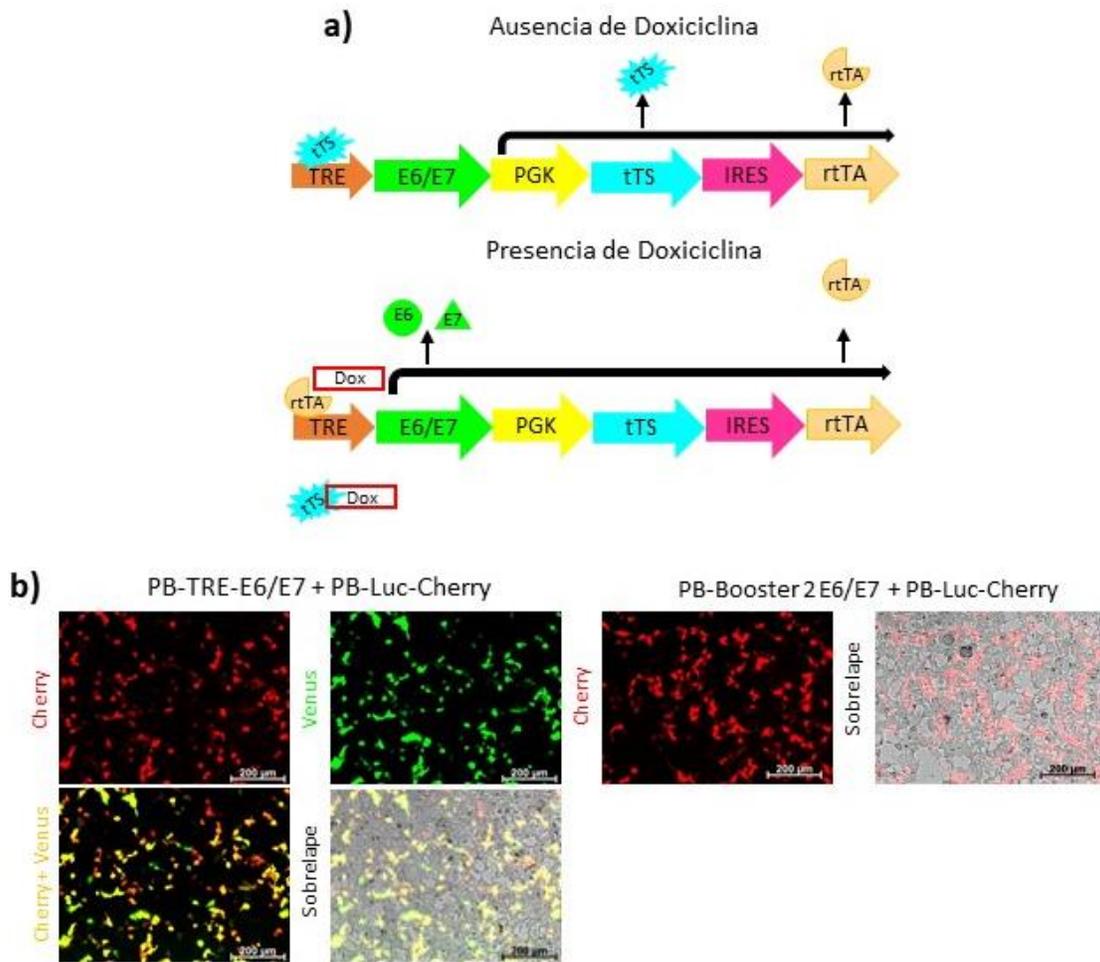
## Resultados

*El represor transcripcional tTS disminuye la expresión fuga de E6/E7.*

En nuestro sistema Tet-On de expresión inducible PB-TRE-E6/E7, la proteína Venus y el transactivador rtTA se expresan constitutivamente. En ausencia de doxiciclina (Dox) no hay expresión de los oncogenes. En presencia de Dox, se forma un complejo Dox-rtTA que se une al promotor TRE para inducir la expresión de E6 y E7. Una desventaja de este sistema es la expresión fuga de los oncogenes en ausencia de doxiciclina en las células troncales embrionarias W9.5 (ESC), lo que posiblemente impide la formación de ratones quiméricos utilizando estas ESC transfectadas establemente con el sistema PB-TRE-E6/E7 (López-Hernández, 2018).

Una estrategia para evitar la expresión fuga en el sistema Tet-On es añadir el represor transcripcional (tTS) que disminuye la actividad residual del promotor TRE (Sun *et al.*, 2007). Para mejorar nuestro sistema PB-TRE-E6/E7, se creó un vector que incluyera el elemento represor tTS. Brevemente, la secuencia tTS se clonó por PCR y se intercambió por la secuencia NeoR del plásmido PB-E6/E7-NeoR. Este nuevo vector se denominó PB-Booster 2 E6/E7. Sin doxiciclina el represor tTS se une al promotor TRE para evitar la expresión fuga de E6/E7. Al agregar doxiciclina se forman los complejos tTS-Dox y rtTA-Dox, mientras que el primero se libera de la secuencia TRE, el rtTA-Dox se une al promotor e induce la expresión de E6 y E7 (Fig 4a).

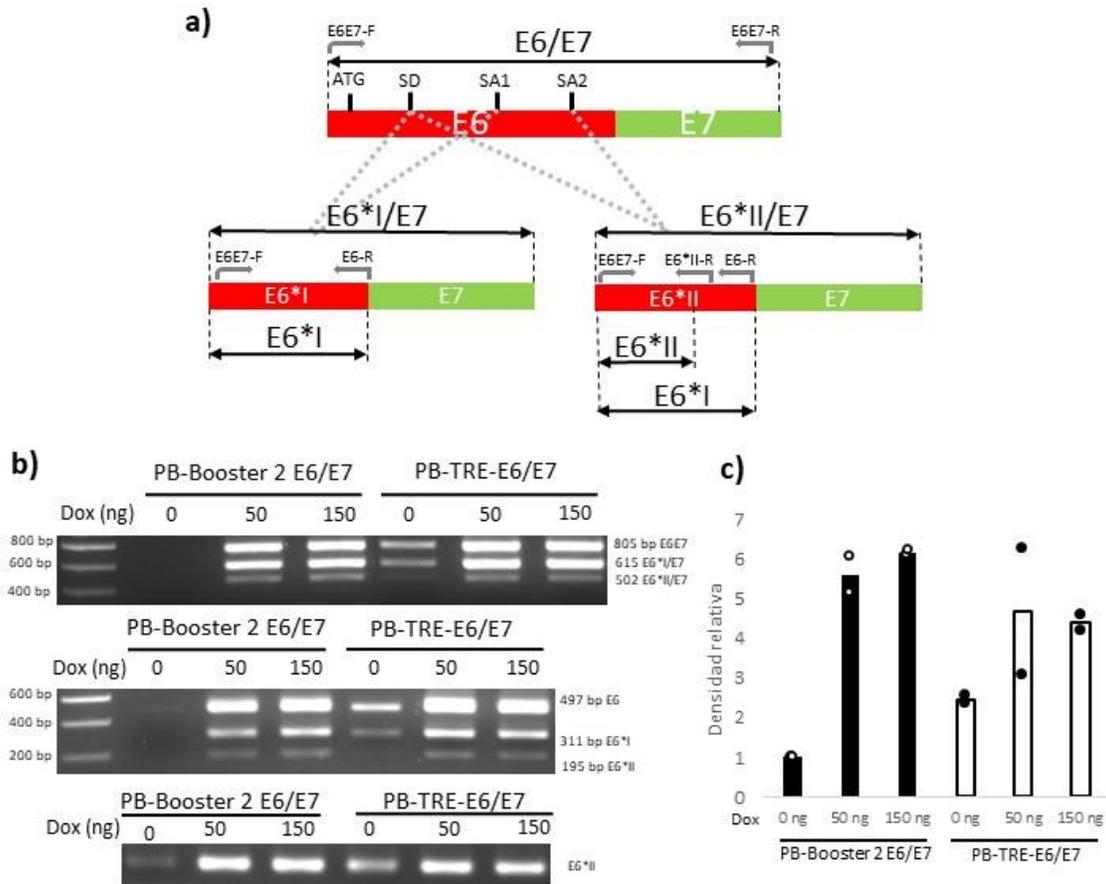
Para probar que el represor tTS inhibe la expresión fuga en el nuevo vector PB-Booster 2 E6/E7, se evaluó la expresión de E6 y E7 en células HEK293. Debido a que este sistema no contiene proteína reportera, se transfectó con el vector PB-Luc-Cherry, el cual expresa la proteína fluorescente Cherry, para evaluar la eficiencia de transfección. Las transfecciones PB-Booster 2 E6/E7 + PB-Luc-Cherry y PB-TRE-E6/E7 + PB-Luc-Cherry mostraron cualitativamente una eficiencia de transfección similar (Fig. 4b). Además, se observa un alto solapamiento de Venus y Cherry, lo que indica que la transfección de ambos vectores fue eficiente.



**Fig. 4 | En represor transcripcional tTS inhibe la expresión residual de E6 y E7 en el vector PB-Booster 2 E6/E7. a)** En el sistema de expresión inducible PB-Booster 2 E6/E7, el represor tTS se une al promotor TRE e inhibe la expresión fuga de E6/E7. Cuando se añade doxíciclina se induce la activación transcripcional de los oncogenes. **b)** Transfección de los vectores PB-Booster 2 E6/E7 o PB-TRE-E6/E7 con PB-Luc-Cherry en células HEK293.

El gen de E6 tiene un sitio donador (SD) y dos sitios aceptores de splicing (SA1 y SA2). Si ocurre un evento de splicing entre el SD y el SA1 se produce un transcrito denominado E6\*I ( $\approx 311$  bp), que en unión con E7 forman el transcrito E6\*I/E7 ( $\approx 615$  bp). Si se une el SD y SA2 se produce un transcrito de  $\approx 195$  bp (E&\*II), el cual forma el transcrito E6\*II/E7 ( $\approx 502$  bp) en unión con E7 (Escalante-Alcalde *et al.*, 2000). Se diseñaron oligonucleótidos que se unen al extremo 5' de E6 (E6/E7-F) y 3' de E7 (E6/E7-R) para medir el nivel del transcrito sin procesar E6/E7 y sus transcritos derivados del splicing E6\*I/E7 y E6\*II/E7 (Fig. 5a). Asimismo, se diseñaron oligonucleótidos que se pegaron en los sitios de splicing (E6-R y

E6\*II) para detectar solamente los transcritos de E6. Utilizando este diseño se puede evaluar el nivel de expresión de los oncogenes y sus transcritos.



**Fig. 5 | Expresión de los oncogenes E6/E7 y sus transcritos fue disminuida por el represor tTS. a)** El gen de E6 contiene un sitio donador de splicing (SD) y dos sitios aceptores (SA1 y SA2), lo que provoca que se generen distintos transcritos de E6: E6 no procesada, E6\*I y E6\*II. En la expresión de E6 y E7 se produce un transcrito bicistrónico, el cual puede ser de diferentes tamaños debido al proceso de splicing de E6: E6/E7 no procesado, E6\*I/E7 y E6\*II /E7. Se diseñaron oligonucleótidos (E6E7-F, E6/E7-R, E6-R y E6\*II-R) para medir la expresión de los transcritos generados. **b)** La expresión residual de los transcritos E6/E7, E6 y E6\*II es menor en el sistema PB-Booster 2 E6/E7. **c)** Análisis de la densidad relativa de las bandas de E6\*II (datos de dos réplicas biológicas independientes).

Las células transfectadas se trataron con tres condiciones: 0, 50 y 150 ng/ml de Dox por 24 hr. Se extrajo el RNA y se evaluó mediante RT-PCR la expresión del transgén E6/E7 y los diferentes transcritos producidos por splicing alternativo de la secuencia de E6 (Fig. 5a). En presencia de doxiciclina (50 y 150 ng/ml) no hubo diferencias entre los sistemas PB-Booster 2 E6/E7 y PB-TRE-E6/E7 en el nivel de expresión de los principales transcritos de los

oncogenes E6/E7: E6/E7 no procesado (805 bp), E6\*I/E7 (615 bp) y E6\*II/E7 (502 bp) (Fig. 5b). Para el caso del transgén E6, también se observaron los principales transcritos en ambos sistemas de expresión: E6 no procesado (497 bp), E6\*I (311 bp) y E6\*II (195 bp) (Fig. 5b). De acuerdo con lo esperado, se observa expresión residual de E6/E7 en el sistema PB-TRE-E6/E7 bajo la condición sin inducción. No obstante, en el caso del sistema PB-Booster 2 E6/E7 esta expresión fuga se evita completamente.

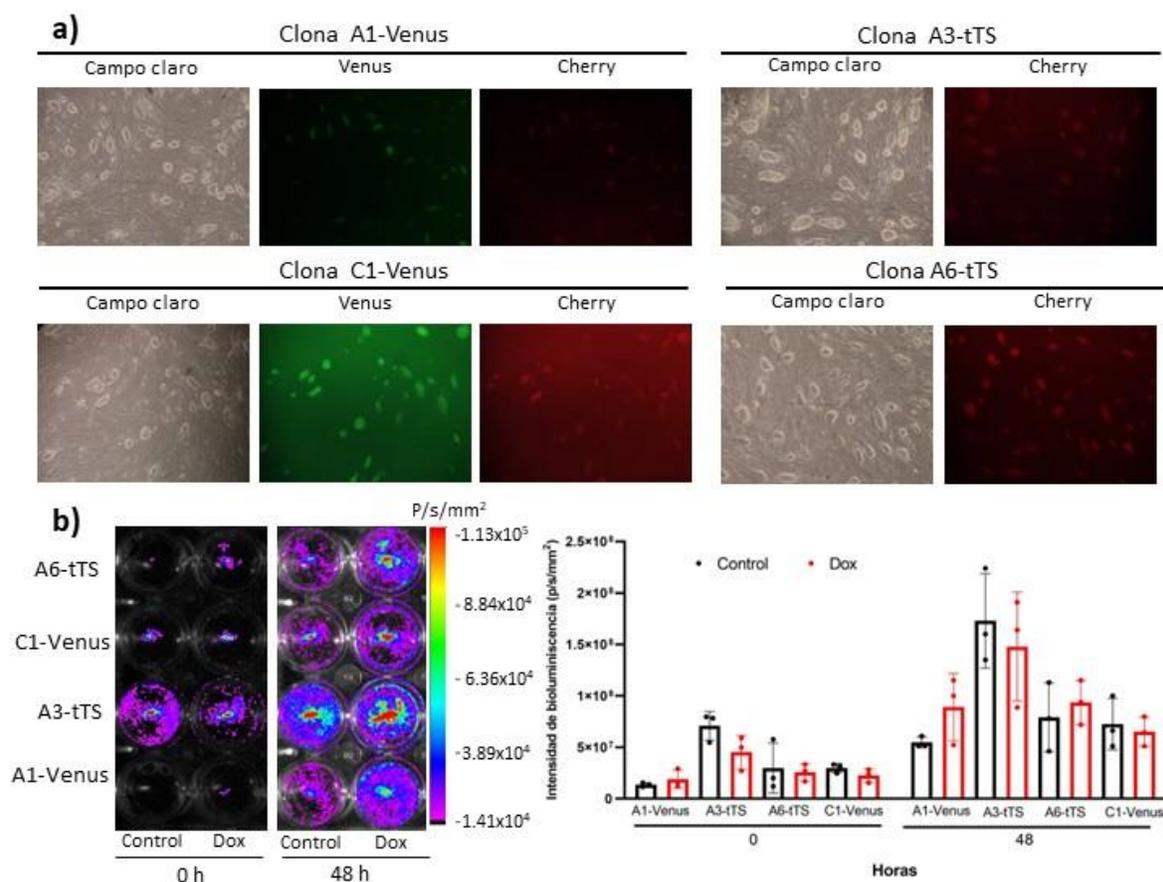
Finalmente, realizando un análisis semicuantitativo de la densidad relativa de las bandas de los productos de PCR de E6\*II (Fig. 5c), se puede observar que la expresión fuga en el vector PB-TRE-E6/E7 es mayor que en el PB-Booster 2 E6/E7. De acuerdo con lo esperado, la expresión fuga del transgén E6/E7 disminuyó significativamente en presencia del represor transcripcional tTS del vector PB-Booster 2 E6/E7. En resumen, el represor tTS inhibe la expresión fuga de los oncogenes en células HEK293.

*Las clonas de células troncales embrionarias que expresan E6 y E7 tienen mayor capacidad proliferativa.*

Para cumplir con el siguiente objetivo planteado, se transfectaron los plásmidos PB-Booster 2 E6/E7 o PB-TRE-E6/E7 y PB-Luc-Cherry en células troncales embrionarias W9.5. En total se aislaron 39 clonas con el transposón PB-Booster 2 E6/E7 (Ver Tabla 1 en Apéndice), de las cuales se seleccionaron al azar las clonas A3 y A6 y se denominaron, por simplicidad, A3-tTS y A6-tTS debido a que expresan el represor transcripcional tTS (Fig. 6a). Por otra parte, se aislaron 37 clonas que contenían el sistema PB-TRE-E6/E7 de las que se seleccionaron la A1 y C1 (denominadas A1-Venus y C1-Venus por su expresión de la proteína Venus).

Como parte de la caracterización de las ESC, se evaluó la bioluminiscencia debido a que las células también fueron transfectadas con el vector PB-Luc-Cherry que expresa constitutivamente la proteína luciferasa. Para ello se sembraron 40,000 células, se añadió doxiciclina y se dejaron proliferar por 48 h. A la hora 0, definida como una hora después del cultivo de las células, se pudo observar que la clona A3-tTS tuvo la mayor intensidad de bioluminiscencia (p/s/mm<sup>2</sup>), mientras que las clonas A6-tTS, A1-Venus y C1-Venus tuvieron una intensidad similar (Fig. 6b). A las 48 horas de crecimiento con y sin doxiciclina, la clona A3-tTS mantuvo la mayor intensidad, mientras que para las clonas A6-tTS, A1-Venus y C1-

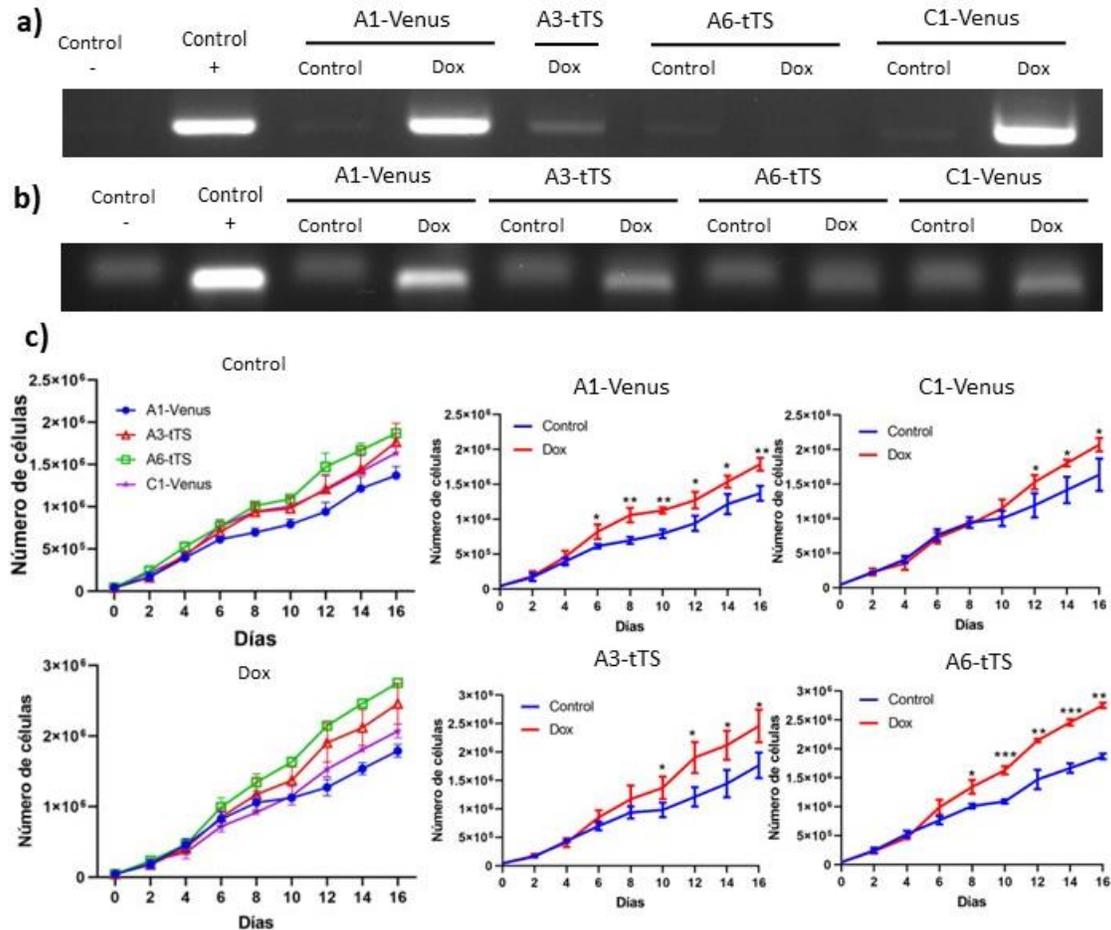
Venus el nivel fue similar entre ellas. En todas las clonas, el nivel de bioluminiscencia fue mayor a las 48 horas porque se incrementó el número de células. Sin embargo, no hubo diferencias en el nivel de intensidad de bioluminiscencia entre las condiciones control y con doxiciclina (Fig. 6c).



**Fig. 6 | Caracterización de las clonas de clonas troncales embrionarias A3-tTS, A6-tTS, A1-Venus y C1-Venus. a)** Las clonas A1-Venus y C1-Venus expresan las proteínas reporteras Venus y Cherry, mientras que las clonas A3-tTS y A6-tTS muestran señal de Cherry. Las clonas estuvieron constituidas de colonias compactas y con bordes bien definidos. **b)** Bioluminiscencia de las clonas una hora después de sembrado (0 h) y 48 h después de crecimiento con y sin doxiciclina (1.5 mg/ml). No se encontraron diferencias significativas entre las condiciones control y con doxiciclina. Se realizaron tres experimentos independientes.

Para comprobar que los sistemas de expresión inducible son funcionales en las células ESC, se indujo la expresión de E6/E7 con doxiciclina (1.5 µg por ml de medio) durante 24 h y se evaluó el nivel de expresión del transcrito E6\*II por RT-PCR (Fig. 7a). A las 24 h se observa que en condiciones sin inducción (control) las clonas A1-Venus y C1-Venus tienen bajo nivel de expresión basal de E6\*II (Fig. 7a). Con doxiciclina, se observa una gran

inducción del oncogen en estas clonas, lo cual indica que el sistema PB-TRE-E6/E7 es funcional en las células W9.5, como se ha demostrado previamente (López-Hernández, 2018).



**Fig. 7 | La expresión de los oncogenes E6/E7 aumenta la proliferación de las células troncales embrionicas.** Expresión del transcrito E6\*II en las clonas de ESC a las **a)** 24 y **b)** 48 h de inducción con Dox. Como control positivo se utilizó cDNA de un experimento de las células HEK293 transfectadas e inducidas con doxiciclina. **c)** Curvas de proliferación celular sin (Control) y con doxiciclina (Dox) de las clonas A3-tTS, A6-tTS, A1-Venus y C1-Venus a largo de 16 días de crecimiento. Se realizaron tres réplicas biológicas. Las diferencias se evaluaron con una de prueba T no pareada de dos vías ( $P < *0.5$ ,  $**0.001$ ,  $***0.0001$ ).

Por otra parte, las clonas A3-tTS y A6-tTS tienen un bajo nivel de expresión basal de E6\*II sin doxiciclina. Al añadir doxiciclina, la A3-tTS expresa E6\*II, pero el nivel de inducción es menor comparado con las ESC que expresan Venus. Contrario a lo esperado, la clona A6-tTS no respondió al tratamiento con Dox. Esto podría indicar que el sistema PB-Booster 2 E6/E7 requiere mayores tiempos de inducción o mayor concentración de doxiciclina para

inducir la expresión de los oncogenes. En nuestro laboratorio se ha encontrado que el nivel máximo de expresión de genes (ej. *Myc*, *Sox2*, *Dll1*) utilizando la plataforma PB-Booster se induce con 1.5 µg de Dox (Martínez-Sarmiento, 2016; Mójica, 2018), por lo que no probamos aumentar la concentración de doxiciclina. Se esperaba que al aumentar el tiempo de inducción se lograría inducir la expresión de los oncogenes E6 y E7. Por lo tanto, se evaluó el nivel de expresión de E6\*II a las 48 h de inducción con Dox (Fig. 7b). No obstante, a las 48 h de inducción el nivel de expresión de E6\*II fue bajo en la clona A3-tTS y la clona A6-tTS no expresó los oncogenes.

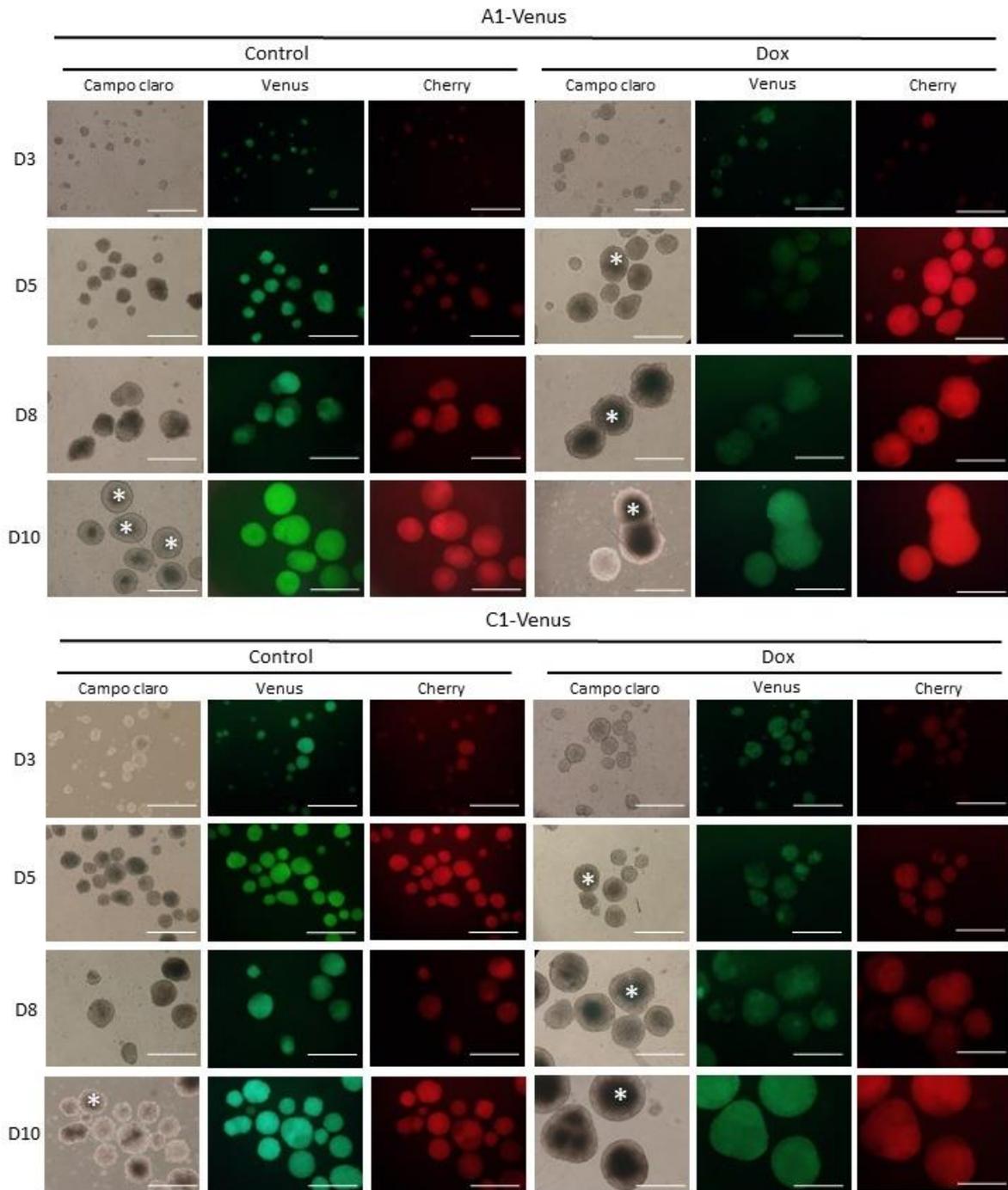
Una vez comparada la expresión de los oncogenes E6 y E7 en las clonas, se evaluó si existía un efecto oncogénico en las ESC mediante un estudio de proliferación. Para esto, se sembraron 40,000 ESC sobre células alimentadoras, se incubaron por 48 h con doxiciclina y se realizó el subcultivo celular en un nuevo pozo de placa de 24. El cultivo se realizó por 16 días y se graficó el número acumulativo de células a lo largo del tiempo (Fig. 7c). En condiciones sin doxiciclina, las clonas parecen tener diferencias en su capacidad proliferativa: la clona A6-tTS parece tener la mayor proliferación, mientras que la A1-Venus tiene la menor. Las cuatro clonas proliferaron más al inducirse la expresión de los oncogenes E6/E7 con doxiciclina. Para la clona A1-Venus esta diferencia se hizo evidente a partir del día 6 (P=0.03) y hasta el día 16 (día 8, P=0.005; día 10, P=0.001; día 12, P= 0.023; día 14, P=0.029; día 16, P=0.006). Fue hasta el día 12 (P=0.046; día 14, P=0.026; día 16, P=0.041) que la clona C1-Venus mostró diferencias en su proliferación al inducir los oncogenes con Dox.

De acuerdo con la necesidad de mayores tiempos de inducción de los oncogenes en las células que contienen el represor transcripcional tTS (Fig. 7c), la clona A3-tTS tuvo una diferencia significativa en su proliferación con Dox al día 10 (P=0.045; día 12, P=0.203; día 14, P=0.028; día 16, P=0.03), mientras el efecto oncogénico por la inducción de los oncogenes E6/E7 en la clona A6-tTS provocó una diferencia en la proliferación a partir del día 8 (P=0.01; día 10, P= 0.0003; día 12, P=0.0002; día 14, P=0.002; día 16, P=0.002).

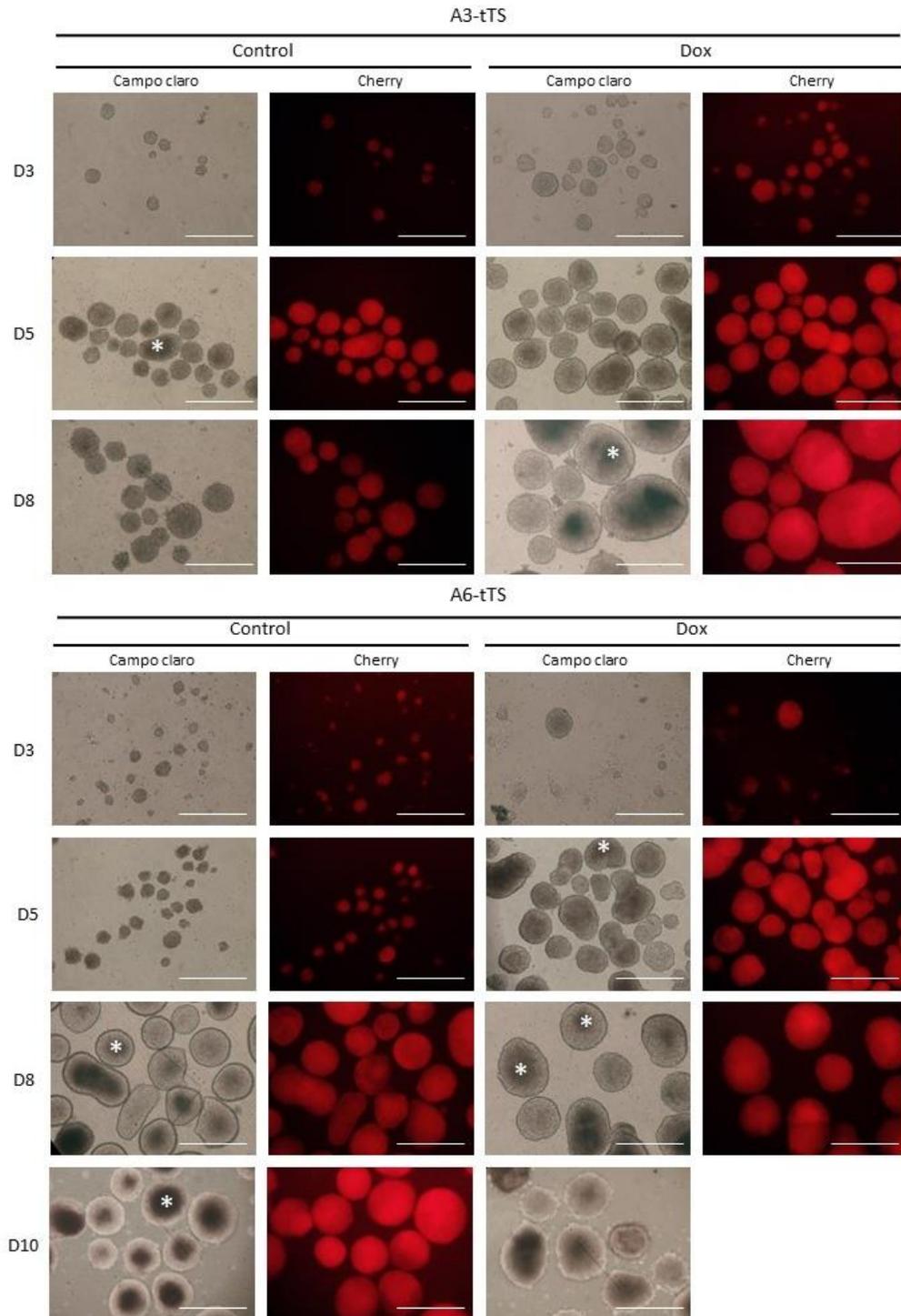
*Los cuerpos embrioides que expresan E6 y E7 tienen un mayor tamaño y no presentan alteraciones en la expresión de genes de diferenciación.*

Las células troncales embrionarias, cuando se cultivan en suspensión, se auto-organizan en agregados tridimensionales llamados cuerpos embrioides (EB). Los EB están constituidos por células que se especifican y diferencian a los tres linajes germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo. Por lo tanto, los cuerpos embrioides constituyen un modelo *in vitro* que podría arrojar ideas de los efectos de la expresión de los oncogenes E6/E7 en células diferenciadas, dando una preconcepción de lo que su inducción podría tener en los tejidos del teratoma *in vivo*. Además, partiendo del hecho que los oncogenes indujeron un aumento en la proliferación de las ESC, el efecto que podrían tener sobre las células diferenciadas del EB es interesante de evaluar.

Se realizaron dos réplicas biológicas de formación de cuerpos embrioides a partir de las clonas aisladas. Además, se indujo la sobreexpresión de los oncogenes E6/E7 con doxiciclina durante todo el protocolo de diferenciación. Los EB A1-Venus y C1-Venus expresaron las proteínas reporteras Venus y Cherry (Fig. 8). Los EB A3-tTS y A6-tTS fueron positivos a Cherry (Fig. 9). Los cuerpos embrioides tratados con doxiciclina para inducir la expresión de los oncogenes E6/E7 se desarrollaron normalmente y presentaron un mayor tamaño (ver más adelante). A nivel morfológico, los cuerpos embrioides empezaron a cavitarse a partir del tercer día de diferenciación y fue más evidente al final de cultivo donde se observó la cavitación completa (Fig. 8 y 9). Para obtener más detalles de la composición celular de los cuerpos embrioides, se realizaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina al día 10 de diferenciación (Fig. 10b). Se observa que la cavitación se llevó a cabo normalmente en los EB de las cuatro clonas en ambas condiciones (control, Dox). Además, se observó el epitelio cuboidal que recubre al EB. En resumen, los EB se desarrollan normalmente y la administración de doxiciclina no altera la diferenciación.

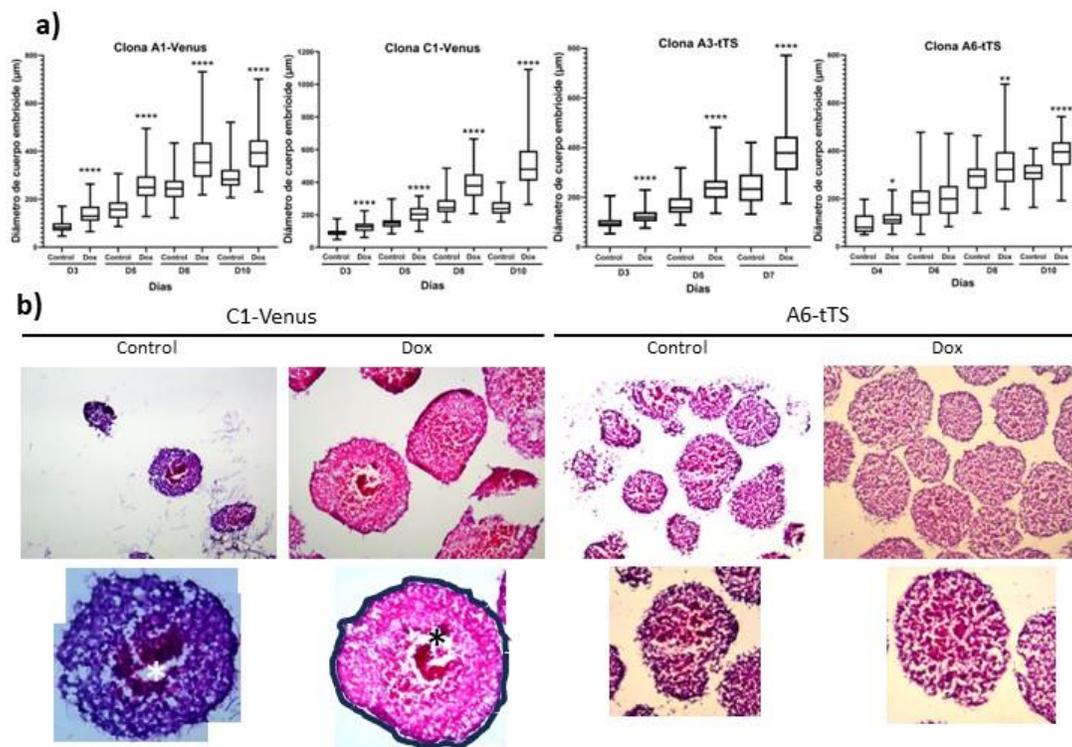


**Fig. 8 | Los cuerpos embrioides derivados de las clonas A1-Venus y C1-Venus tratados con doxiciclina se desarrollaron normalmente.** Los cuerpos embrioides presentaron cavitación normal en el centro (observado como una zona más densa ópticamente, señalado con \*) y un epitelio cuboidal que lo recubre (observado en la parte más externa como un contorno denso), lo que indica una adecuada diferenciación. Se observa la expresión constitutiva de Venus y Cherry. La escala corresponde a 100 µm. Las fotografías son representativas de las dos réplicas biológicas realizadas.



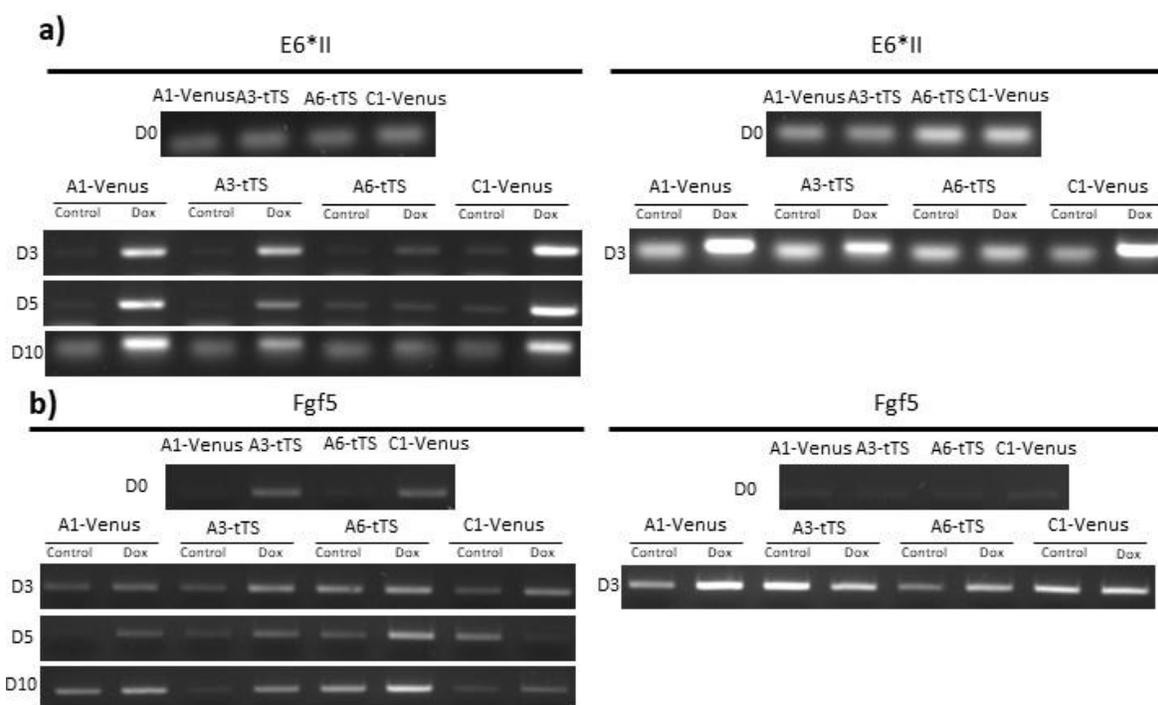
**Fig. 9 | Los cuerpos embrioides derivados de las clonas A3-tTS y A6-tTS tratados con doxiciclina se desarrollaron normalmente.** Los cuerpos embrioides presentaron cavitación normal en el centro (observado como una zona más densa ópticamente, señalado con \*) y un epitelio cuboidal que lo recubre (observado en la parte más externa como un contorno denso), lo que indica una adecuada diferenciación. Se observa la expresión constitutiva de Cherry. La escala corresponde a 100  $\mu$ m. Las fotografías son representativas de las dos réplicas biológicas realizadas.

Interesantemente, los EB que expresaron los oncogenes E6/E7 (Dox) mostraron un mayor tamaño (Fig. 10a). Para determinar si esta diferencia era significativa con respecto al experimento control, se midió el diámetro de los cuerpos embrioides y se compararon entre ambas condiciones. Los EB A1-Venus tratados con Dox tuvieron un mayor crecimiento desde el día 3 ( $P < 0.0001$ ) hasta el día 10 ( $P < 0.0001$ ). Los cuerpos embrioides C1-Venus también tuvieron un mayor crecimiento en el tratamiento con doxiciclina, que fue significativo desde el día 3 ( $P < 0.0001$ ). Para el caso de la clona A3-tTS que expresa el represor transcripcional tTS, la administración de Dox también aumentó el tamaño de los cuerpos embrioides ( $P < 0.0001$ ) desde el tercer día de cultivo. Finalmente, para el caso de la clona A6-tTS esta diferencia es significativa ( $P < 0.0001$ ) a lo largo del proceso de formación y diferenciación de los cuerpos embrioides.



**Fig. 10 | Los cuerpos embrioides tratados con doxiciclina tuvieron un mayor tamaño, pero no presentaron alteraciones en la diferenciación. a)** Los cuerpos embrioides A1-Venus, A3-tTS, A6-tTS y C1-Venus tratados con doxiciclina tuvieron un mayor tamaño. Se analizaron 80 cuerpos embrioides de cada condición (Dox, control) de las dos réplicas biológicas realizadas. Se realizó una prueba no paramétrica U de Mann Whitney ( $P < *0.5$ ,  $**0.001$ ,  $***0.0001$ ). **b)** Los cuerpos embrioides mostraron un desarrollo normal al observarse la cavitación en el centro (señalado con \*) y un epitelio cuboidal exterior (marcado con un contorno negro). Tinción de hematoxilina y eosina de los cuerpos embrioides al día 10 de diferenciación (Objetivo 20x).

El aumento en el tamaño del cuerpo embriode podría indicar que los oncogenes E6/E7 produjeron un aumento en la proliferación de las células, similar a lo observado en las ESC. Para saber si se induce la expresión de E6/E7 en las células diferenciadas que constituyen el cuerpo embriode, se realizó un RT-PCR contra E6\*II (Fig. 11a). La expresión de E6\*II al día 0 de formación, que corresponde a células troncales embriónicas mantenidas sin células alimentadoras y sin doxiciclina, es nula. A partir del día 3 y hasta el día 10 de formación, los cuerpos embriodes expresan los oncogenes E6/E7. Particularmente, las clonas A1-Venus y C1-Venus tienen una mayor expresión del transcrito de E6 que las clonas A3-tTS, similar a lo observado con la ESC. Mientras que la clona A6-tTS parece no responder a la inducción de E6\*II con doxiciclina (Fig. 11a), tal como sucedió en las ESC (Fig. 7b).



**Fig. 11 | Expresión genética de cuerpos embriodes.** a) Las clonas A1-Venus, A3-tTs y C1-Venus mantienen la expresión del transcrito E6\*II al día 0, 3, 5 y 10 de diferenciación de los cuerpos embriodes. Las imágenes corresponden a las dos réplicas biológicas realizadas (columna izquierda y derecha). b) El marcador de ectodermo Fgf5 se expresa relativamente más en los cuerpos embriodes tratados con doxiciclina.

La diferenciación y la proliferación muestran una relación inversa. Las células indiferenciadas proliferan antes de adquirir un fenotipo completamente diferenciado, mientras que la diferenciación requiere la salida del ciclo celular (Padgett & Santos, 2020).

Los cuerpos embrioides están compuestos de células comprometidas hacia linajes de las tres capas germinales. Como la expresión de E6/E7 induce el aumento del tamaño del EB posiblemente debido a la inducción de la proliferación celular, se esperaría que los EB que expresan los oncogenes muestren una disminución en la diferenciación. Para evaluar lo anterior, se midió la expresión del marcador de diferenciación Fgf5, un marcador de ectodermo. Los EB de las cuatro clonas mostraron expresión de Fgf5 en condiciones normales, lo que coincide con otros estudios (Sheridan *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2016). Al administrar doxiciclina, la expresión de Fgf5 también se induce (Fig. 11b). Así, la presencia de oncogenes no parece alterar la diferenciación de los cuerpos embrioides, no obstante, es necesario evaluar el nivel de expresión de otros marcadores de diferenciación.

#### *Formación de teratomas a partir de células troncales embriónicas A1-Venus y C1-Venus.*

A raíz de que las clonas A1-Venus y C1-Venus expresaron consistentemente los oncogenes E6/E7 en las ESC y en los cuerpos embrioides, produciendo un aumento en la proliferación celular y en el tamaño en los EB, se decidió utilizar estas clonas para inducir la formación de teratomas en ratones inmunodeficientes NOD-SCID.

Se realizaron ensayos de formación de teratoma con  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  y  $3 \times 10^6$  células trasplantadas subcutáneamente de la piel dorsal en el extremo inferior y superior en ratonas hembras. Para determinar el efecto de la sobreexpresión de los oncogenes se administró doxiciclina (2 mg/mL) *ad libitum* en agua de beber a los ratones.

Para el caso de la clona C1-Venus trasplantado en ratonas hembras NOD-SCID, los tumores se desarrollaron adecuadamente en los grupos trasplantados con  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  y  $3 \times 10^6$  ESC (Ver Tabla 1). De manera general, parece que el grupo con doxiciclina tuvo un menor tamaño que el grupo control. El grupo de  $3 \times 10^6$  ESC con Dox fue palpable, pero no se pudo medir porque tenía un tamaño muy pequeño (Fig. 12 y Tabla 1). Interesantemente, los tumores desarrollados en la parte superior del dorso tuvieron un mayor crecimiento con respecto a sus contrapartes inferiores (Fig. 12a). En los cortes histológicos se pudo observar que los teratomas desarrollaron tejidos de las tres capas germinales, como músculo,

epitelio simple cuboidal, epitelio estratificado, estroma, entre otros (Fig. 12b). Esto indica que los tumores se desarrollaron según lo reportado (Gordeeva & Nikonova, 2013).

La clona A1-Venus no desarrolló tumores adecuadamente en los ratones hembra NOD-SCID en los grupos control y con doxiciclina (Tabla 2). Solo en el caso de los trasplantes de  $3 \times 10^6$  células troncales embrionicas se formaron tumores de 3 y 4 mm<sup>3</sup>. Esto indica que la clona A1-Venus tiene baja capacidad tumorigénica. A pesar de lo anterior, estos teratomas formaron tejido muscular estriado, epitelio simple columnar y epitelio estratificado (Fig. 12b).

Finalmente, se trasplantaron  $1 \times 10^6$  células de la clona A1-Venus y  $3 \times 10^6$  células de la clona C1-Venus en ratones macho inmunodeficientes para medir la bioluminiscencia *in vivo* debido a que las ESC presentan integrado un sistema de expresión que contiene la enzima luciferasa. La clona C1-Venus formó tumores (Tabla 3), los cuales emitieron bioluminiscencia al inyectar el sustrato luciferina (Fig. 12c). Del mismo modo a lo que sucedió en las ratonas hembra, los tumores desarrollados con doxiciclina parecen tener menor tamaño. La clona A1-Venus no formó teratomas en los ratones control y con doxiciclina, lo que además se pudo evidenciar en su nula emisión de bioluminiscencia. Esto corrobora que la clona A1-Venus tienen baja capacidad tumorigénica.

Tabla 1 | Tamaño final de teratomas desarrollados de clona C1-Venus en ratones NOD-SCID hembras.

Clona de ESC	C1-Venus					
	1x10 <sup>6</sup>		2x10 <sup>6</sup>		3x10 <sup>6</sup>	
Grupo	Control	Dox	Control	Dox	Control	Dox
Flanco superior	806 mm <sup>3</sup>	864 mm <sup>3</sup>	691 mm <sup>3</sup>	86 mm <sup>3</sup>	1014 mm <sup>3</sup>	215 mm <sup>3</sup>
Flanco inferior	144 mm <sup>3</sup>	172 mm <sup>3</sup>	215 mm <sup>3</sup>	50 mm <sup>3</sup>	176 mm <sup>3</sup>	Palpable

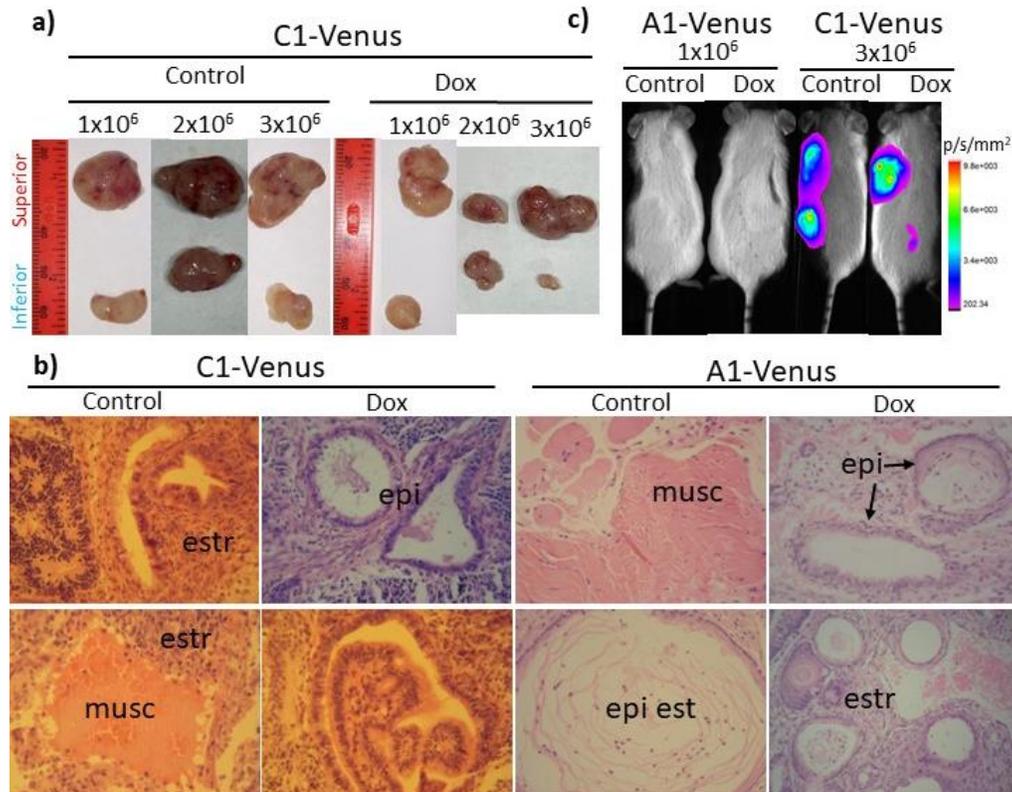
Tabla 2 | Tamaño final de teratomas desarrollados de la clona A1-Venus en ratones NOD-SCID hembras.

Clona de ESC	A1-Venus					
	1x10 <sup>6</sup>		2x10 <sup>6</sup>		3x10 <sup>6</sup>	
Grupo	Control	Dox	Control	Dox	Control	Dox

Flanco superior	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>	4 mm <sup>3</sup>	3 mm <sup>3</sup>
Flanco inferior	0 mm <sup>3</sup>					

Tabla 3 | Tamaño final de teratomas en ratones NOD-SCID machos.

Clona de ESC	A1-Venus		C1-Venus	
# de células	1x10 <sup>6</sup>		3x10 <sup>6</sup>	
Grupo	Control	Dox	Control	Dox
Flanco superior	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>	281 mm <sup>3</sup>	70 mm <sup>3</sup>
Flanco inferior	0 mm <sup>3</sup>	0 mm <sup>3</sup>	204 mm <sup>3</sup>	4 mm <sup>3</sup>



**Fig. 12 | Formación de teratomas derivados de la clona C1-Venus y A1-Venus.** a) Los teratomas formados en la parte superior de ratonas hembra NOD-SCID tuvieron un mayor crecimiento que los desarrollados en la parte inferior. b) Tejidos formados de los teratomas C1-Venus y A1-Venus donde se observa tejido muscular (*musc*), epitelios estratificados (*epi est*) y simple columnar (*epi*), estroma (*estr*). Las fotos fueron capturadas usando un objetivo 40x. c) Bioluminiscencia *in vivo* de los teratomas formados en ratones macho NOD-SCID por la clona C1-Venus, donde también se observa que la clona A1-Venus no desarrolló tumores.

## Discusión

*La disminución de la expresión fuga de E6 y E7 por el represor transcripcional tTS es dependiente del tipo celular.*

El vector PB-Booster contiene un sistema de expresión inducible por doxiciclina (Tet-On) rodeado por secuencias del transposón PiggyBac. Este sistema está constituido por: a) las secuencias 5'ITR y 3'ITR que son reconocidas por la transposasa para insertar el sistema de expresión Tet-On en el genoma celular; b) el promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK) que controla la expresión constitutiva de la proteína reportera Venus y el transactivador reverso de tetraciclina (rtTA) unidos por un elemento IRES; c) y el promotor mínimo de respuesta a tetraciclina (TRE) que permite la expresión inducible de los genes de interés que se localicen río abajo. En nuestro laboratorio se han insertado diferentes genes en este sistema de expresión, como los genes reprogramadores (*Myc*, *Sox2*, *Klf4*, *Oct4*) (Martínez-Sarmiento, 2016), el receptor de la vía de señalización Notch Delta-like 1 (*Dll1*) (Mójica, 2018) y los oncogenes E6 y E7 (López-Hernández, 2018).

En nuestro vector PB-Booster, las secuencias del promotor TRE y el transactivador rtTA se han optimizado para disminuir la expresión residual en ausencia de doxiciclina y para activar fuerte y rápidamente la transcripción con Dox (Zuber *et al.*, 2011). No obstante, el vector PB-TRE-E6/E7 presenta expresión fuga de los oncogenes E6/E7 en células HEK293 (Fig. 5a y b) y en células troncales embrionarias W9.5 (López-Hernández, 2018). Debido a que la expresión de oncogenes humanos durante el desarrollo embrionario causa desordenes congénitos o produce inviabilidad (Castel *et al.*, 2020), posiblemente la inviabilidad de los ratones quiméricos producidos a partir estas células troncales (W9.5 E6/E7) se debió a la expresión fuga de las oncoproteínas E6 y E7 (López-Hernández, 2018).

La combinación del sistema Tet-On con el represor transcripcional tTS disminuyen la la expresión fuga (Welman *et al.*, 2007). Para evitar la expresión residual del sistema Tet-On del vector PB-TRE-E6/E7 se reemplazó la proteína Venus por el represor transcripcional tTS, creando un nuevo sistema denominado PB-Booster 2 E6/E7 (Fig. 4a). Mediante RT-PCR contra los transcritos E6/E7 y E6 se confirmó que el represor tTS inhibe la activación transcripcional residual de los oncogenes en células HEK293 bajo condiciones sin doxiciclina.

Además, la expresión con 50 y 150 ng/ml de Dox fue similar al vector PB-TRE-E6/E7, confirmando que la inducción del sistema Tet-On no se alteró por el represor tTS (Fig. 5b, c). Esto concuerda con que el represor tTS inhibe la expresión residual del sistema Tet-On y reprime la actividad de promotores celulares (ej. CAG, UbiC, EF-1 $\alpha$ , mPGK) con secuencias tetO adyacentes en diferentes líneas celulares (ej. HEK 293) (Freundlieb *et al.*, 1999; Szulc *et al.*, 2006).

La expresión de los oncogenes E6/E7 a partir del vector PB-TRE-E6/E7 en células troncales embrionarias W9.5 se indujo a partir de las 24 y 48 h con doxiciclina (Fig. 7a, b), lo cual concuerda con trabajos anteriores del laboratorio (López-Hernández, 2018). No obstante, la expresión de los oncogenes en el vector PB-Booster 2 E6/E7 no se indujo adecuadamente en las clonas ESC A3-tTS y A6-tTS durante estos dos períodos de tiempo. Existen varias explicaciones para lo observado: 1) el transposón PiggyBack se insertó en sitios que restringen la activación transcripcional; 2) la expresión del sistema Tet-On se inhibió por silenciamiento epigenético inherente; 3) el represor tTS indujo irreversiblemente el silenciamiento transcripcional del sistema de expresión.

El transposón PiggyBac (PB) es un elemento trasponible que se inserta en secuencias TTAA del genoma de mamíferos mediante la actividad de su transposasa, por lo que ha sido empleado como una herramienta genética para introducir elementos genéticos en el genoma (Huang *et al.*, 2010). El nivel de expresión de los transgenes integrados por el sistema PB depende del sitio de inserción en el genoma. Por ejemplo, existen sitios de inserción que provocan baja expresión de un transgén, los cuales coinciden con dominios caracterizados por su baja actividad transcripcional y alta compartimentalización de la cromatina. También existen sitios de inserción en segmentos activos transcripcionalmente que permiten una alta expresión del transgén (Akhtar *et al.*, 2013). Se podría esperar que el transposón PB-Booster 2 E6/E7 se insertó en sitios no permisivos para la actividad transcripcional del activador rtTA, lo que inhibió la inducción de los oncogenes E6/E7 en las clonas A3-tTS y A6-tTS. No obstante, debido a que se producen varias inserciones por célula (6 inserciones en linfocitos T, Huang *et al.*, 2010; 23 inserciones en ESC, Akhtar *et al.*, 2013), se esperaría que, por probabilidad, el sistema Tet-On conteniendo los oncogenes se insertó

en diferentes sitios que permitieran la inducción transcripcional. Además, el promotor que dirige la expresión del transgén también influye en su nivel de expresión. Mientras que el promotor PGK es inhibido en sitios de inserción no permisivos transcripcionalmente, el promotor TRE puede tener actividad transcripcional en estos sitios en condiciones de inducción (Akhtar *et al.*, 2013). Así, el promotor TRE podría ser activado adecuadamente a pesar de insertarse en sitios genómicos con baja actividad transcripcional. En resumen, el sitio de inserción del transposón debió tener poca influencia en la inhibición de la expresión de E6 y E7 en las ESC A3-tTS y A6-tTS.

Se ha reportado que los sistemas de expresión Tet-On son silenciados epigenéticamente en una gran variedad de células (Welman *et al.*, 2007). Específicamente en células troncales embrionarias, la disminución de la expresión del gen de interés *in vitro* se produce al cultivar por largos períodos y al inducir la diferenciación de las ESC. Además, en diferentes tejidos de ratones transgénicos derivados de las ESC la expresión del gen de interés también disminuye. Este silenciamiento epigenético se debe en parte a la metilación de las islas CpG presentes en el promotor TRE (Gödecke *et al.*, 2017). Con base a lo anterior, se puede especular que el silenciamiento del sistema PB-Booster 2 E6/E7 en parte se debe a la metilación del promotor TRE, lo que inhibió la expresión inducida de los oncogenes E6/E7 en ESC. Sin embargo, si este silenciamiento epigenético es el causante de inhibir la inducción de E6/E7 en el sistema PB-Booster 2 E6/E7, se esperaría que el sistema PB-TRE-E6/E7 también se hubiera inhibido, lo cual no sucedió.

Las proteínas ZFP (del inglés *zinc-finger protein*) que contienen el dominio KRAB (del inglés *Krüppel-associated box*) son la familia más grande de reguladores transcripcionales presentes solamente en vertebrados (Ecco *et al.*, 2017). Mientras que sus dominios *zinc finger* dirigen el reconocimiento y unión al DNA, el dominio KRAB induce la formación de complejos represores compuestos de deacetilasas y metiltransferasas de histonas para causar represión transcripcional mediante la formación de heterocromatina facultativa a lo largo de 2-3 kilobases (Ecco *et al.*, 2017). Debido a su actividad de regulación transcripcional, el dominio KRAB se ha unido a transactivadores regulados por pequeñas moléculas para regular la expresión de elementos transgénicos. Un ejemplo de ellos es el

represor transcripcional tTS que es un constructo sintético constituido por el represor de tetraciclina TetR de *Escherichia coli* y el dominio de silenciamiento transcripcional KRAB (Freundlieb *et al.*, 1999; Szulc *et al.*, 2006).

Como se ha señalado, el represor tTS reduce la expresión residual del sistema de expresión Tet-On en células HEK293. No obstante, se ha observado que este represor puede inhibir irreversiblemente la expresión del gen de interés en células troncales de ratón (Wiznerowicz *et al.*, 2007; Szulc *et al.*, 2006). En un estudio se insertaron sitios *tetO* cerca de los promotores CAG, PGK y UbiC para estudiar el impacto que tiene la unión del represor tTS en los elementos cercanos a sus sitios de unión. Se observó que el tTS puede inducir el silenciamiento transcripcional de estos promotores sintéticos al promover la metilación de islas CpG durante las primeras etapas de desarrollo y en ESC (Wiznerowicz *et al.*, 2007; Szulc *et al.*, 2006; Quenneville *et al.*, 2012). Además, el represor tTS induce silenciamiento transcripcional de promotores endógenos al aumentar la metilación de histonas (H3K9me3) en el cuerpo del gen y en su promotor (Groner *et al.*, 2010). Tomando como base lo anterior, se puede proponer que el represor tTS indujo modificaciones epigenéticas en los promotores TRE y PGK que silenciaron irreversiblemente el sistema Tet-On, lo que evitó la expresión de los oncogenes E6 y E7 en las clonas de ESC A3-tTS y A6-tTS.

A pesar de lo anterior, la inducción con doxiciclina promovió la proliferación de las ESC en las clonas A3-tTS y A6-tTS (ver más adelante). Esto indica que sí hubo expresión de las oncoproteínas. Interesantemente, a las 48 de inducción parece haber un ligero aumento en la expresión de E6\*II en la clona A3-tTS. Se puede suponer que se requieren de mayores tiempos para que el transactivador rtTA remueva las marcas epigenéticas represivas inducidas por tTS y promueva la expresión del transgén.

La diferenciación de los ESC involucra la remodelación a gran escala de la cromatina, incluyendo diferentes ondas de metilación y desmetilación, modificaciones en las histonas y cambios en la estructura de la cromatina (Singh *et al.*, 2023). La diferenciación de los cuerpos embrioides hacia linajes específicos también implica la remodelación epigenética (Albini *et al.*, 2013; Rulands *et al.*, 2018). La expresión de los oncogenes a partir del día 3 de

formación de los cuerpos embrioides indica que la represión epigenética del sistema de expresión inducida por el tTS en ESC se perdió. Es posible suponer que los cambios epigenéticos durante la diferenciación del EB borraron las marcas represoras inducidas por represor transcripcional en la clona A3-tTS, lo que permitió la expresión inducida de los oncogenes con doxiciclina (Fig. 9). Lo anterior concuerda con la evidencia que señala que el represor tTS no induce la metilación de las islas CpG adyacentes al transgén de interés en células diferenciadas (Quenneville *et al.*, 2012). Esto posiblemente se llevó a cabo en la clona A3-tTS, pero la clona A6-tTS no expresó el transcrito E6\*II. Es necesario realizar otro tipo de evaluación que indique la presencia de E6 y E7 debido a que la inducción con doxiciclina aumentó la proliferación en ESC y posiblemente también en EB (ver más adelante).

En resumen, el represor transcripcional reduce la fuga transcripcional y mantiene la expresión inducida de los oncogenes en el sistema de expresión Booster 2.0 E6/E7 bajo ciertos contextos celulares. En las células HEK293 esto es verdadero, pero en ESC no se induce la expresión transcripcional de E6/E7 con doxiciclina. Eventos epigenéticos inducidos por el tTS posiblemente silencian el transgén. Mayores tiempos de inducción y la diferenciación de los EB borra estas marcas represivas que permiten la expresión inducida de los oncogenes.

*La expresión de los oncogenes E6 y E7 indujo la proliferación en células troncales embriónicas y cuerpos embrioides.*

El ciclo celular de las mESC se caracteriza por tener fases G1 y G2 de corta duración y una fase S de mayor duración (Padgett & Santos, 2020). No obstante, la duración de cada fase puede ser alterada por las condiciones de cultivo. En medio de mESC suplementado con los inhibidores PD0325901 y CHIR99021, los cuales inhiben la vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógenos (vía ERK/MERK) y de la glucógeno sintasa cinasa 3 respectivamente, la población de mESC se encuentra constituida por 30-40% de células en fase G1, 50-60% en fase S y 5-10% en fase G2. Si las células se cultivan en medio suplementado con suero (medio M15 utilizado en este trabajo), la mayoría de las células se encuentran en fase S (70-80%) y disminuye el número en las fases G1 (20-30%) y G2 (5-

10%). Así, la duración de las fases G1 y S es inversamente proporcional dependiendo del medio de cultivo (Jiang *et al.*, 2022; Ter Huurne *et al.*, 2017). Además, al disminuir la duración de la fase G1, aumenta la tasa de proliferación debido al aumento en la fase S (Jiang *et al.*, 2022; Tamn *et al.*, 2013).

Un efecto similar pudo haber causado los oncogenes E6 y E7 en la proliferación de las ESC. Como se ha observado, la expresión de los oncogenes causó un aumento significativo en la proliferación de las células troncales (Fig. 7). Además, aunque este proceso podría explicar el mayor tamaño que tuvieron los cuerpos embrioides con E6 y E7 (Fig. 11), también se debe considerar otras alteraciones como la inducción de tamaño celular. Interesantemente, la duración de la fase G1 es controlada por los inhibidores p21/p27 y la vía p53-pRb. En medio 2i, se induce la acumulación de p53, la cual a su vez promueve la expresión de los inhibidores p21/p27 de CDK2/4, disminuyendo la fosforilación de pRb. La forma no fosforilada de pRb inhibe la actividad de los factores E2F y con ello aumenta la duración de la fase G1 en medio 2i (Jiang *et al.*, 2022; Ter Huurne *et al.*, 2017, 2020). Por otra parte, las mESC crecidas en medio con suero no presentan acumulación de p53 y, por lo tanto, la proteína pRb se encuentra en estado fosforilado, es decir, se mantiene en su forma inactiva que no es capaz de inhibir los factores transcripcionales E2F. Así, en medio con suero, similar al utilizado para el crecimiento de nuestras mESC W9.5, la inactividad de p53 y pRB inducen el acortamiento de la fase G1.

Como se ha descrito anteriormente, los oncogenes E6 y E7 inducen la degradación de p53 y pRb, respectivamente. Este mecanismo podría ser el responsable de que la expresión de las oncoproteínas del VPH16 promovió la proliferación celular de las ESC. Es posible especular que las clonas A1-Venus, C1-Venus, A3-tTS y A6-tTS tuvieron una disminución en la duración de la fase G1 y concomitantemente un aumento en la fase S del ciclo celular, lo que provocó un aumento en la proliferación. Si se elimina estos dos genes supresores tumorales por separado, las proteínas pRb y p53, no se induce el aumento de la fase G1 en medio 2i. Si se eliminan en medio con suero, no disminuye aún más la fase G1 del ciclo celular (Jiang *et al.*, 2022; Ter Huurne *et al.*, 2017, 2020). Esto podría indicar que los efectos promotores de la proliferación de los oncogenes en mESC son independientes

de su actividad que degradar a p53 y pRb. Es factible también proponer que E6 y E7 inducen proliferación debido a su capacidad para alterar otras vías de señalización que controlan la autorrenovación en mESC (Scarth *et al.*, 2021; White, 2019). Por ejemplo, el acortamiento de la fase G1 también puede inducirse por sobreexpresión de las ciclinas A, E y D (Li *et al.*, 2012). Este podría constituir otro mecanismo por el que los oncogenes aumentan la proliferación. Para corroborar alguna de estas explicaciones es necesario realizar estudios que evalúen la duración del ciclo celular en presencia de los oncogenes y determinar las alteraciones en estas vías de señalización que controlan la duración de la fase G1 y S.

Los cultivos de ESC crecidos en medio suplementado con suero se encuentran constituidos por subpoblaciones que presentan variaciones en su actividad transcripcional, en sus marcas epigenéticas e incluso con diferencias genéticas (Kolodziejczyk *et al.*, 2015; Rulands *et al.*, 2018). Es común que las variantes que confieren una mayor proliferación celular, menor apoptosis, diferenciación disminuida o mayor tumorigenicidad sean seleccionadas con respecto a sus contrapartes normales (Bar & Benvenisty, 2019; Na *et al.*, 2014). Como hemos mencionado, el silenciamiento epigénético del sistema de expresión inducido por el represor transcripcional tTS posiblemente impidió la activación transcripcional de los oncogenes en las clonas A3-tTS y A6-tTS. No obstante, debido a la heterogeneidad de los cultivos de ESC, se esperaría que no todas las células presentaran el silenciamiento irreversible de los oncogenes E6 y E7. Es posible que algunas células pudieron expresar E6 y E7 con doxiciclina, lo cual les confirió una ventaja proliferativa, por algún mecanismo anteriormente mencionado, respecto a las células que tenían silenciado irreversiblemente los oncogenes, y fueron seleccionadas en el cultivo. Esto explicaría que las A3-tTS y A6-tTS tratadas con doxiciclina también tuvieron mayor proliferación celular. Además, como consecuencia de las diferentes integraciones del transposón, se esperaría que hubiera más probabilidades de que se indujera expresión de los oncogenes en alguna de las inserciones.

La expresión de E6\*II se midió a las 24 y 48 h (Fig. 5b) en las clonas A3-tTS y A6-tTS, momento en el que aún no había diferencias en la proliferación entre los grupos con doxiciclina y control (Fig. 7c). Las diferencias fueron significativas a partir del día 8 de cultivo,

lo que podría indicar que hasta ese momento el cultivo estuvo constituido por células con expresión de E6 y E7 que fueron seleccionadas por tener mayor proliferación. Falta medir la expresión de los oncogenes en este período de tiempo para poder sustentar lo anterior. Además, la expresión de E6\*II debería ser evaluada por métodos más sensibles (ej. qPCR). La prueba definitiva es la evaluación del producto de los oncogenes, es decir, las proteínas E6 y E7. A pesar de que intentamos establecer una inmunocitoquímica para la proteína E7 en las clonas ESC, no pudimos realizarla (datos no mostrados).

Los cuerpos embrioides formados por agregación espontánea se desarrollaron de forma normal (Fig. 8 y 9), es decir, se observó una capa externa bien definida que correspondería al endodermo primitivo, una membrana basal que entra en contacto con las capas internas que serían endodermo primitivo. Con los cortes histológicos se pudo observar que el interior de los EB se encontraba en proceso de cavitación (Fig. 10). Además, la evaluación del marcador de ectodermo primitivo *Fgf5* sustenta la adecuada diferenciación (Fig. 11). También se observó la expresión de los marcadores *Sox1* (ectodermo), *Foxa2* (endodermo) y *Tbxt* (mesodermo) solo en algunos tiempos de formación del EB durante la estandarización de la RT-PCR contra estos genes (datos no mostrados). Todo esto señala la adecuada diferenciación a los linajes de las tres capas germinales en el cuerpo embriode.

Interesantemente, los cuerpos embrioides inducidos con doxiciclina tuvieron un mayor tamaño. Esta diferencia se mantuvo desde el día 3 hasta el final del cultivo. A pesar de esta diferencia, los EB que expresaron los oncogenes se desarrollaron normalmente y no mostraron un patrón alterado de expresión de los marcadores de diferenciación (Fig. 11). La explicación de lo anterior puede deberse a la alteración del ciclo celular que resultó en mayor proliferación, como se ha comentado.

Finalmente, los efectos de E6 y E7 en las mESC y en los cuerpos embrioides se podrían trasladar a lo que sucede en el epitelio cervical. Utilizando ratones transgénicos que sobreexpresan E6 y E7 en las capas basales (Arbeit *et al.*, 1994, 1996; Herber *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2000) se ha observado que los oncogenes inducen la

proliferación de las células basales y disminuyen la diferenciación de las capas suprabasales promoviendo la carcinogénesis (Brake *et al.*, 2005; Riley *et al.*, 2003). El efecto que induce E6 y E7 en las mESC podría arrojar ideas acerca de alteraciones que se inducen en las células troncales del epitelio cervical, de las cuales se sabe muy poco a pesar de que se han propuesto como la célula de origen del cáncer (Doorbar *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha desarrollado un modelo transgénico que sobreexpresa los oncogenes en las capas suprabasales del epitelio cervical (Auewarakul *et al.*, 1994; García *et al.*, 2017), sitio donde las proteínas virales tienen su principal efecto oncogénico debido a su expresión restringida en las células suprabasales (Doorbar *et al.*, 2016). En este modelo transgénico, los oncogenes E6 y E7 inducen la entrada al ciclo celular de las células suprabasales post-mitóticas, promoviendo la carcinogénesis cervical (Rojo-León *et al.*, 2019). El efecto que induce E6 y E7 en los cuerpos embrioides podría arrojar ideas acerca de las alteraciones en la diferenciación que se producen en las células suprabasales del epitelio cervical. Por ejemplo, la expresión de la proteína de fusión JAZF1-SUZ12 se encuentra en el 50% de los casos de sarcoma estromal endometrial de alto grado. La proteína Suz12 es una subunidad del complejo represor polycomb 2 (PRC2) que induce la metilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3). La proteína Jazf1 se une al complejo de acetil transferasa Nua4/Tip60. La sobreexpresión de JAZF1-SUZ12 en mESC y en cuerpos embrioides alteró las modificaciones de histonas, la expresión génica y su diferenciación. A partir de estos hallazgos en mESC y EB, se encontró que estas alteraciones también fueron inducidas en células estromales endometriales, las cuales contribuyen a la carcinogénesis del endometrio (Tavares *et al.*, 2022). En resumen, las alteraciones inducidas por la expresión de E6 y E7 en las ESC y EB podrían indicar las alteraciones que contribuyen al proceso de carcinogénesis cervical.

En conclusión, la expresión de los oncogenes induce la proliferación de las ESC y un mayor tamaño de los EB posiblemente por un mecanismo que involucra la alteración del ciclo celular. Se proponen a las ESC y los EB como modelos para estudiar las alteraciones provocadas por los oncogenes E6 y E7.

*Los teratomas para estudiar los efectos de E6 y E7 en tejidos diferenciados.*

Para cumplir con el último objetivo se realizó el trasplante de ESC en ratones inmunodeficientes NOD-SCID y se permitió la formación de teratomas. Para el caso de la clona C1-Venus no se encontraron diferencias en la formación de teratomas entre los ratones tratados con doxiciclina y el grupo control. Tampoco se observaron diferencias entre el número de células trasplantado ( $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  y  $3 \times 10^6$ ). Interesantemente, las células inyectadas subcutáneamente en la piel dorsal superior desarrollaron tumores más grandes que los desarrollados en la parte inferior (Fig. 10). Esto se puede deber a las diferencias en la disponibilidad trófica y vascularización del sitio de inyección (Gordeeva & Nikonova, 2013), lo cual indica que la inyección en la parte superior debe ser la utilizada en futuros estudios de formación de teratomas a partir de nuestras ESC. Por otra parte, la clona A1-Venus solo formó teratomas en ratones inmunodeficientes hembra, los cuales desarrollaron tejidos representativos de las tres capas germinales a pesar de que presentaron un tamaño reducido. Esto indica que la clona tuvo alteraciones que disminuyeron la tumorigenicidad, lo cual limita su uso en futuros estudios con los oncogenes virales.

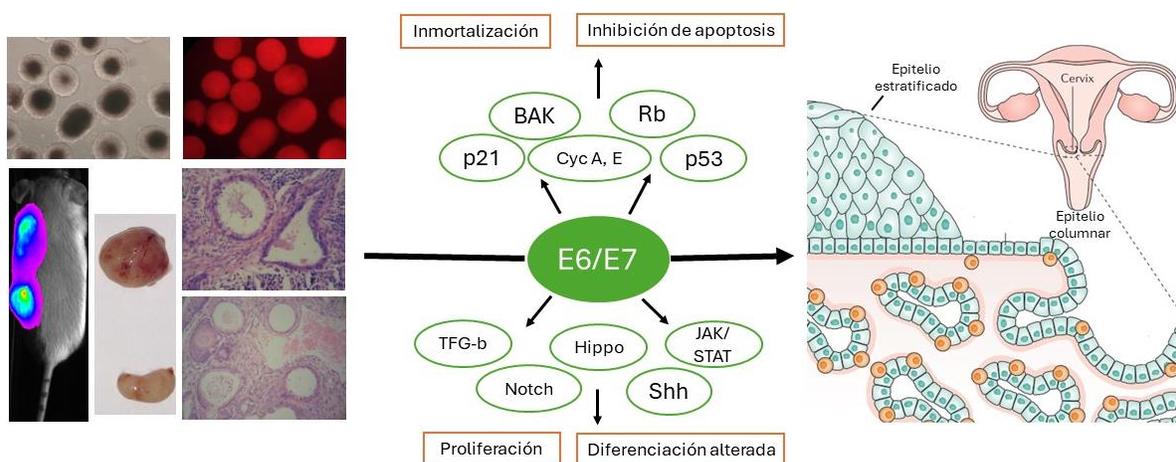
Teníamos como hipótesis que la expresión de los oncogenes causaría la formación de tumores menos diferenciados dado que aumentarían la proliferación y no así la diferenciación celular, es decir, formarían teratocarcinomas. En los cortes histológicos se observó que se formó una gran diversidad de tejidos (ej. músculo, epitelio simple cuboidal, epitelio estratificado, estroma) en los teratomas (Fig.12b). No se observan grandes diferencias en la diferenciación de los tejidos entre aquellos que fueron tratados con doxiciclina y el grupo control. Estudios posteriores en nuestro laboratorio encontraron que la expresión de los oncogenes se indujo por la administración oral de doxiciclina en los teratomas formados a partir de la clona C1-Venus (Cortés-Pérez, datos no mostrados), aunque es necesario detectar las proteínas virales mediante inmunocitoquímica. Una vez realizado lo anterior, se debe medir la expresión de marcadores de diferenciación y de pluripotencia para probar si existen cambios en la diferenciación de los tejidos que presentaron los oncogenes.

Los teratocarcinomas presentan una población de células malignas indiferenciadas, llamadas células de carcinoma embrionario (Blum & Benvenisty, 2008). Estas células se pueden aislar de los tumores y crecen *in vitro* en condiciones de cultivo de ESC (Zhang *et al.*, 2016). Se podría evaluar la presencia de estas células en los tumores desarrollados con la administración de doxiciclina.

Las ESC fueron transfectadas con el vector que contiene el sistema de expresión y con un transposón que expresa constitutivamente la proteína reportera mCherry y la enzima luciferasa. Las clonas de ESC presentaron bioluminiscencia *in vitro* cuando se administró el sustrato luciferasa (Fig. 6). En los teratomas formados a partir de las ESC A1-Venus se pudo medir la bioluminiscencia *in vivo* (Fig. 12), lo que puede facilitar el monitoreo del crecimiento tumoral.

Se ha propuesto que E6 y E7 desacoplan la proliferación de la diferenciación del epitelio cervical, es decir, inducen la entrada al ciclo celular en células que se encuentran en diferenciación (Moody *et al.*, 2017). La inducción de la proliferación es un paso necesario durante la carcinogénesis, pero no se conoce si la disminución de la diferenciación participa en el proceso maligno (White *et al.*, 2019). La expresión de los oncogenes en los teratomas podría servir para dilucidar los mecanismos y las vías de señalización que E6 y E7 alteran para desacoplar la proliferación de la diferenciación (Fig. 13). Por ejemplo, la vía de señalización Gli se activa y es importante en la homeostasis del epitelio cervical. Cuando se encuentran los oncogenes expresados en las capas suprabasales del epitelio cervical, se ha encontrado que la vía se encuentra más activada y que por lo tanto participa en la promoción de la actividad proliferativa de las células suprabasales que entran al ciclo celular por la acción de E6/E7. Por lo tanto, esta vía está involucrada en la progresión y mantenimiento del fenotipo maligno (Rojo-León *et al.*, 2019). En los teratomas se podría evaluar el mecanismo de interacción entre los oncogenes y la vía. Incluso se podrían derivar ESC (Tg(Gli-Luc); Tg(K6b-E6/E7) que tengan los oncogenes y la actividad reportera de la vía Shh y generar teratomas.

En resumen, la clona de ESC A1-Venus puede formar eficientemente teratomas en ratones macho y hembra NOD-SCID, los cuales presentan tejidos de las tres capas germinales y pueden ser monitoreado *in vivo* mediante bioluminiscencia. Esta clona puede modificarse genéticamente para poder estudiar la interacción de los oncogenes E6 y E7 con otras vías de señalización (ej. vía Sonic Hedgehog; Fig. 13).



**Fig. 13 | Los teratomas y cuerpos embrioides como modelos para estudiar los efectos de los oncogenes E6 y E7 en tejidos diferenciados.** Los derivados diferenciados de las ESC pueden servir como un modelo para entender cómo los oncogenes E6 y E7 afectan procesos como la diferenciación y proliferación y las vías de señalización y mecanismos involucrados en células diferenciadas, lo cual se puede trasladar a lo que pasa en el epitelio cervical (Modificado de Schiffman *et al.*, 2016 y Scarth *et al.*, 2021).

## Conclusiones.

- El sistema de expresión Booster 2 E6/E7 reprime la expresión residual de los oncogenes, pero el represor tTS puede causar silenciamiento irreversible del sistema.
- La expresión de los oncogenes E6 y E7 indujeron un aumento en la proliferación de las ESC y el tamaño de los cuerpos embrioides.
- La expresión de E6 y E7 permite el desarrollo normal de los teratomas en ratones inmunodeficientes NOD-SCID.
- Las células troncales embrionarias, los cuerpos embrioides y los teratomas pueden ser modelos para estudiar los efectos de los oncogenes E6 y E7 en la proliferación y la diferenciación, lo cual podría trasladarse a lo que provocan en el epitelio cervical y en la carcinogénesis.

## Perspectivas.

- Si bien no se pudo observar la expresión de los oncogenes en la clona A6-tTS mediante RT-PCR, la administración de doxiciclina aumentó la proliferación de las ESC e indujo un mayor tamaño de los EB. Lo anterior indica que los oncogenes E6 y E7 indujeron un efecto oncogénico. Es necesario medir por métodos más sensibles la expresión de los oncogenes (ej. qPCR) y durante períodos más largos de inducción (>48 h). Además, se debe evaluar la presencia de las proteínas virales u otras proteínas que indiquen su presencia para adjudicarles los fenómenos observados (ej. nivel de p53, fosforilación de Rb, nivel de expresión de p21).
- La presencia de los oncogenes aumentó la proliferación de las ESC, pero cómo las proteínas virales alteraron este proceso aún es desconocido. Es necesario realizar estudios que evalúen la duración del ciclo celular en presencia de los oncogenes y determinar las alteraciones en las vías de señalización que controlan la duración de la fase G1 y S, como citometría o inmunocitoquímicas contra marcadores de la proliferación celular (ej. Ki63).
- Si bien se midió la expresión de los oncogenes en ESC, EB y teratomas, la presencia de sus proteínas debe evaluarse adecuadamente en estos modelos mediante técnicas de detección de proteínas (ej. western blot, inmunocitoquímicas, proteómica).
- Se ha postulado que los oncogenes virales desacoplan la diferenciación de la proliferación celular. Se debe medir la expresión de marcadores de diferenciación (ej. Fgf5, Brachyury, Sox2) y de pluripotencia (ej. Oct4, Nanog) para probar si existen cambios en la diferenciación de los tejidos de los EB y teratomas debido a la expresión de E6 y E7.

- Aunque aquí se postula que los oncogenes aumentaron el tamaño de los cuerpos embrioides debido a sus efectos en la proliferación, no se descarta que el mayor tamaño se deba a un aumento en el volumen celular. Es necesario evaluar este mecanismo y además evaluar si existen alteraciones las vías de señalización que controlan el tamaño celular (ej. vía Hippo).
- El desarrollo de los teratomas A1-Venus pudo monitorearse *in vivo* mediante bioluminiscencia, lo cual permitiría una mejor medición del crecimiento del tumor con el objetivo de mejorar el protocolo de formación.
- La clona A1-Venus puede modificarse genéticamente para evaluar la interacción entre los oncogenes y otras vías de señalización.
- En ratones transgénicos (Tg(Gli-Luc); Tg(K6b-E6/E7) se evaluó la participación de la vía de Sonic Hedgehog en la promoción de la carcinogénesis cervical mediante el análisis *in vivo* de la bioluminiscencia que indica la actividad de esta vía de señalización. Se podrían derivar ESC (Tg(Gli-Luc); Tg(K6b-E6/E7) que tengan los oncogenes y la actividad reportera de la vía Shh para generar teratomas y estudiar cómo interactúa esta vía de señalización y los oncogenes E6 y E7 para promover la carcinogénesis viral.
- Las ESC con expresión de E6 y E7 y otros transgenes como el factor transcripcional Gli1 de la vía de Sonic Hedgehog o el oncogén Ras pueden ser el material para la formación de ratones transgénicos que sirvan como nuevos modelos para estudiar la carcinogénesis en el epitelio cervical.

## Referencias

1. Akhtar, W., De Jong, J., Pindyurin, A. V., Pagie, L., Meuleman, W., De Ridder, J., Berns, A., Wessels, L. F. A., Van Lohuizen, M., & Van Steensel, B. (2013). Chromatin position effects assayed by thousands of reporters integrated in parallel. *Cell*, *154*(4), 914–927. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.018>
2. Albin, S., Coutinho, P., Malecova, B., Giordani, L., Savchenko, A., Forcales, S. V., & Puri, P. L. (2013). Epigenetic Reprogramming of Human Embryonic Stem Cells into Skeletal Muscle Cells and Generation of Contractile Myospheres. *Cell Reports*, *3*(3), 661–670. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.012>
3. Arbeit, J. M., Münger, K., Howley, P. M., & Hanahan, D. (1994). Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Journal of Virology*, *68*(7), 4358–4368. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.7.4358-4368.1994>
4. Arbeit, J. M., Howley, P. M., & Hanahan, D. (1996). Carcinogenesis in Human Papillomavirus Type 16 Transgenic Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *93*(April), 2930–2935.
5. Bar, S., & Benvenisty, N. (2019). Epigenetic aberrations in human pluripotent stem cells. *The EMBO Journal*, *38*(12), 1–18. <https://doi.org/10.15252/embj.2018101033>
6. Ben-David, U., & Benvenisty, N. (2011). The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer*, *11*, 268–277. <https://doi.org/10.1038/nrc3034>
7. Auewarakul, P., Gissmann, L., & Cid-Arregui, A. (1994). Targeted expression of the E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus type 16 in the epidermis of transgenic mice elicits generalized epidermal hyperplasia involving autocrine factors. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(12), 8250–8258. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.12.8250>
8. Bergvall, M., Melendy, T., & Archambault, J. (2013). The E1 proteins. *Virology*, *445*(1–2), 35–56. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.020>
9. Bernard, H. U. (2013). Regulatory elements in the viral genome. *Virology*, *445*(1–2), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.035>
10. Blum, B., & Benvenisty, N. (2008). The Tumorigenicity of Human Embryonic Stem Cells. *Advances in Cancer Research*, *100*(08), 133–158. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)00005-5)
11. Brake, T., & Lambert, P. F. (2005). Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(7), 2490–2495. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409883102>
12. Brickman, J. M., & Serup, P. (2017). Properties of embryoid bodies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *6*(2). <https://doi.org/10.1002/wdev.259>
13. Castel, P., Rauen, K. A., & McCormick, F. (2020). The duality of human oncoproteins: drivers of cancer and congenital disorders. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0256-z>

14. Coucouvanis, E., & Martin, G. R. (1995). Signals for death and survival: A two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell*, *83*(2), 279–287. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90169-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90169-8)
15. Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S., & Kitchener, H. C. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, *382*(9895), 889–899. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7)
16. Das, A., Tenenbaum, L., & Berkhout, B. (2016). Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Current Gene Therapy*, *16*(3), 156–167. <https://doi.org/10.2174/1566523216666160524144041>
17. DiMaio, D., & Petti, L. M. (2013). The E5 proteins. *Virology*, *445*(1–2), 99–114. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.006>
18. Doorbar, J. (2006). *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. 541, 525–541. <https://doi.org/10.1042/CS20050369>
19. Doorbar, J. (2013). The E4 protein; structure, function, and patterns of expression. *Virology*, *445*(1–2), 80–98. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.008>
20. Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., & Murakami, I. (2016). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*, *25*, 2–23. <https://doi.org/10.1002/rmv.1822>
21. Ecco, G., Imbeault, M., & Trono, D. (2017). KRAB zinc finger proteins. *Development (Cambridge)*, *144*(15), 2719–2729. <https://doi.org/10.1242/dev.132605>
22. Escalante-alcalde, D., Recillas-targa, F., Marroqui, A., Gariglio, P., Covarrubias, L., & Gene, D. De. (2000). Expression of E6 and E7 Papillomavirus Oncogenes in the Outer Root Sheath of Hair Follicles Extends the Growth Phase and Bypasses Resting at Telogen. *Cell Growth & Differentiation*, *11*, 527–539.
23. Freundlieb, S., Schirra-mu, C., & Bujard, H. (1999). A Tetracycline Controlled Activation / Repression System with Increased Potential for Gene Transfer into Mammalian Cells. *The Journal of Gene Medicine*, *1*(December 1998), 4–12.
24. García, C., Hernández-García, D., Valencia, C., Rojo-León, V., Pérez-Estrada, J.-R., Werner, M., & Covarrubias, L. (2017). E6/E7 oncogenes in epithelial suprabasal layers and estradiol promote cervical growth and ear regeneration. *Oncogenesis*, *6*(8), e374–e374. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.73>
25. GLOBOCAN. 2020. Cancer Today. Recuperado el 24 de octubre, 2023: <https://gco.iarc.fr/>
26. Guo, H., Tian, L., Zhang, J. Z., Kitani, T., Paik, D. T., Lee, W. H., & Wu, J. C. (2019). Single-Cell RNA Sequencing of Human Embryonic Stem Cell Differentiation Delineates Adverse Effects of Nicotine on Embryonic Development. *Stem Cell Reports*, *12*(4), 772–786. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.01.022>
27. Gödecke, N., Zha, L., Spencer, S., Behme, S., Riemer, P., Rehli, M., Hauser, H., & Wirth, D. (2017). Controlled re-activation of epigenetically silenced Tet promoter-driven transgene expression by targeted demethylation. *Nucleic Acids Research*, *45*(16). <https://doi.org/10.1093/nar/gkx601>
28. Gordeeva, O. F., & Nikonova, T. M. (2013). Development of experimental tumors formed by mouse and human embryonic stem and teratocarcinoma cells after subcutaneous and intraperitoneal transplantations into immunodeficient and

- immunocompetent mice. *Cell Transplantation*, 22(10), 1901–1914. <https://doi.org/10.3727/096368912X657837>
29. Graham, S. V. (2017). *The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review*. *O*(June), 2201–2221.
30. Groner, A. C., Meylan, S., Ciuffi, A., Zangger, N., & Ambrosini, G. (2010). *KRAB – Zinc Finger Proteins and KAP1 Can Mediate Long-Range Transcriptional Repression through Heterochromatin Spreading*. 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000869>
31. Han, X., Chen, H., Huang, D., Chen, H., Fei, L., Cheng, C., Huang, H., Yuan, G. C., & Guo, G. (2018). Mapping human pluripotent stem cell differentiation pathways using high throughput single-cell RNA-sequencing. *Genome Biology*, 19(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1426-0>
32. Herber, R., Liem, A. M. Y., Pitot, H., Lambert, P. F., & Irol, J. V. (1996). Squamous Epithelial Hyperplasia and Carcinoma in Mice Transgenic for the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncogene. *Journal of Virology*, 70(3), 1873–1881.
33. Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1238–1246. <https://doi.org/10.1172/JCI95148>
34. Heyer, J., Kwong, L. N., Lowe, S. W., & Chin, L. (2010). Non-germline genetically engineered mouse models for translational cancer research. *Nature Reviews Cancer*, 10(7), 470–480. <https://doi.org/10.1038/nrc2877>
35. Huang, X., Guo, H., Tammana, S., Jung, Y. C., Mellgren, E., Bassi, P., Cao, Q., Tu, Z. J., Kim, Y. C., Ekker, S. C., Wu, X., Wang, S. M., & Zhou, X. (2010). Gene transfer efficiency and genome-wide integration profiling of sleeping beauty, Tol2, and PiggyBac transposons in human primary t cells. *Molecular Therapy*, 18(10), 1803–1813. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.141>
36. International, T., & Cell, S. (2018). Assessment of established techniques to determine developmental and malignant potential of human pluripotent stem cells. *Nature Communications*, 9(1), 1925. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04011-3>
37. Jiang, J., Qiu, T., Yang, C., Yuan, Y., Qin, L., & Zhang, P. (2022). Atypical cell cycle profile of mouse embryonic stem cell is regulated by classic oncogenic and tumor suppressive genes in vitro. *Heliyon*, 8(12), e11979. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11979>
38. Kimura, H., Ng, J. M. Y., & Curran, T. (2008). Transient Inhibition of the Hedgehog Pathway in Young Mice Causes Permanent Defects in Bone Structure. *Cancer Cell*, 13(3), 249–260. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.01.027>
39. Kolodziejczyk, A. A., Kim, J. K., Tsang, J. C. H., Ilicic, T., Henriksson, J., Natarajan, K. N., Tuck, A. C., Gao, X., Bühler, M., Liu, P., Marioni, J. C., & Teichmann, S. A. (2015). Single Cell RNA-Sequencing of Pluripotent States Unlocks Modular Transcriptional Variation. *Cell Stem Cell*, 17(4), 471–485. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.011>
40. Li, V. C., Ballabeni, A., & Kirschner, M. W. (2012). Gap 1 phase length and mouse embryonic stem cell self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the United States of America*, 109(31), 12550–12555. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206740109>
41. Litwin, T. R., Clarke, M. A., Dean, M., & Wentzensen, N. (2017). Somatic host cell alterations in HPV carcinogenesis. *Viruses*, 9(206), 1–22. <https://doi.org/10.3390/v9080206>
  42. López-Hernández, S. E. (2018). Cooperación entre los oncogenes E6/E7 y factores promotores de la angiogénesis en la regeneración de las porciones de la oreja de ratón. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
  43. Martínez-Sarmiento, J. A. (2016). Patrones de pluripotencia inducida por reprogramación celular utilizando un sistema auto-inducible. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
  44. McBride, A. A. (2013). The Papillomavirus E2 proteins. *Virology*, 445(1–2), 57–79. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.006>
  45. McDonald, D., Wu, Y., Dailamy, A., Tat, J., Parekh, U., Zhao, D., Hu, M., Tipps, A., Zhang, K., & Mali, P. (2020). Defining the Teratoma as a Model for Multi-lineage Human Development. *Cell*, 183(5), 1402–1419.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.018>
  46. Mojica, A. K. (2018). Papel de Dll1 en el mantenimiento de las células troncales neurales del nicho dopaminérgico embrionario. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
  47. Moody, C. A. (2017). Mechanisms by which HPV induces a replication competent environment in differentiating keratinocytes. *Viruses*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/v9090261>
  48. Mulas, C., Meyenn, F. Von, Leitch, H. G., Nichols, J. & Smith, A. (2019). Defined conditions for propagation and manipulation of mouse embryonic stem cells. *Development*, (146), dev178970. <https://doi.org/10.1242/dev.178970>
  49. Na, J., Baker, D., Zhang, J., Andrews, P. W., & Barbaric, I. (2014). Aneuploidy in pluripotent stem cells and implications for cancerous transformation. *Protein and Cell*, 5(8), 569–579. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0073-9>
  50. Ngondo, R. P., Cohen-Tannoudji, M., & Ciaudo, C. (2020). Fast In Vitro Procedure to Identify Extraembryonic Differentiation Defect of Mouse Embryonic Stem Cells. *STAR Protocols*, 1(3), 100127. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100127>
  51. Niyaz, M., Khan, M. S., & Mudassar, S. (2019). Hedgehog Signaling : An Achilles' Heel in Cancer. *Translational Oncology*, 12(10), 1334–1344. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.07.004>
  52. Padgett, J., & Santos, S. D. M. (2020). From clocks to dominoes: lessons on cell cycle remodelling from embryonic stem cells. *FEBS Letters*, 594(13), 2031–2045. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13862>
  53. Quenneville, S., Turelli, P., Bojkowska, K., Raclot, C., Offner, S., Kapopoulou, A., & Trono, D. (2012). The KRAB-ZFP/KAP1 System Contributes to the Early Embryonic Establishment of Site-Specific DNA Methylation Patterns Maintained during Development. *Cell Reports*, 2(4), 766–773. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.043>

54. Raff, A. B., Woodham, A. W., Raff, L. M., Skeate, J. G., Yan, L., Da Silva, D. M., Schelhaas, M., & Kast, W. M. (2013). The Evolving Field of Human Papillomavirus Receptor Research: a Review of Binding and Entry. *Journal of Virology*, *87*(11), 6062–6072. <https://doi.org/10.1128/jvi.00330-13>
55. Rhodes, K., Barr, K. A., Popp, J. M., Strober, B. J., Battle, A., & Gilad, Y. (2022). Human embryoid bodies as a novel system for genomic studies of functionally diverse cell types. *ELife*, *11*, 1–24. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.71361>
56. Riley, R. R., Duensing, S., Brake, T., Münger, K., Lambert, P. F., & Arbeit, J. M. (2003). Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Research*, *63*(16), 4862–4871.
57. Rivera, D. A. (2022). Participación de la catasa en la senescencia celular de fibroblastos embrionarios de ratón. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
58. Rojo-León, V., García, C., Valencia, C., Méndez, M. A., Wood, C., & Covarrubias, L. (2019). The E6/E7 oncogenes of human papilloma virus and estradiol regulate hedgehog signaling activity in a murine model of cervical cancer. *Experimental Cell Research*, *381*(2), 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.05.024>
59. Rulands, S., Lee, H. J., Clark, S. J., Angermueller, C., Smallwood, S. A., Krueger, F., Mohammed, H., Dean, W., Nichols, J., Rugg-Gunn, P., Kelsey, G., Stegle, O., Simons, B. D., & Reik, W. (2018). Genome-Scale Oscillations in DNA Methylation during Exit from Pluripotency. In *Cell Systems* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.06.012>
60. Sánchez-Cázares, L. M. (2020). Contribución de los oncogenes E6 y E7 a la reprogramación inducida por MKOS de células postmitóticas. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
61. Sapp, M., & Bienkowska-Haba, M. (2009). Viral entry mechanisms: Human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS Journal*, *276*(24), 7206–7216. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07400.x>
62. Scarth, J. A., Patterson, M. R., Morgan, E. L., & Macdonald, A. (2021). The human papillomavirus oncoproteins: A review of the host pathways targeted on the road to transformation. *Journal of General Virology*, *102*(3). <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001540>
63. Schiffman, M., & Wentzensen, N. (2013). Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *22*(4), 553–560. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-1406>
64. Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., De Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B. J., Stanley, M. A., & Franceschi, S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.86>
65. Schwartz, S. (2013). Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology*, *445*(1–2), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.034>
66. Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*, *15*(7), 397–408. <https://doi.org/10.1038/nrc3960>

67. Sheridan, S. D., Surampudi, V., & Rao, R. R. (2012). Analysis of embryoid bodies derived from human induced pluripotent stem cells as a means to assess pluripotency. *Stem Cells International*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/738910>
68. Singh, A., Rappolee, D. A., & Ruden, D. M. (2023). Epigenetic Reprogramming in Mice and Humans: From Fertilization to Primordial Germ Cell Development. *Cells*, 12(14), 1–25. <https://doi.org/10.3390/cells12141874>
69. Song, S., Liem, A., Miller, J. A., & Lambert, P. F. (2000). Human Papillomavirus Types 16 E6 and E7 Contribute Differently to Carcinogenesis. *Virology*, 150, 141–150. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0106>
70. Song, S., Pitot, H. C., & Lambert, P. F. (1999). The Human Papillomavirus Type 16 E6 Gene Alone Is Sufficient To Induce Carcinomas in Transgenic Animals. *Journal of Virology*, 73(7), 5887–5893. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.7.5887-5893.1999>
71. Stanley, M. A. (2012). Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 25, Issue 2, pp. 215–222). <https://doi.org/10.1128/CMR.05028-11>
72. Sun, Y., Chen, X., & Xiao, D. (2007). Tetracycline-inducible expression systems: New strategies and practices in the transgenic mouse modeling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(4), 235–246. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00258.x>
73. Szulc, J., Wiznerowicz, M., Sauvain, M. O., Trono, D., & Aebischer, P. (2006). A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nature Methods*, 3(2), 109–116. <https://doi.org/10.1038/nmeth846>
74. Tamm, C., Galitó, S. P., & Annerén, C. (2013). A comparative study of protocols for mouse embryonic stem cell culturing. *PLoS ONE*, 8(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081156>
75. Tavares, M., Khandelwal, G., Muter, J., Viiri, K., Beltran, M., Brosens, J. J., & Jenner, R. G. (2022). JAZF1-SUZ12 dysregulates PRC2 function and gene expression during cell differentiation. *Cell Reports*, 39(9), 110889. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110889>
76. ter Huurne, M., Chappell, J., Dalton, S., & Stunnenberg, H. G. (2017). Distinct Cell-Cycle Control in Two Different States of Mouse Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 21(4), 449-455.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.09.0047>
77. ter Huurne, M., Peng, T., Yi, G., van Mierlo, G., Marks, H., & Stunnenberg, H. G. (2020). Critical Role for P53 in Regulating the Cell Cycle of Ground State Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 14(2), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.01.001>
78. Cancer, T., & Atlas, G. (2017). The Cancer Genome Atlas Research Network \* Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*, 543, 378–384. <https://doi.org/10.1038/nature21386>
79. Welman, A., Barraclough, J., & Dive, C. (2007). Tetracycline regulated systems in functional oncogenomics. *Translational Oncogenomics*, 2, 17–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23645981%0A>
80. White, E. A. (2019). Manipulation of epithelial differentiation by hpv oncoproteins. *Viruses*, 11(4), 1–25. <https://doi.org/10.3390/v11040369>

81. Wiznerowicz, M., Jakobsson, J., Szulc, J., Liao, S., Quazzola, A., Beermann, F., Aebischer, P., & Trono, D. (2007). The Krüppel-associated Box Repressor Domain Can Trigger de Novo Promoter Methylation during Mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 282(47), 34535–34541. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705898200>
82. Yeo-Teh, N. S. L., Ito, Y., & Jha, S. (2018). High-risk human papillomaviral oncogenes E6 and E7 target key cellular pathways to achieve oncogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061706>
83. Yang, S., Shi, H., Chu, X., Zhou, X., & Sun, P. (2016). A rapid and efficient polyethylenimine-based transfection method to prepare lentiviral or retroviral vectors: useful for making iPS cells and transduction of primary cells. *Biothecnol Lett.*
84. Zeevaert, K., Elsafi Mabrouk, M. H., Wagner, W., & Goetzke, R. (2020). Cell Mechanics in Embryoid Bodies. *Cells*, 9(10), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cells9102270>
85. Zhang, M., Cheng, L., Jia, Y., Liu, G., Li, C., Song, S., Bradley, A., & Huang, Y. (2016). Aneuploid embryonic stem cells exhibit impaired differentiation and increased neoplastic potential. *The EMBO Journal*, 35(21), 2285–2300. <https://doi.org/10.15252/embj.201593103>
86. Zuber, J., Mcjunkin, K., Fellmann, C., Dow, L. E., Taylor, J., Hannon, G. J., & Lowe, S. W. (2011). Toolkit for evaluating genes required for proliferation and survival using tetracycline-regulated RNAi. *Nature Biotechnology*, 29(1), 79–83. <https://doi.org/10.1038/nbt.1720.Toolkit>

## Apéndice.

Tabla 1. Clonas derivadas de ESC con la expresión de los oncogenes E6 y E7.

No.	Nombre de clona de ESC*	No. de pase congelado	No.	Nombre de clona de ESC*	No. de pase congelado
1	A2-tTS-Cherry (1:5)	2	40	A1- Venus -Cherry (1:5)	>5
2	A3-tTS-Cherry (1:5)	2	41	A2- Venus -Cherry (1:5)	2
3	A4-tTS-Cherry (1:5)	2	42	A4- Venus -Cherry (1:5)	2
4	A5-tTS-Cherry (1:5)	>5	43	B1-Venus-Cherry (1:5)	2
5	B2-tTS-Cherry (1:5)	2	44	B5- Venus -Cherry (1:5)	2
6	B3-tTS-Cherry (1:5)	2	45	B6- Venus -Cherry (1:5)	2
7	B4-tTS-Cherry (1:5)	2	46	C1- Venus -Cherry (1:5)	2
8	B5-tTS-Cherry (1:5)	2	47	C2- Venus -Cherry (1:5)	2
9	B6-tTS-Cherry (1:5)	2	48	C3- Venus -Cherry (1:5)	2
10	C1-tTS-Cherry (1:5)	2	49	C4- Venus -Cherry (1:5)	2
11	C4-tTS-Cherry (1:5)	2	50	C5- Venus -Cherry (1:5)	2
12	C5-tTS-Cherry (1:5)	2	51	C6- Venus -Cherry (1:5)	2
13	C6-tTS-Cherry (1:5)	2	52	D1- Venus -Cherry (1:5)	2
14	D1-tTS-Cherry (1:5)	2	53	D2- Venus -Cherry (1:5)	2
15	D2-tTS-Cherry (1:5)	2	54	D3- Venus -Cherry (1:5)	2
16	D3-tTS-Cherry (1:5)	2	55	D4- Venus -Cherry (1:5)	2
17	D4-tTS-Cherry (1:5)	2	56	D5- Venus -Cherry (1:5)	2
18	A1-tTS-Cherry (1:25)	2	57	D6- Venus -Cherry (1:5)	2
19	A2-tTS-Cherry (1:25)	2	58	A1- Venus -Cherry (1:25)	2
20	A3-tTS-Cherry (1:25)	>5	59	A5- Venus -Cherry (1:25)	2
21	A4-tTS-Cherry (1:25)	2	60	A6- Venus -Cherry (1:25)	2
22	A5-tTS-Cherry (1:25)	2	61	B1- Venus -Cherry (1:25)	>5
23	A6-tTS-Cherry (1:25)	>5	62	B2- Venus -Cherry (1:25)	2
24	B1-tTS-Cherry (1:25)	2	63	B3- Venus -Cherry (1:25)	2
25	B2-tTS-Cherry (1:25)	2	64	B4- Venus -Cherry (1:25)	2
26	B4-tTS-Cherry (1:25)	2	65	B5- Venus -Cherry (1:25)	2
27	B6-tTS-Cherry (1:25)	2	66	C1- Venus -Cherry (1:25)	>5
28	C1-tTS-Cherry (1:25)	2	67	C3- Venus -Cherry (1:25)	2
29	C2-tTS-Cherry (1:25)	2	68	C4- Venus -Cherry (1:25)	2
30	C3-tTS-Cherry (1:25)	2	69	C5- Venus -Cherry (1:25)	2
31	C4-tTS-Cherry (1:25)	2	70	C6- Venus -Cherry (1:25)	2
32	C5-tTS-Cherry (1:25)	2	71	D1- Venus -Cherry (1:25)	2
33	C6-tTS-Cherry (1:25)	2	72	D2- Venus -Cherry (1:25)	2
34	D1-tTS-Cherry (1:25)	2	73	D3- Venus -Cherry (1:25)	2
35	D2-tTS-Cherry (1:25)	2	74	D4- Venus -Cherry (1:25)	2
36	D3-tTS-Cherry (1:25)	2	75	D5- Venus -Cherry (1:25)	2
37	D4-tTS-Cherry (1:25)	2	76	D6- Venus -Cherry (1:25)	2
38	D5-tTS-Cherry (1:25)	2			
39	D6-tTS-Cherry (1:25)	2			

\*El 1:5 y 1:25 se refieren al cociente de transposasa y transposón que se electroporaron.