



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**Obtención de la proteína rE2 y ensayos de interacción
del complejo de inicio de la replicación del VPH16**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

PRESENTA

Q.B.T. JESÚS ALONSO GÁNDARA MIRELES

Durango, Dgo.

Diciembre del 2017



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**Obtención de la proteína rE2 y ensayos de interacción del complejo
de inicio de la replicación del VPH16**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

PRESENTA

QBT JESÚS ALONSO GÁNDARA MIRELES

APROBADA POR EL DIRECTOR DE TESIS

D.C. MARÍA LETICIA SAUCEDO MENDIOLA

Durango, Dgo.

Diciembre del 2017



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Obtención de la proteína E2 y ensayos de interacción del complejo
de inicio de la replicación del VPH16

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

PRESENTA

QBT JESÚS ALONSO GÁNDARA MIRELES

APROBADA POR EL COMITÉ TUTORAL

D.C. MARIA LETICIA SAUCEDO MENDIOLA
Presidente

D.C. GERARDO ALFONSO ANGUIANO VEGA
Secretario

D.C. ESTELA RUIZ BACA
Vocal

Durango, Dgo.

Diciembre del 2017

DEDICATORIA

A mis padres

Definitivamente yo no estaría aquí si no fuera por mi padre, gracias por guiarme a este camino, aunque algunas veces lo dude ahora sé que fue la decisión correcta al igual que siempre seguiré escuchándote. Eres la persona más inteligente que conozco, sin duda este grado también es tuyo gracias por todo mamá.

A mis hermanos

Gracias por apoyarme todo este tiempo, sin duda ustedes son parte de esto.

A mis amigos

Gracias por estar siempre conmigo, por más largo que fuera el camino estando acompañado siempre pareció más corto. Pensando en ustedes todo mi trabajo y todo mi esfuerzo les dedico.

AGRADECIMIENTOS

A Dios 2.3.4.2

A la DC. María Leticia Saucedo Mendiola por su tiempo, su paciencia y por todas sus enseñanzas le estaré siempre agradecido.

A mis maestros que de alguna u otra manera contribuyeron en mi formación académica.

A mis compañeros quienes me hicieron crecer como persona les agradezco.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grados centígrados
Amp	Ampicilina
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CaCu	Cáncer cérvico uterino
GaBrEt	Gel agarosa bromuro de etidio
Kan	Kanamicina
LB	Luria Bertani
LCR	Región larga control
mL	Mililitro
l	Microlitro
mM	Milimolar
NCBI	Centro nacional de biotecnología informática
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIP	Neoplasia intraepitelial de pene
NIV	Neoplasia intraepitelial valvular
nm	Nanómetro
NOVA	Neoplasia intraepitelial vaginal
PaVe	Papiloma Virus Episteme
rE2	Recombinante E2
TAD	Dominio de transactivación
L	Microlitros
VPH	Virus del papiloma humano

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO.....	II
ABREVIATURAS.....	III
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Virus del papiloma humano.....	1
1.2 Estructura del virus.....	2
1.3 Genoma viral.....	2
1.4 Proteína E2.....	3
1.5 Proteína E1.....	5
1.6 Región Larga Control (LCR).....	6
1.7 Replicación del ADN viral.....	7
1.8 Infección y patología.....	7
1.9 Virus del papiloma y cáncer.....	7
1.10 Tratamiento.....	9
1.11 Profilaxis.....	10
II ANTECEDENTES.....	11
III JUSTIFICACIÓN.....	15
IV OBJETIVOS.....	16
4.1 Objetivo general.....	16
4.2 Objetivos particulares.....	16
V MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1 Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivos.....	17

5.2	Amplificación de la región larga control (LCR) del VPH16 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	17
5.2.1	PCR punto final	18
5.3	Purificación del amplicón LCR.....	19
5.4	Amplificación del marco de lectura abierto del gen E2 del VPH 16 por PCR.....	19
5.5	Preparación de células competentes <i>E.Coli TOP10F'</i>	21
5.6	Clonación del amplicón E2 en el plásmido pGEM-t-easy.....	21
5.7	Transformación de células competentes <i>E.Coli TOP10F'</i>	22
5.8	Extracción de pGEM-t-easy-E2.....	22
5.9	Digestión del plásmido Pgem-t-easy- E2	23
5.10	Subclonación del amplicón E2 del VPH16 en vector de expresión pET-28a(+)......	23
5.10.1	Digestión y purificación del vector pET-28a(+)......	23
5.10.2	Clonación del amplicón E2 en el vector pET28a(+)......	24
5.11	Preparación de células competentes y transformación de <i>E.coli BLR 21</i>	24
5.12	Extracción y digestión del plásmido pET-28a(+)/E2.....	24.
5.13	Secuenciación del plásmido pET-28a(+)/E2.....	25
5.14	Expresión del gen E2 del VPH16	25
5.15	Purificación de la proteína rE2.....	26
5.16	Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).....	26
VI	RESULTADOS.....	27
6.1	Amplificación de la LCR.....	27
6.2	Amplificación del gen E2 del VPH16.....	28
6.3	Transformación de células competentes <i>E.coli TOP10F'</i>	28
6.4	Purificación del producto de la digestión del plásmido pGEM-t-easy/E2.....	29
6.5	Linealización y digestión del plasmido pET-28a(+)......	30
6.6	Transformación de células competentes <i>E.coli BLR21</i>	30

6.7	Alineamiento del plásmido pET-28a(+)/E2 y la secuencia reportada en PaVe.....	32
6.8	Análisis de los extractos celulares tras inducción.....	33
6.9	Purificación de la proteína rE2.....	34
6.10	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)	35
VII	DISCUSIÓN.....	36
VIII	CONCLUSIONES.....	39
IX	PERSPECTIVAS.....	40
X	BIBLIOGRAFÍA.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág
		.
1	Cápside del virus del papiloma humano.....	2
2	Organización del Genoma del VPH	3
3	Estructura tridimensional de la proteína E2.....	4
4	Secuencia del LCR del VPH16.....	18
5	Marco de lectura abierto del gen E2 del VPH 16.....	21
6	Electroforesis en GaBrEt 1% del amplicón LCR	27
7	Electroforesis en GaBrEt 1% del amplicón LCR purificado	27
8	Electroforesis del amplicón E2 en GaBrEt 1%	28
9	Electroforesis visto en GaBrEt 1 % del ADN plasmidico pGEM-t-easy-E2.....	29
10	Electroforesis visto en GaBrEt 1 % del plasmido pGEM-t-easy-E2 digerido.....	29
11	Electroforesis en GaBrEt 1% de la purificación del inserto E2.....	30
12	Electroforesis del pET-28a(+) linealizado y digerido visualizado en GaBrEt 1%.....	30
13	Electroforesis en GaBrEt 1% del plásmido pET-28a(+)/E2.....	31
14	Electroforesis en GaBrEt 1% de la digestión del plásmido pET-28a(+)/E2.....	31
15	Alineamiento del plásmido pET28a(+)-E2 y la secuencia E2 reportada en PaVe.....	32
16	Análisis de los extractos celulares tras inducción en SDS-PAGE 10%.....	33
17	Análisis de los extractos celulares tras inducción con SDS-PAGE 10%.....	34
18	SDS-PAGE 10% de la proteína Re2 del VPH 16 purificada.....	34
19	Electroforesis en GaBrEt 1% del ensayo de interacción E2-LCR por EMSA.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la LCR del VPH16.....	18
2	Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del Gen E2 del VPH16.....	20

RESUMEN

Introducción: la infección virus del papiloma humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual más común, tanto en hombres como en mujeres y la persistencia de esta infección es el principal agente causal del cáncer cervicouterino.

El cáncer cervicouterino es uno de los tipos de cáncer más comunes en las mujeres a nivel mundial, con una incidencia global estimada de 527,000 nuevos casos y aproximadamente 265,000 muertes al año, una gran proporción de éstas (80%) ocurren en países en vías de desarrollo. En México, el 13.9 % de defunciones se deben al cáncer cervicouterino.

Actualmente no existe ningún tratamiento antiviral para la infección de VPH, las terapias actuales para la displasia cervical y cáncer implican la destrucción o la eliminación del tejido infectado por agentes citotóxicos o cirugía. Las vacunas profilácticas contra el VPH no ofrecen ningún beneficio para los millones de hombres y mujeres que ya están infectados con el VPH, esto ha llevado a buscar nuevas terapias, fármacos y procedimientos que puedan ayudar al tratamiento contra esta enfermedad. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue obtener la proteína E2 y realizar ensayos de interacción E2- LCR de manera *in vitro*. **Materiales y Metodos:** la amplificación del gen E2 se realizó por PCR punto final, para después ser clonado en el vector pGEM -t- easy en la cepa de *E.Coli TOP 10F'*, el amplicón E2 fue digerido, purificado y subclonado en el vector de expresión pET-28a(+) en la cepa *E.coli BLR21*, se cultivó en medio LB adicionado con kanamicina, se utilizó IPTG 0.5mM como inductor y se cultivó por 10 horas a 37°C/200rpm adicionales. La proteína rE2 de 39kDa de peso fue purificada usando cromatografía de afinidad. Una vez obtenida la proteína se realizaron ensayos de interacción por cambio en la movilidad electroforética (EMSA) con la región larga control. **Resultados:** El análisis SDS-PAGE 10% de la purificación de proteínas mostró una banda correspondiente a 39kDa de peso molecular, los ensayos EMSA mostraron una banda con retardo en comparación del control. **Conclusiones:** Se obtuvo la proteína rE2 purificada, a través de los ensayos de interacción EMSA se detectó la interacción E2-LCR.

ABSTRACT

Introduction: human papillomavirus (HPV) infection is the most common sexually transmitted disease, both in men and women. Persistent HPV infection is the leading causative agent of cervical cancer.

Cervical uterine cancer is one of the most common cancers in women worldwide, with an estimated global incidence of 527,000 new cases and approximately 265,000 deaths per year, a large proportion of these (80%) occur in developing countries. In Mexico, 13.9% of deaths are due to cervical cancer.

Currently there is no antiviral treatment for HPV infection, current therapies for cervical dysplasia and cancer involve destruction or removal of infected tissue by cytotoxic agents or surgery. The prophylactic HPV vaccine does not offer any benefit for the millions of men and women who are already infected with HPV, this has led to the search for new therapies, drugs and procedures that can help in the treatment of this disease. For this reason, the aim of this work was to obtain the E2 protein and carry assays of interaction E2-LCR *in vitro*. **Materials and Methods:** The amplification of the E2 gene was performed by PCR endpoint, to be later cloned in the pGEM -t- easy vector in the *E. coli* TOP 10F' strain, the E2 amplicon was digested, purified and subcloned in the PET-28a (+) expression vector in the *E. coli* BLR21 strain, was cultured in LB medium add kanamicine. The 39kDa rE2 protein of 39kDa weight was purified using affinity chromatography. After the protein was obtained, assays of interaction by change in electrophoretic mobility (EMSA) with the long control region were carried. **Results:** The SDS-PAGE10% analysis of protein purification showed a band corresponding to 39 kDa molecular weight, EMSA assays showed a delayed band compared to control. **Conclusions:** Purified rE2 protein was obtained, E2-LCR interaction was detected through the EMSA interaction assays.

I. INTRODUCCIÓN

La infección por virus del papiloma humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual más común, tanto en hombres como en mujeres y la persistencia de esta es el principal agente causal del cáncer cervicouterino (CaCu) (Cherry, 2013, López, 2016).

El CaCu a nivel mundial es uno de los tipos de cáncer más comunes en mujeres ocupando el segundo lugar con un estimado de 265,000 muertes y 527,000 casos nuevos al año (OMS, 2016).

Cada año, se encuentran cerca de 33,000 casos nuevos de cáncer, localizándose frecuentemente en pene, vagina, ano, boca y garganta.

INEGI reportó 5,997 muertes por Ca.Cu. en México, mientras que en Durango tasa de 9/100,000 mujeres en 2014.

Sorprendentemente, en la actualidad no existe ningún fármaco antiviral disponible para el tratamiento de las enfermedades asociadas con el VPH a pesar de la alta incidencia de estos virus en la población sexualmente activa. Por lo tanto, la necesidad de agentes antivirales para tratar las enfermedades asociadas con el VPH sigue siendo grande.

La formación del complejo LCR-E2-E1 en el inicio de la replicación es un blanco terapéutico atractivo para el futuro desarrollo de un fármaco.

1.1 Virus del papiloma humano

La familia de los papilomavirus constituye un grupo muy heterogéneo de virus, se distinguen más de 100 genotipos diferentes que han sido identificados en humanos. Los VPH genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, y 68 son considerados oncogénicos (carcinogénicos) o tipos de “alto-riesgo”; mientras que los tipos 26, 53 y 56 son “probablemente de alto-riesgo” (Muñoz, 1997), dentro del grupo de los no oncogénicos o de bajo riesgo están 6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 89 (Lizano et al, 2009; Doorbar,2012; Castro, 2013).

1.2 Estructura del virus

Los VPH tienen un diámetro aproximado de 55 nm y contienen un genoma viral el cual está asociado con proteínas parecidas a histonas (Figura 1) (Mendoza et al, 2007).

El análisis estructural mediante crio-microscopía electrónica empleando reconstrucciones tridimensionales, revela que los Papillomavirus, como en el caso de los *Polyomavirus*, están formados por dos tipos de capsómeros: 60 hexavalentes, que contactan con 6 capsómeros vecinos y 12 pentavalentes que contactan con 5 capsómeros vecinos. La cápside viral está constituida por las proteínas estructurales L1 y L2 (Ruiz, 2010).



Figura 1. Cápside del Virus del papiloma humano (Guzmán, 2015).

1.3 Genoma viral

El genoma de ADN de doble cadena viral consta de alrededor de 8,000 pares de bases y contiene 8 marcos de lectura abierta (ORF) y una región no codificante. Se divide en tres regiones: (a) LCR la cual cubre aproximadamente el 10% del genoma, (b) Región temprana (E -early) y (c) Región tardía (L- late).

Los genes (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) están relacionados con la modulación de los procesos de transformación celular, replicación y transcripción viral. La región de expresión tardía contiene los genes L1 y L2 que codifican para las dos proteínas estructurales de la cápside viral (Figura 2) (Cortés, 2001; García 2010 *et al* ; Álvarez, 2012).

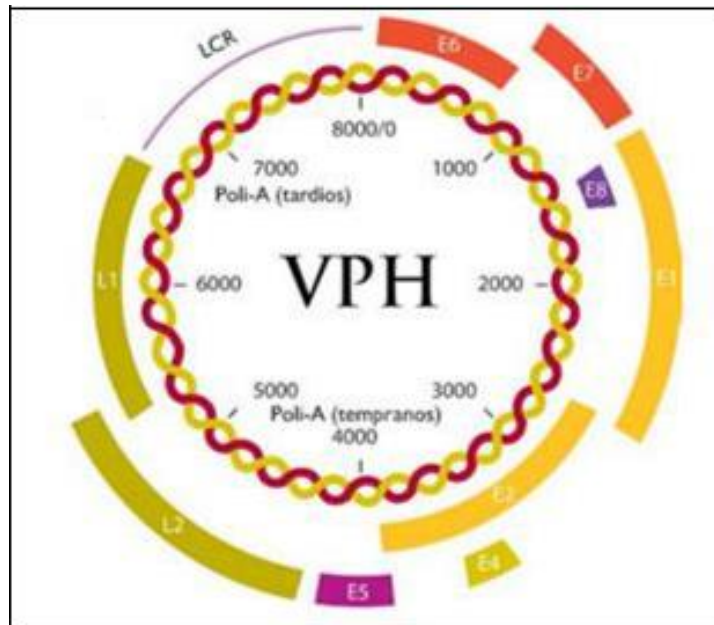


Figura 2. Organización del Genoma del VPH. Región temprana E (E1,E2,E4,E6 yE7), Región Tardía L (L1 y L2), LCR (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006).

1.4 Proteína E2

El gen E2 es uno de los genes más conservados y está formado de aproximadamente 1089 pb, codifica una proteína nuclear de 39 kDa, la que se divide en tres dominios funcionales (Figura 3). El primero, en el extremo amino terminal, es el dominio de activación “E2TAD”, responsable de regular la transcripción y la replicación del ADN viral; el segundo dominio es el de bisagra o dominio central, de longitud y secuencia más variable entre los VPH. En el VPH 11, el dominio central es importante para regular la función de E2 durante la transcripción del ARNm y la replicación viral,

además de proporcionar estabilidad al complejo E2-ADN. El tercer dominio, en el extremo carboxilo terminal, es de dimerización y de unión al ADN, de aproximadamente 100 aminoácidos. La proteína E2 de todas las cepas virales tienen en común el hecho unirse a una secuencia de ADN palindrómica (ACCgNNNNcGGT, las letras pequeñas indican los nucleótidos preferidos; la región NNNN es llamada espaciador), referida como el sitio de unión a E2. No obstante, existen diferencias específicas en cepas virales en cuanto a la habilidad de la proteína E2 para discriminar entre los sitios de unión (Rashmi, 1998; Hegde, 2002).

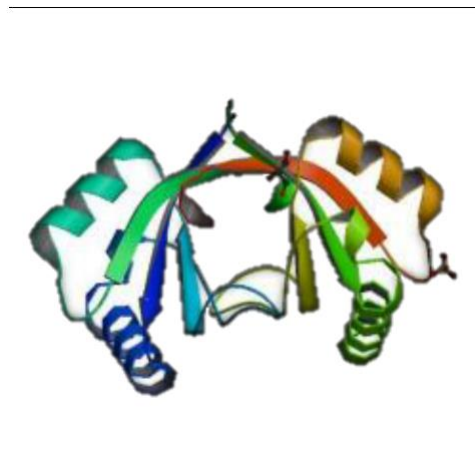


Figura 3. Estructura tridimensional de la proteína E2 (PDB-ID: 2AYE).

La proteína E2 del VPH exhibe funciones complejas independientes de la transcripción y puede modular las células hospederas con respecto al ciclo replicativo viral. Existen resultados que señalan que esta proteína podría estar involucrada en la carcinogénesis temprana. La proteína E2 actúa como un represor de la transcripción de los genes E6 y E7, además está involucrada en la transcripción y replicación viral, formando conjuntamente con E1 un complejo con origen viral de replicación y reclutamiento de la maquinaria replicativa del ADN celular, para facilitar la replicación del ADN viral.

Se ha demostrado que E2 es expresada en concentraciones relativamente elevadas, en células diferenciadas de las capas intermedias de las lesiones neoplásicas

intraepiteliales cervicales. Por otra parte, su expresión es disminuida con la progresión de lesiones y está ausente en la mayoría de los tumores *in situ*, siendo inversamente correlacionada con la expresión de E7. E2 es una proteína inestable expresada tanto en núcleo como en el citoplasma de la célula infectada, y es degradada a través de los proteosomas (Beltrán,2014).

1.5 Proteína E1

El gen *E1* es el más grande y de los genes más conservados de VPH, tiene un peso de 76.2 kDa codifica para una proteína nuclear de 593 a 681 aminoácidos. La proteína se divide en tres regiones: un dominio amino terminal, que se sospecha regula las actividades de E1 residentes en el C-terminal, pues es blanco de una serie de fosforilaciones que influyen positiva o negativamente en la función; una región espaciadora de longitud variable y una región carboxilo terminal más grande, relacionada en función a las ATPasas y helicasas. E1 es una 3' → 5' helicasa hexamérica dependiente de ATP, que participa en la replicación del DNA 11 viral. Estas funciones de ATPasa y de helicasa hacen de esta proteína viral la única con actividad enzimática y se hallan codificadas en el dominio carboxilo terminal. E1 se une al origen de replicación, en una secuencia palindrómica de 18 pb rica en A y T que se halla en la LCR, formando hexámeros y dobles hexámeros. El hexámero rodea al ADN de modo que el sustrato pasa a través del centro del anillo hexamérico. La unión de E1 al sitio de origen causa una curvatura, crítico para el correcto ensamblaje del complejo de iniciación y para las primeras etapas de desenrollamiento de la doble hélice. Las interacciones E2-E1 hacen que E2 atraiga otras moléculas de E1 a un complejo inicial E2-E1-DNA conforme se ensamblan oligómeros más grandes de E1, E2 es finalmente desplazado mediante una reacción dependiente de ATP. Se ha demostrado recientemente que el dominio de unión al DNA de E1 (E1DBD) estimula la actividad transcripcional de E2 dependiente de E1, lo que sugiere que la interacción E1DBD - E2TAD funciona más en la regulación de la actividad transcripcional que en la replicación del DNA viral (Saavedra, 2006).

11.6 Región Larga Control (LCR)

La LCR es un segmento genómico, que no contiene marco de lectura alguno, El tamaño varía según el tipo viral, extendiéndose de un 7 a 11% del genoma y de casi 850 pb en el caso de los VPH genitales. La LCR puede dividirse en 3 partes: el promotor temprano, el amplificador o enhancer, de alrededor de 230 pb y la región más alejada del 5'. Numerosos factores, celulares y virales, interaccionan con esta región: por citar algunos, las proteínas virales E1 y E2 que modulan la actividad transcripcional y la replicación del virus así como receptores de glucocorticoides que modulan positivamente la transcripción. El promotor temprano, responsable de la transcripción de los oncogenes virales, es activo en células de tejido de cáncer cervical o en los queratinocitos de la piel. Sin embargo, no es activo en las células epiteliales del hígado (HepG2) o del seno (MCF7). Esta especificidad por el tejido, no muy común en muchos virus, corresponde al amplificador transcripcional o enhancer (Giroglou *et al*, 2001).

Se conocen diversos factores proteicos de las células epiteliales asociados a la actividad transcripcional del promotor, que pertenecen a familias de proteínas cuyos miembros se hallan en diferentes cantidades en los diferentes tipos celulares. El complejo proteico que se ensambla en el enhancer, conocido como el enhanceosoma, interacciona con las proteínas del aparato basal de transcripción, que se unen en la región promotora hacia el extremo 3' del LCR, aumentando de esta manera la actividad transcripcional del promotor y por ende la expresión de los genes tempranos. Para la replicación viral se necesita que E2 se una a la LCR y que promueva la unión de E1 en el sitio de origen de la replicación viral. El ensamble de las partículas virales ocurre en el estrato granuloso del epitelio y eventualmente las células infectadas se descaman de la capa superior de este. El virus es estable extracelularmente ya que es resistente a la desecación y puede ser transmitido directamente a otros individuos (Saavedra, 2006).

1.7 Replicación del ADN viral

La replicación del ADN del VPH inicia por la unión cooperativa de E1 y E2 en una secuencia específica del origen viral. La formación de este complejo (E1-E2-ori) es dependiente de la interacción de ambas proteínas con el ADN, pero también en una crítica interacción entre el dominio de transactivación N-terminal (TAD) de E2 y el dominio enzimático C-terminal de E1. Al ensamblarse este complejo inicial E1-E2-ori funciona como un punto iniciador para el reclutamiento de moléculas adicionales de E1 y juntos forman un hexámero y doble hexámero el cual tiene actividad ATPasa y helicasa (White, 2003).

1.8 Infección y patología

El VPH infecta células epiteliales basales, causando lesiones benignas y malignas de la piel y las mucosas. Se han identificado 150 genotipos, de los cuales 40 son considerados de tipo genital. En las mujeres infectadas con VPH de los considerados de alto riesgo generalmente son detectadas lesiones cervicales benignas y precursores del carcinoma cervical, así como casos de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (Saavedra, 2006).

El VPH puede no manifestar síntomas y, en muchas personas, no llega a causar problemas de salud, sino que el virus es eliminado por el sistema inmune del organismo. Sin embargo, cuando la infección por VPH no se cura, y dependiendo del tipo de virus involucrado puede provocar desde verrugas genitales, hasta enfermedades graves, como diversos tipos de cáncer (Jeon, 1995).

1.9 Virus de papiloma y cáncer

Se han aislado varios tipos de VPH de tumores malignos, particularmente de cáncer de cérvix y otros cánceres anogenitales, también cáncer de piel, cavidades oral y nasal

asociados con infecciones por VPH. De la misma manera, los tipos 5 y 8 se han encontrado en cáncer de piel en pacientes con enfermedades raras como epidermodisplasia verruciformis.

La evolución del cáncer de cuello de útero supone el desarrollo progresivo de varias etapas. Al inicio las células epiteliales del cuello uterino presentan ciertas anomalías histológicas conocidas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) o, lo que es lo mismo, displasia leve; luego ocurre la displasia moderada; en tercer lugar, ocurre la displasia severa o carcinoma *in situ* y, finalmente, un cáncer invasor (Saavedra, 2006).

Varios estudios epidemiológicos han demostrado que aproximadamente el 85% de las displasias severas presentan el ADN del papilomavirus, y el 100% de los cánceres invasores de cérvix presentan el virus. Más del 90% de los cánceres cervicales pueden originarse por determinados tipos de VPH, ya que se han encontrado presentes de VPH de alto riesgo, y algunos investigadores proponen que la infección por este tipo de agentes sea la causa directa del cáncer cervical. Sin embargo, la presencia y expresión de virus aparentemente es insuficiente para la carcinogénesis, se considera que factores ambientales o genéticos, como el cigarrillo y la predisposición genética están ligados a carcinogénesis de cérvix asociada a VPH de alto riesgo, también la exposición a estrógenos (por ejemplo, en anticonceptivos orales) duplica el riesgo de neoplasia y malignidad por VPH. Además, están considerados como cofactores los antígenos de histocompatibilidad, la respuesta inmunológica, la influencia de las hormonas y otros agentes de transmisión sexual como *Chlamydia trachomatis* (Muñoz N, 1997), aunque ciertas investigaciones realizadas sobre líneas celulares de epitelio oral sugieren que el VPH por si solo puede inducir la transformación si permanece activo (Cortés, 2001).

Los VPH más reconocidos por su malignidad son el tipo 16 y el 18, ya que se han identificados como el agente causal de más del 90% de los cánceres de cérvix y se encuentran ligados al 50% de los otros cánceres anogenitales, de ellos el VPH16 representa la mayor proporción (50%), seguido por VPH 18, además los VPH 45 (8%), y VPH 31 (5%) (Cortés, 2001). Ciertas observaciones indican que en la infección inicial el VPH está presente de forma episomal, pero en la mayoría de las lesiones avanzadas

y tumores invasivos el VPH está integrado al genoma del hospedero (Cortés, 2001), por lo tanto la integración del DNA del VPH al genoma está correlacionada con el incremento en la expresión de genes virales y el avance del desarrollo celular, otras observaciones corroboran la hipótesis de que la integración provee un incremento selectivo de los precursores de carcinoma de epitelio cervical (Jeon, 1995).

1.10 Tratamiento

En la actualidad no existe un fármaco para eliminar la infección por el VPH y aunque existen algunas terapias para ayudar a contrarrestar sus efectos estas no han tenido una alta tasa de efectividad. Las terapias actuales para las infecciones por VPH anogenitales son en su mayoría de ablación o citodestrucción (Krogh et al 2000). Las terapias ablativas para las verrugas genitales incluyen escisión, crioterapia, terapia láser y electrocirugía. Las terapias ablativas como la crioterapia son a menudo muy corto plazo, con efectividad de 70 a 80%, sin embargo las tasas de recurrencia pueden ser hasta de un 25 a 39%. Las infecciones asociadas a VPH ano genital como NIC 3 (Neoplasia Intraepitelial Cervical) que se presenta casi exclusivamente en la unión escamo-columnar por lo tanto, la enfermedad es localizada y a pesar de que la infección puede ser tratada por terapias locales y escisión en la zona de transformación son muy eficaces, sin embargo, NIA (neoplasia intraepitelial anal), NIP (neoplasia intraepitelial del pene), NOVA (neoplasia intraepitelial vaginal) y NIV (neoplasia intraepitelial vulvar) son a menudo multifocales, la enfermedad y la infección son regionales y la ablación puede no ser factible o si se intenta puede resultar ineficaz (Jones, 2001).

Existen tratamientos no quirúrgicos, los agentes citotóxicos son un ejemplo de estos. Son ampliamente utilizados en el tratamiento de las verrugas genitales, son preparaciones tópicas que matan a las células en contacto independientemente del estado de VPH, por modo de acción anti-proliferativa. La podofilotoxina es la primera línea de tratamiento para las verrugas genitales, tiene un porcentaje de efectividad del 50%, pero con tasas de recurrencia de 25-30%. El mecanismo de acción se cree que es debido a la unión de ligandos a las proteínas de microtúbulos con detención del

ciclo celular en la metafase. Cabe señalar que la podofilotoxina está contraindicado en el embarazo (Krogh *et al*, 2000). El Imiquimod tiene un agente farmacológico que puede modular la respuesta inmune innata. Imiquimod es un agonista para el receptor, activa las células dendríticas, los macrófagos y los queratocitos para liberar interferones de tipo (IFN) y otras citoquinas pro-inflamatorias. Es factible que Imiquimod tenga un efecto terapéutico sobre pequeñas lesiones intra-epiteliales como las de NIV en las que han demostrado eficacia, pero el fármaco no tiene licencia para su uso, ya que la respuesta inflamatoria provoca efectos secundarios como edema, prurito y dolor que han limitado su uso en las superficies mucosas (Stanley, 2012).

1.11 Profilaxis

Existen tres vacunas profilácticas contra el VPH disponibles comercialmente, una vacuna bivalente (CervarixTM) protegen contra el VPH 16 y 18, de Glaxo Smith Kline Biologicals y una vacuna tetravalente (Gardasil®) protegen contra el VPH 6,11,16,18 VLP (qHPV) de Merck & Co., Inc. (Stanley,2012). Ambas vacunas han demostrado una eficacia muy alta contra los VPH 16/18 (Kjaer *et al.*, 2009; Paavonen *et al.*, 2009). El VPH o PV ha demostrado una eficacia superior al 98% contra las verrugas genitales asociadas con el VPH 6/11 (mujeres y hombres), los VPH 6/11/16/18 asociado con el VIN, el VAIN (mujeres) y el AIN (hombres) (Dillner *et al.*, 2010). La vacuna nonavalente (Gardasil®9) de Merck & Co., Inc., protege contra los virus del papiloma humano tipos 6,11,16,18,31,33,45,52 y 58.

Las 3 vacunas, bivalente, tetravalente y nonavalente son vacunas compuestas principalmente por partículas similares al virus (VLP), las cuales se autoensamblan a partir de copias de L1 (la proteína estructural principal del virus), dando lugar a una estructura similar a la cápside del virus y que es capaz de inducir la producción de anticuerpos protectores frente al virus auténtico. Las VLP son partículas no infecciosas y no oncogénicas, puesto que carecen de ADN viral (Bruni *et al*, 2015).

II. ANTECEDENTES

La infección por el virus del papiloma humano es el principal agente causal del cáncer cervical, entre sus productos génicos encontramos a las proteínas E1 y E2, las cuales tienen la función de unirse para formar un complejo que da inicio a la replicación viral.

Actualmente se han reportado diversos estudios donde han utilizado diferentes sistemas de expresión y purificación de las proteínas virales E1 y E2 de los diferentes tipos de VPH, así como diferentes metodologías para evaluar la interacción proteína-proteína y proteína-DNA.

Una de las primeras investigaciones fue la reportada por Sedman *et al* en 1997, cuyo objetivo fue analizar la unión de la proteína E1 en el origen de replicación en presencia y ausencia de la proteína E2 del virus del papiloma bovino.

Para la expresión de la Proteína E2 utilizaron células competentes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) las cuales fueron transformadas con el plásmido de expresión pETE2. Se inocularon cultivos líquidos y se cultivaron a temperatura estrictamente controlada (19 a 20°C) hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó 0.6. Los cultivos fueron inducidos por la adición de IPTG 0.3 mM y se cultivaron por 18 hrs adicionales.

La purificación se llevó a cabo con una columna con sefarosa, las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE. Se estimó que las fracciones máximas eran superiores al 95% de pureza, y el rendimiento fue de 1 a 2 mg de proteína/litro de cultivo.

La proteína E1 se expresó como una proteína de fusión N-terminal GST. *E. Coli* BL21 (DE3) fue transformada con el vector de expresión E1GST (glutathion S-transferasa)-E1. Los cultivos líquidos fueron inoculados y cultivados a 25°C. Los cultivos se indujeron con IPTG cuando se alcanzó una densidad óptica de 0.6 a 600 nm y se cultivaron durante 12 h más. La purificación se llevó a cabo con una columna con glutatión-agarosa. Una vez que tenían las proteínas recombinantes se realizaron ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA). El ADN en el origen fue radiomarcado, se realizaron diferentes reacciones; la primera contenía el ADN

radiomarcado, la proteína E1 y un tampón de unión. La segunda reacción que solamente remplazaba la proteína E1 por la E2, la tercera reacción que contenía el ADN radiomarcado, las 2 proteínas y el buffer de unión.

Los resultados obtenidos en el gel de agarosa después de la autoradiografía, mostraron que la reacción que contenía la proteína E2 era considerablemente más visible que la que no lo contenía, se pudo comprobar que en ausencia de la proteína E2 la proteína E1 se une al ADN en el origen, sin embargo la unión era espontánea.

Los resultados también sugieren que el ori contiene múltiples secuencias de reconocimiento E1 individuales que se superponen, que en conjunto constituyen el sitio de unión E1 y que diferentes subconjuntos de estas secuencias de reconocimiento se utilizan para la unión de E1 en presencia y ausencia de E2.

White *et al* en el año 2003 realizaron una investigación con el fin de evaluar la unión cooperativa de la proteína E1-E2 y el ADN en el origen LCR. Para expresar la proteína E2 del VPH 11 utilizaron el vector expresión pET28b el cual expresa una proteína fusionada a una etiqueta de histidinas, la expresión de E1 se realizó ligando el producto de PCR (E1) a un vector pCR3.1. Los plásmidos de expresión se utilizaron para transformar *Escherichia Coli* BL21 (DE3). La inducción de la expresión de los genes E1 y E2 fue con IPTG 0.5mM., las proteínas recombinantes obtenidas fueron purificadas por cromatografía de afinidad en níquel-agarosa y cromatografía de exclusión. Para realizar los ensayos de unión entre E1-E2 y el ADN, este último fue radiomarcado con P³³, la proteína E1 fue ligada a un anticuerpo anti-E1 el cual estaba acoplado a perlas SPA, de esta manera al darse la unión entre el origen del ADN y E2 este llamaba a la unión de la proteína E1, el ADN radiomarcado excitaba el centelleo contenido dentro de estas perlas SPA, detectando así la unión cooperativa del complejo.

Hernández *et al* en el 2008 realizaron un trabajo cuyo objetivo fue verificar la estabilidad del extremo N-terminal TAD y la importancia que tiene en la transactivación, introduciendo sustituciones de aminoácidos individuales en el dominio TAD, y observando cómo afectan estas sustituciones en la transactivación y su unión con el ADN en el LCR. Para la expresión de E2 del VPH 16, utilizaron el vector pET30

(Novagen), el cual incluía una etiqueta His-tag en el extremo C-terminal. En la inducción de la proteína se utilizó la cepa *Escherichia Coli* BL21 (DE3), se utilizó como agente inductor IPTG 1mM y se cultivó por 3 h adicionales a 25°C. La proteína E2 recombinante fue purificada por cromatografía de afinidad níquel-agarosa seguido de cromatografía de unión a heparina, esta se visualizó mediante electroforesis SDS-PAGE 8% y WesternBlot con anticuerpo primario de conejo anti-E2.

Las reacciones de unión se llevaron a cabo utilizando un kit de ensayo de cambio de movilidad electroforética quimioluminiscente (EMSA) LightShift, las mezclas de reacción contenían 20 l de proteína purificada, y se incubaron con 50m/mol de ADN marcado con biotina durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las mezclas de reacción que carecían de proteína o que contenían un competidor sin marcaje (10 pmol de ADN no marcado) se incluyeron como controles. Los productos de reacción se visualizaron en geles de poliacrilamida al 8% y se transfirieron a una membrana de nylon cargada positivamente para detección quimioluminiscencia. Encontrándose que incluso con las mutaciones que se habían inducido la formación del complejo de inicio de la replicación permanecía intacto, esto se demostró con el retardamiento de las bandas visualizadas en el gel de poliacrilamida, lo que indicaba la unión entre la proteína y el ADN durante los ensayos EMSA. Mientras que el efecto de las mutaciones en el ADN se visualizó mediante microscopía de fuerza atómica.

Resendiz V. en el 2015 realizó un estudio de cambio de la movilidad electroforética (EMSA) con el objetivo de estudiar la estabilidad de las cápsides que interaccionan en diferentes condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura con el ARN, mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). Para la expresión de las proteínas de la cápside se empleó un vector pSB1C3 y se ligó el fragmento “CCMV” de la proteína de la cápside. Para la transformación se utilizó *Escherichia. Coli BL21 (DE3)*, la inducción se llevó a cabo preparando 2 L de medio LB con cloranfenicol (34 µg/mL) y 1.25 mM de glucosa para aumentar la producción de la proteína, el cultivo se incubó a 37°C y 180 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 600 nm, para posteriormente inducir la expresión con IPTG 1.25 mM. El cultivo se incubó con el inductor durante 50 h a una temperatura de 30°C. La purificación de la proteína se

llevó acabo utilizando una celda de ultrafiltración Amicon ® (8050 System) con una membrana de 10,000 kDa bajo 20 psi de presión con nitrógeno y dializado dos veces utilizando una membrana de diálisis de 14,000 kDa en amortiguador de desensamble durante 4 horas. Para finalizar se realizaron ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) en los cuales la mezcla de reacción contenía la proteína de la capsida (CCMV) y ARN previamente extraído, el cual en condiciones normales debería unirse a esta proteínas lo que provocaría el abrir de los poros de la membrana de la cápside indicando que la proteína era funcional. El ensayo EMSA se realizó en geles de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de etidio. Se logró comprobar la estabilidad de la cápside, esta fue evidenciada mediante la entrada del bromuro de etidio para el marcaje del ARN en geles de agarosa, de esta manera fue posible observar la interacción entre el ARN y la proteína.

III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer cérvicouterino (Ca.Cu.) representa un problema de salud pública a nivel mundial, produciendo 265,000 muertes y 527,000 casos nuevos al año. El Ca.Cu. ocupa el segundo lugar como causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas, su principal agente etiológico es el VPH.

Actualmente no existe cura para la infección por el VPH, lo que hace imperante la necesidad de un fármaco para el tratamiento de dicha infección.

La proteína E2 del virus de papiloma humano es un blanco atractivo para el desarrollo de agentes anti VPH debido a su participación directa en la replicación del ADN viral. La interacción E2-LCR es esencial para el inicio de la replicación del ADN viral.

IV.OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Obtener la proteína rE2 del VPH tipo 16 y realizar ensayos de interacción E2- LCR

4.2 Objetivos particulares

- 1.- Amplificar la LCR a partir del ADN genómico del VPH16 por PCR punto final.
- 2.- Amplificar el gen E2 del VPH16 y clonarlo en el vector pGEM-t-easy.
- 3.-Subclonar el gen E2 del VPH16 en vector pET-28a (+)
- 4.-Obtener la proteína rE2 y purificarla por cromatografía de afinidad
- 5.-Realizar ensayos de Interacción E2-LCR mediante EMSA

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo

Se usó la cepa de *Escherichia Coli* (*TOP10F'*) F' $\{\text{lacIq Tn10 (TetR)}\}$ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG, *Escherichia coli* (*BLR21*) genotipo F⁻ ompT gal dcm hsdSB(rK-mB⁻) Δ (srl-recA)306:Tn10(TetR), así como los plásmidos pGEM-t-easy y pET-28a(+).

Para el crecimiento y mantenimiento de la cepa se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) el cual contiene (p/v): extracto de levadura (0.5%); peptona (1.0%); cloruro de sodio (1.0%); agar bacteriológico (2%). Cuando se requirió, los medios fueron suplementados con Amp o kan a una concentración final de 50 g/mL. Las cepas se cultivaron a 37°C en medio líquido y/o sólido. Los cultivos en medio líquido se mantuvieron en agitación a 200 rpm.

5.2 Amplificación de la Región Larga Control (LCR) del VPH 16 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Con el propósito de amplificar la LCR se utilizó como templado DNA genómico de una muestra biológica con VPH 16 (donado por el Dr Gerardo Alfonso Anguiano Vega). Se diseñó un par de oligonucleótidos, uno directo y otro reverso utilizando la herramienta oligoanalyzer de la página www.idtdna.com/calc/analyzer de IDT, Las características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del LCR del VPH16 se muestran en la Tabla 1. La secuencia de la LCR del VPH 16 (Figura 4) se obtuvo de la página Papillomavirus Episteme (<https://pave.niaid.nih.gov/>).

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la LCR del VPH 16.

Oligonucleótido directo	5'caccacacacctcatctacc3'
%GC	60 %
Tm	57.2 °C
Oligonucleótido reverso	5'cctgtgggtcctgaaacatt3'
%GC	50 %
Tm.	55.1 °C

5' **CACCCACCACCTCATCTACC** TCTACAACCTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAAGTATTGTATGT
 ATGTTGAATTAGTGTGTTTGTGTGTATATGTTTGTATGTGCTTGTATGTGCTTGTAAATATTAAGTTG
 TATGTGTGTTTGTATGTATGGTATAATAAACACGTGTGTATGTGTTTTAAATGCTTGTGTAACCTATTGT
 GTCATGCAACATAAATAAACTTATTGTTTCAACACCTACTAATTGTGTTGTGGTTATTCATTGTATATAA
 ACTATATTTGCTACATCCTGTTTTGTTTTATATACTATATTTTTGTAGCGCCAGCGGCCATTTTTGTAG
 CTTCAACCGAATTCGGTTGCATGCTTTTTGGCACAAAATGTGTTTTTTAAATAGTTCTATGTCAGCAA
 CTATGGTTTAAACTTGTACGTTTCCTGCTTGCCATGCGTGCCAAATCCCTGTTTTCCCTGACCTGCACTG
 CTTGCCAACCACTCCATTGTTTTTACACTGCACTATGTGCAACTACTGAATCACTATGTACATTGTGT
 CATATAAAATAAATCACTATGCGCCAACGCCTTACATACCGCTGTTAGGCACATATTTTTGGCTTGTTT
 TAACTAACCTAATTGCATATTTGGCATAAGGTTTAACTTCTAAGGCCAACTAAATGTCACCCTAGTTC
 ATACATGAACTGTGTAAGGTTAGTCATACATTGTTTCACTTTGTAATAACTGCACATGGGTGTGTGCAAAC
 CGTTTTGGGTTACACATTTACAAGCAACTTATATAATAACTAACTACAATAATTCATGTATAAACT
 AAGGGCGTAACCGAAATCGGTTGAACCGAAACCGGTTAGTATAAAAGCAGACATTTTATGCACCAAAA
 GAGAACTGCAAT **GTTTCAGGACCCACAGGAGCGACC** CAGAAAGT3'

Figura 4. Secuencia del LCR del VPH16. Se muestra la secuencia del LCR del VPH16 (PaVE, HPV16REF.1), donde la secuencia en amarillo corresponde al oligonucleótido directo y en verde al oligonucleótido reverso.

5.2.1 PCR punto final

Los oligonucleótidos fueron diluidos con agua libre de nucleasas a una concentración de 100mM para usar una solución de trabajo de 10mM. La LCR fue amplificada en un SureCycler 8800 Thermal Cyclayer de Agilent Technologies. La reacción de PCR

contenía 0.4 L de DNA genómico, 5 L de buffer, 1.5 L de MgCl₂, 0.5 L de dNTP's, 0.5 L de oligonucleótido directo, 0.5 L de oligonucleótido reverso, 0.1 L Taq polimerasa y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 25 L. La reacción de amplificación se efectuó bajo las siguientes condiciones: etapa 1 a 94 °C por 4 min, etapa 2 a 57.6 °C por 1 min y etapa 3 a 72 °C por 1 min. Se repitieron las etapas durante 35 ciclos. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) conteniendo bromuro de etidio al 0.1%, (GABrET), para su visualización bajo luz UV se utilizó un fotodocumentador ChemiDoc de Bio-Rad.

5.3 Purificación del amplicón LCR

El amplicón LCR se visualizó en un gel de Agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, después de visualizarlo en un transiluminador (serie Benchtop UVP Single UV) se purificó utilizando el kit Wizard Sv Gel and PCR clean-up system (Promega).

Las bandas correspondientes al tamaño de pb de LCR (913pb) se cortaron utilizando un bisturí y se depositaron en un microtubo de 1.5 mL previamente pesado. Se agregó 100 L de solución de unión a la membrana y se incubó a 42°C hasta fundir el gel por completo. Se transfirió a la columna de purificación y se centrifugó a 16,000rpm por 1 min, el filtrado se descartó y se re inserto la columna, luego se agregaron 700 l de solución de lavado a la columna y se centrifugó a 16,000rpm por 1 min, se repitió el lavado con 500 l de solución de lavado. Se descartó el filtrado y a la columna se le agregaron 30 l de agua libre de nucleasas, se centrifugó por un minuto a 16,000 rpm y se visualizó en GaBrEt 1%.

5.4 Amplificación del marco de lectura abierto del gen E2 de VPH 16 por PCR.

Se amplificó el marco de lectura abierto del gen E2, utilizando como templado DNA genómico de una muestra biológica con VPH 16, para tal fin, se diseñaron un par de oligonucleótidos, uno directo al que se le agregó un sitio de corte para la enzima HindIII

y otro reverso con sitio de corte para la enzima BamHI, utilizando la herramienta oligoanalyzer de la página www.idtdna.com/calc/analyzer de IDT. Las características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen E2 del VPH16 se muestran en la Tabla 2. La Figura 5 muestra el marco de lectura abierto del gen E2 del VPH16 de 1089pb, obtenido de la página Papillomavirus Episteme (<https://pave.niaid.nih.gov/>).

La reacción de PCR contenía 0.4 L de DNA genómico, 5 L de buffer 5X, 0.5 L de dNTP`s, 0.5 L de oligonucleótido directo, 0.5 L de oligonucleótido reverso, 0.1 L Taq polimerasa y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 25 L. La reacción de amplificación se efectuó en un termociclador (Sure Cyclor 8800) bajo las siguientes condiciones: etapa 1 a 94 °C por 4 min, etapa 2 a 51.5 °C por 1 min y etapa 3 a 72 °C por 1 min. Se repitieron las etapas durante 30 ciclos. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) conteniendo bromuro de etidio al 0.1%, (GABrET) y visualizados en un fotodocumentador ChemiDoc de Bio-Rad.

Posteriormente el producto de amplificación se purificó utilizando el protocolo descrito en 5.3.

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la LCR del VPH 16.

Oligonucleótido directo	5'ggatccagactctttgcca3'
%GC	50 %
Tm	54.8 °C
Oligonucleótido reverso	5'cctgtgggtcctgaacatt3'
%GC	50 %
Tm.	55.1

```

5'GGATCCAGACTCTTTGCCAACGTTTAAATGTGTGTCAGGACAAAATACTAACACATTATGAAAATGATAGTACAG
ACCTACGTGACCATATAGACTATTGGAAACACATGCGCCTAGAATGTGCTATTTATTACAAGGCCAGAGAAATGGG
ATTTAAACATATTAACCACCAGGTGGTGCCAACACTGGCTGTATCAAAGAATAAAGCATTACAAGCAATTGAACTG
CAACTAACGTTAGAAAACAATATAAECTCACAATATAGTAATGAAAAGTGGACATTACAAGACGTTAGCCTTGAAGT
GTATTTAACTGCACCAACAGGATGTATAAAAAAACATGGATATACAGTGGAAAGTGCAGTTTGATGGAGACATATGC
AATACAATGCATTATACAACTGGACACATATATATTTGTGAAGAAGCATCAGTAACTGTGGTAGAGGGTCAAGT
TGACTATTATGGTTTATATTATGTTTCATGAAGGAATACGAACATATTTGTGCAGTTTAAAGATGATGCAGAAAAATA
TAGTAAAAATAAAGTATGGGAAGTTCATGCGGGTGGTCAGGTAATATTATGTCCTACATCTGTGTTTAGCAGCAAC
GAAGTATCCTCTCCTGAAATTATTAGGCAGCACTTGGCCAACACCCCGCCGCGACCCATACCAAAGCCGTCGCC
TTGGGCACCGAAGAAACACAGACGACTATCCAGCGACCAAGATCAGAGCCAGACACCGGAAACCCCTGCCACAC
CACTAAGTTGTTGCACAGAGACTCAGTGGACAGTGCTCCAATCCTCACTGCATTTAACAGCTCACACAAAGGACG
GATTAAGTGAATAGTAACACTACCCCATAGTACATTTAAAAGGTGATGCTAATACTTTAAAATGTTTAAAGATATAG
ATTTAAAAGCATTGTACATTGTATACTGCAGTGTCTGCTACATGGCATTGGACAGGACATAATGTTAAAACATAAAA
GTGCAATTGTTACACTTACATATGATAGTGAATGGCAACGTGACCAATTTTTGTCTCAAGTTAAAATACAAAAACT
ATTACAGTGTCTACTGGATTTATGTCTATATGACAAGCTTGATACTGCATCCACAACATTACTGGCGTGCTTTGCT

```

Figura 5. Marco de lectura abierto del gen E2 del VPH16. Se muestra el marco de lectura abierto del VPH16 (PaVE, HPV16REF.1) de 1,089pb. La secuencia en amarillo corresponde al oligonucleótido directo mostrando en rojo el sitio de corte para BamHI y en azul al oligonucleótido reverso mostrando en rojo el sitio de corte para HindIII.

5.5 Preparación de células competentes de *E.Coli TOP10F'*

Se utilizaron 25 mL de medio LB fresco con un preinóculo de 2 mL de *E.Coli TOP10F'* el cual se incubó a 37 °C con agitación a 180 rpm hasta alcanzar una OD_{600} de 0.5, en este punto el cultivo se incubó en hielo durante 10 min y posteriormente se centrifugó a 4500 rpm, durante 5 min a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en 15 mL de CaCl₂ 50 mM/Tris-HCl 10 mM pH 8. Posteriormente se incubó durante 10 min en hielo. Se centrifugó nuevamente a 4500 rpm durante 10 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 2 mL de CaCl₂ 50 mM/Tris-HCl 10 mM pH 8.

5.6 Clonación del amplicón E2 en el plásmido pGEM-t-easy

La clonación del amplicón E2 se realizó utilizando una mezcla de reacción la cual contenía 3 L de amplicón E2, 1 L de Pgem-T-easy, 5 L de buffer, 1 L de Express Link T4 DNA Ligase, 10 L agua libre de nucleasas. La reacción se mezcló suavemente

y se incubó durante 1 h a 25°C, la ligación se utilizó para transformar células calcio-competentes de *E.Coli TOP10F'*.

5.7 Transformación de células competentes de *E.Coli TOP10F'*

A 100 L de células competentes de *E.Coli TOP10F'* se le adicionaron 10 L de reacción de ligación, se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente se sometió a choque térmico a 42 °C durante 2 min. Inmediatamente después, el tubo se incubó en hielo por 1 min, se le adicionó 1mL de medio líquido LB y se incubó a 37°C con agitación a 160 rpm durante 90 min. Posteriormente se tomaron 400 L del cultivo bacteriano, los cuales fueron utilizados para sembrar en placas con agar LB suplementadas con Amp (50 g/ mL). Se incubó a 37°C durante 12-16 h (Sambrook y Russel, 2001).

5.8 Extracción del pGEM-t-easy-E2

Las transformantes obtenidas se cultivaron en 3 mL de medio LB adicionado con Amp (50 g/mL). Se incubaron en agitación a 180 rpm durante toda la noche a 37°C. Posteriormente se realizó la extracción del pGEM-t-easy-E2 utilizando el kit Wizard® plus sv.

El cultivo de las transformantes se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min y el paquete celular se resuspendió en 250 L de una solución de resuspensión celular, luego se adicionaron 250 L de una solución de lisis celular, mezclándose suavemente por inversión del tubo 4 veces, en seguida se agregaron 10 L de una solución de proteasa alcalina y nuevamente se invirtió el tubo 4 veces, se incubó a temperatura ambiente 5 min, después se agregaron 350 L de una solución de neutralización y se mezcló suavemente 4 veces por inversión del tubo, el tubo se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min, a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante para reinsertar la columna al tubo de recolección. Después se añadieron 750 L de la solución de lavado y se centrifugó a 4000 rpm durante 1 min. Se decantó el sobrenadante y se reinsertó

la columna en el tubo de recolección, se agregaron 250 L de solución de lavado para repetir la centrifugación y se desechó del sobrenadante, se centrifugó una vez más a 14000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. La columna fue transferida a un microtubo estéril de 1.5 mL y se le agregaron 30 L de agua libre de nucleasas, se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min, a temperatura ambiente. Se desechó la columna y se guardó el DNA plasmídico a -20°C. El ADN plasmídico se analizó por electroforesis en GABrET 1% (Promega, 2012).

5.9 Digestión del plásmido pGEM-t-easy-E2

El plásmido pGEM-t-easy-E2 se digirió con las enzimas HindIII y BamHI (promega). La una mezcla de reacción contenía 15 l de buffer, 15 l del plásmido pGEM-t-easy-E2, 1 l de la enzima HindIII, 1 l de la enzima BamHI y 28 l de agua libre de nucleasas., la reacción se incubó 13 h a 37°C y posteriormente se visualizó en GABrET 1%.

El producto de digestión se purificó utilizando el protocolo descrito en 5.3.

5.10 Subclonación del amplicón E2 del VPH16 en vector de expresión pET-28a(+)

5.10.1 Digestión y purificación del vector pET-28a(+)

Para linealizar el plásmido se realizó una digestión con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. La mezcla de reacción la cual contenía 10 l de buffer E, 5 l de pET 28 a(+), 2 l de la enzima HindIII, 2 l de la enzima BamHI y 31 l de agua libre de nucleasas., la reacción se incubó 13 h a 37°C y posteriormente se visualizó en GABrET 1%. La banda de interés, se cortó y purificó con el kit de purificación Wizard SV Gel and PCR clean-up system, de la marca Promega, con el protocolo descrito en 5.3.

5.10.2 Clonación del amplicón E2 en el vector pET-28a(+)

La clonación del amplicón E2 en el vector pET-28a(+) se realizó utilizando una mezcla de reacción que contenía 3 L del producto de PCR, 1 L de pET-28a(+), 5 L de buffer, 1 L de Express Link T4 DNA Ligase, 15 L agua libre de nucleasas. La reacción se mezcló suavemente y se incubó durante 15 h a 4°C, la mezcla de reacción se utilizó para transformar células calcio-competentes de *Escherichia.Coli BLR21*.

5.11 Preparación de células competentes y transformación de *E.coli BLR 21*

Se preparó un preinóculo de *Escherichia. Coli BLR*, para preparar células competentes, el protocolo fue el descrito en 5.5.

A 200 L de células competentes de *Escherichia. Coli BLR21* se le adicionaron 13 L de reacción de ligación, se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente se sometió a choque térmico a 42°C durante 2 min. Inmediatamente después, el tubo se incubó en hielo por 1 min, se le adicionó 1mL de medio líquido LB y se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm durante 90 min. Posteriormente se tomaron 450 L del cultivo bacteriano, los cuales fueron utilizados para sembrar en placas con agar LB suplementadas con kan (50 g/ mL). Se incubó a 37 °C durante 12-16 h (Sambrook y Russel, 2001).

5.12 Extracción y digestión del plásmido pET-28a(+)/E2

Se inoculó una colonia de *Escherichia. Coli BLR* transformada con el plásmido pET-28a(+)/E2 en 3mL de medio LB adicionado con kan (50 g/ mL), el cultivo se incubó durante toda la noche a 37°C/200rpm. Para la extracción del plásmido se usó el protocolo descrito en 5.3.2.1

El plásmido pET-28a(+)/E2 se digirió empleando la siguiente mezcla de reacción: 1.5 l de buffer, 1.5 l de pET-28a(+)/E2, 1 l de la enzima HindIII, 1 l de la enzima BamHI

hasta alcanzar un volumen final de 50 l con agua libre de nucleasas, la reacción se incubó 15 h a 37°C y posteriormente se visualizó en GABrET 1%.

5.13 Secuenciación del plásmido pET-28a(+)/E2

El plásmido pET-28a(+)/E2 se secuenció en el Instituto de Biotecnología de la UNAM y posteriormente fue alineado con la secuencia reportada en PaVE con el programa GGSEARCH/GLSEARCH.

5.14 Expresión del gen E2 del VPH16

Una colonia fresca de células de *E.coli BLR21* l transformadas con el plásmido pET-28a(+)/E2 se inoculó en un tubo de ensayo que contenía 3 mL de medio LB adicionado con 3 L de kan (50 g/ mL) y se incubó a 200 rpm/37°C por 12 h. Se tomaron 500 L del cultivo para inocular un matraz que contenía 100 mL de medio líquido LB adicionado con 100 L de kan (50 g/ mL) y se dejó en agitación a 200rpm/ 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.5, se tomó una muestra de 1mL para control negativo. La inducción de la expresión del gen E2 se hizo con 2 diferentes concentraciones de IPTG (0.25mM a 0.5mM) el cultivo se incubó por 12 h con agitación a 200rpm/ 37°C posterior a la inducción y cada dos horas se tomaron muestras para monitoriar la expresión. Se tomó una muestra de 1 mL de cada inóculo para el control positivo y el resto se trasvasó a tubos Corning, el cual se centrifugó por 10min/13000 rpm y los controles a 5min/13000 rpm. Se lavó con 5 y 1mL de Tris/NaCl 50mM pH8 respectivamente, se centrifugó por 10min/13000 rpm 4°C y por 5min/13000 rpm los controles, el sobrenadante se eliminó, y los controles fueron resuspendidos 3:1 (muestra:buffer) en buffer de carga (4x Laemmli sample buffer, β-mercaptoetanol 355mM) y se lisaron por calor por 8 minutos, después se enfriaron a temperatura ambiente y se analizaron en un gel de electroforesis de poliacrilamida 10% teñido con azul de coomassie (Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain).

Posteriormente se hizo una inducción en 200 mL de cultivo, induciendo con IPTG 0.5Mm y se incubó a 37°C/200 rpm por 10 h posteriores a la inducción. Se trasvasó a

tubos Corning y se centrifugó por 10min/13000 rpm. La pastilla se lavó con 10mL de Tris/NaCl 50mM pH8 y se centrifugó por 15min/13000 rpm 4°C, el sobrenadante se eliminó y las pastillas obtenidas se resuspendieron en un volumen final de 9mL de Tris/NaCl 50mM pH8, después en agitación se agregó el buffer de lisis (Lisozima 100mg/ml, Tris-NaCl 50mM pH8) y se incubó toda la noche a 37°C/200 rpm. El extracto celular lisado se centrifugó por 20min/4000 rpm y después se separó el sobrenadante. Para visualizar las proteínas se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida 10% y se tiñó con azul de coomassie (Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain).

5.15 Purificación de la proteína rE2

La proteína rE2 se purificó por cromatografía de afinidad IMAC- Cobalto, utilizando el kit TALON Metal Affinity Resin (Clontech). 2mL de la resina previamente resuspendida se agregó a la columna (TALON 2mL Disposable Gravity Columns) y el buffer de almacenamiento de resina se drenó por flujo de gravedad, después la columna fue equilibrada con 20 mL del buffer de equilibrio (HisTALON Buffer Set). El sobrenadante lisado se agregó a la columna y luego se lavó con 16mL de buffer de equilibrio seguido de 14mL de buffer de lavado (660µL del buffer de elución HisTALON mezclado con 9.34 mL del buffer de equilibrio HisTALON). Al final la proteína recombinante se eluyó con 10mL de buffer de elución (HisTALON Buffer Set) y se recolectaron en tubos eppendorf fracciones de 1mL. La concentración de la proteína fue medida en el NanoDrop™ 2000 de Thermo Fisher Scientific a 280 nm. Para visualizar las fracciones de la proteína recombinante purificada se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida 10% y se tiñó con azul de coomassie (Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain).

5.16 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

Se preparó una mezcla de reacción que contenía: 5 L de buffer de unión, 5 L de LCR [15.8ng/ L] y 15 L proteína E2 [5.8ng/ l]. La reacción se incubó a 23°C por 15 min e inmediatamente después se realizó el ensayo en GaBrEt 1% a 90V por 40min.

VI. RESULTADOS

6.1 Amplificación de la LCR

Las Figuras 6 y 7 muestran la electroforesis del amplicón LCR y su purificación respectivamente, en donde se puede observar una banda de aproximadamente 913 pb correspondiente al tamaño en pb de la LCR.

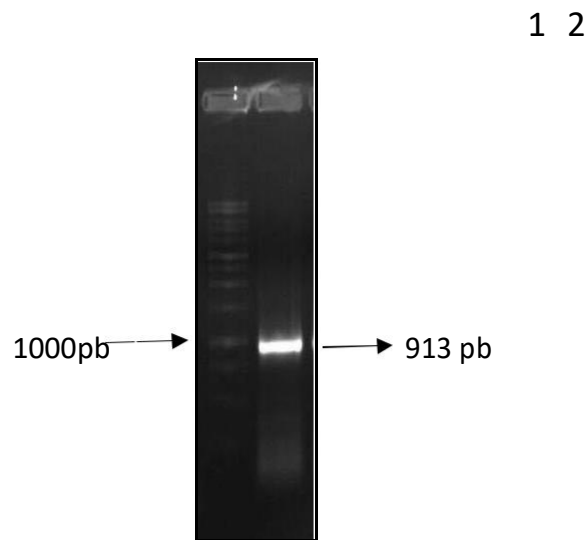


Figura 6. Electroforesis en GaBrEt 1% del amplicón LCR Carril 1: marcador de tamaño molecular de 1kb, carril 2: Amplicón de LCR de 913 pb.

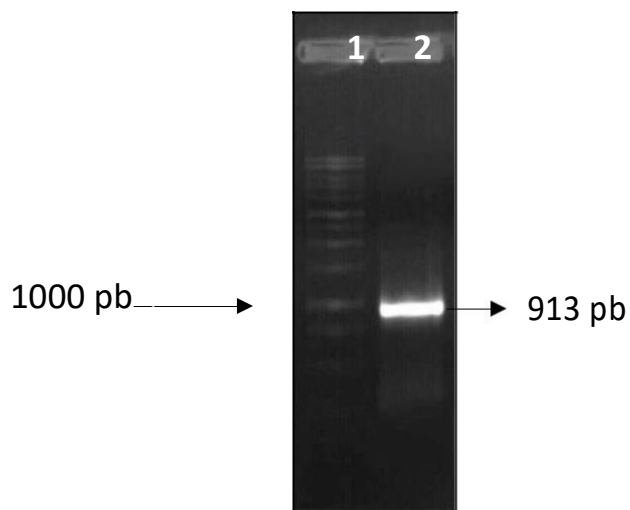


Figura 7. Electroforesis en GaBrEt 1% del amplicón LCR purificado. Carril 1 : marcador de tamaño molecular de 1kb, carril 2: Amplicón de LCR purificado de 913 pb.

6.2 Amplificación del gen E2 del VPH16

La Figura 8 muestra la amplificación de E2 en GaBrEt 1%, se puede observar una banda de aproximadamente 1089pb correspondiente al tamaño en pares de bases del gen E2.

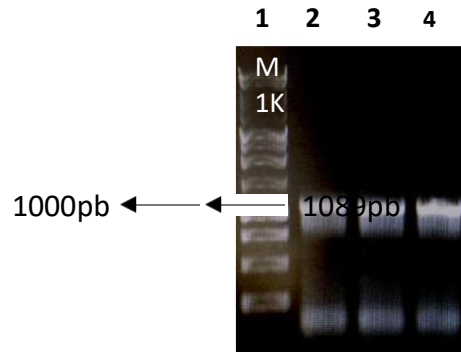


Figura 8. Electroforesis del amplicón E2 en GaBrEt 1%. Figura 7. Carril 1: marcador de tamaño molecular de 1kb, carriles; 2,3 y 4: Amplicón de E2 purificado de 1089 pb

6.3 Transformación de células competentes *E.coli TOP10F'*

El plásmido pGEM-T-easy /E2 se utilizó para transformar células competentes de *E.Coli TOP10F'*, posteriormente las clonas de la transformación resultantes fueron analizadas para determinar si contenían el gen E2, se extrajo ADN plasmídico de una de las clonas (Figura 9) utilizando el kit Miniprep Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System y visualizado en GaBrEt 1%, se comprobó la presencia del inserto E2 por digestión con *BamHI* y *HindIII* en GaBrEt 1%. En la Figura 10 Se observó una banda de aproximadamente 3015pb correspondiente a pGEM-T-easy y una banda de aproximadamente 1,089pb correspondiente al tamaño en pb del amplicón E2.

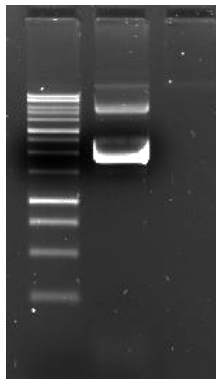


Figura 9. Electroforesis en GaBrEt 1% del ADN plasmidico pGEM-T-easy-E2.

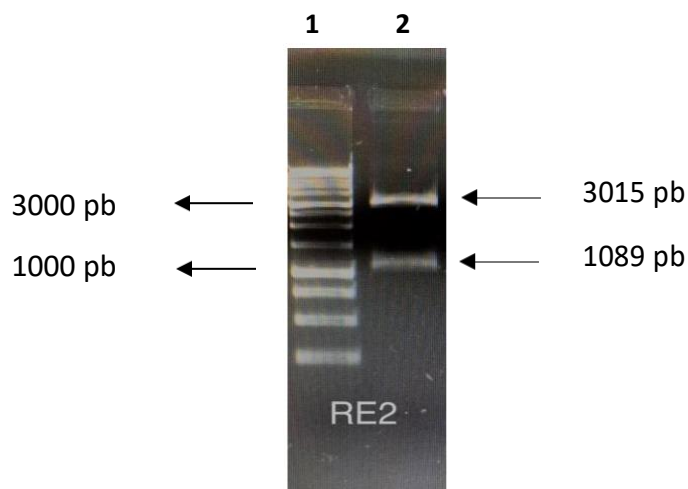


Figura 10. Electroforesis en GaBrEt 1% del plásmido pGEM-T-easy-E2 digerido. Carril 1: marcador de tamaño molecular de 1kb, carril 2: Vector pGEM-t-easy de 3015pb y gen E2 de 1089pb.

6.4 Purificación del producto de digestión del plásmido pGEM-T-easy/E2

El inserto de E2 liberado en la digestión fue purificado (Figura 11), utilizando el kit Purificación Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de promega, como se describió en la metodología.

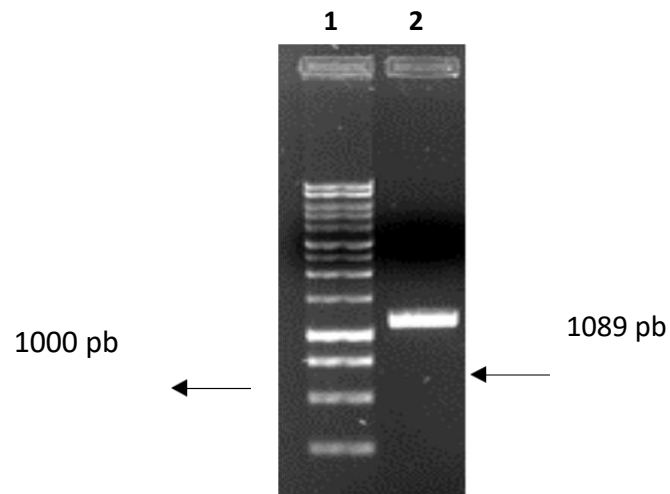


Figura 11. Electroforesis en GaBrEt 1% de la purificación del inserto E2. Carril 1. Marcador de tamaño molecular 10kb. Carril 2. Banda de 1,089pb del inserto E2 purificado.

6.5 Linealización y digestión del plásmido pET-28a(+)

El plásmido pET-28a(+) fue linealizado y digerido con las enzimas BamHI y HindIII como se describe en la metodología. En la Figura 12 se observa una banda de aproximadamente 5315pb, correspondiente al tamaño del vector pET-28a(+).

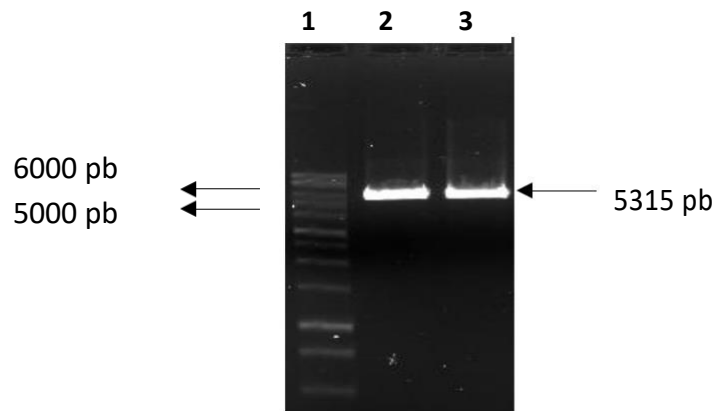


Figura 12. Electroforesis en GaBrEt 1% del pET-28a(+) linealizado y digerido. Carril 1: marcador de tamaño molecular 1kb. Carril 2 y 3: banda de 5315pb del vector pET-28A(+).

6.6 Transformación de células competentes de *E.Coli BLR21*

El plásmido pET-28A(+)/E2 se utilizó para transformar células competentes de *E.Coli*

BLR21, posteriormente las clonas de la transformación resultantes fueron analizadas para determinar si contenían el gen E2, se extrajo ADN plasmídico de una de las clonas (Figura 13) utilizando el kit Miniprep Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System y visualizado en GaBrEt 1%, se comprobó la presencia del inserto E2 por digestión con *BamHI* y *HindIII* en GaBrEt 1%. En la Figura 14 Se observó una banda de aproximadamente 5,369pb correspondiente al pET-28a(+) y una banda de aproximadamente 1,089pb correspondiente al tamaño en pb del gen E2.

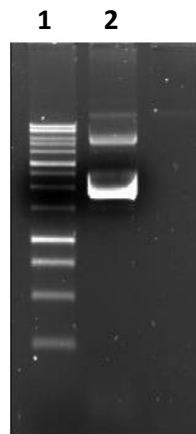


Figura 13. Electroforesis en GaBrEt 1% del ADN plasmídico pET-28a(+)/E2. Carril 1: marcador de tamaño molecular 10kb. Carril 2. ADN plasmídico pET-28a(+)/E2.

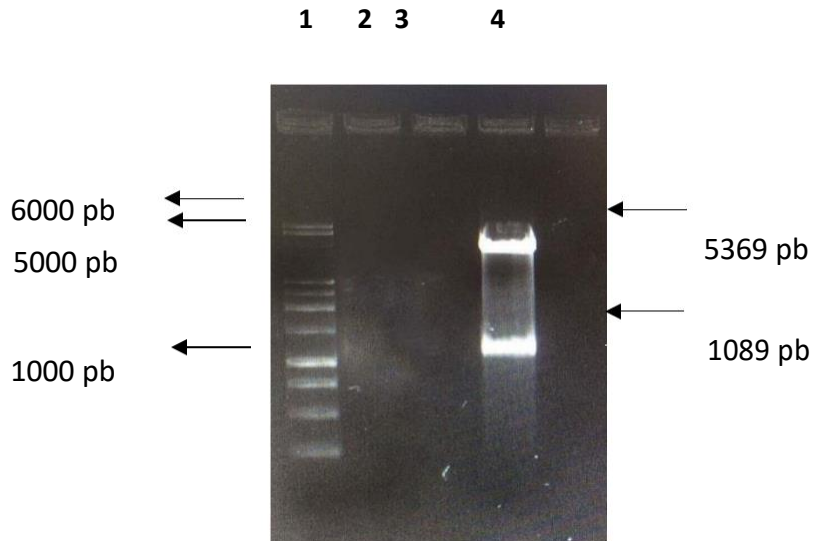


Figura 14. Electroforesis en GaBrEt 1% de la digestión del plásmido pET-28a(+)/E2 Carril 1. Marcador de tamaño molecular 10kb. Carril 4. Vector pET-28a(+) 5,369pb y gen E2 de 1,089pb.

6.7 Alineamiento del plásmido pET-28a(+)-E2 y la secuencia de E2 reportada en PaVE

El plásmido pET28a(+)-E2 fue secuenciado y posteriormente alineado con la secuencia reportada en PaVE con el programa GGSEARCH/GLSEARCH, presentando un 98.6% de identidad (Figura 15).

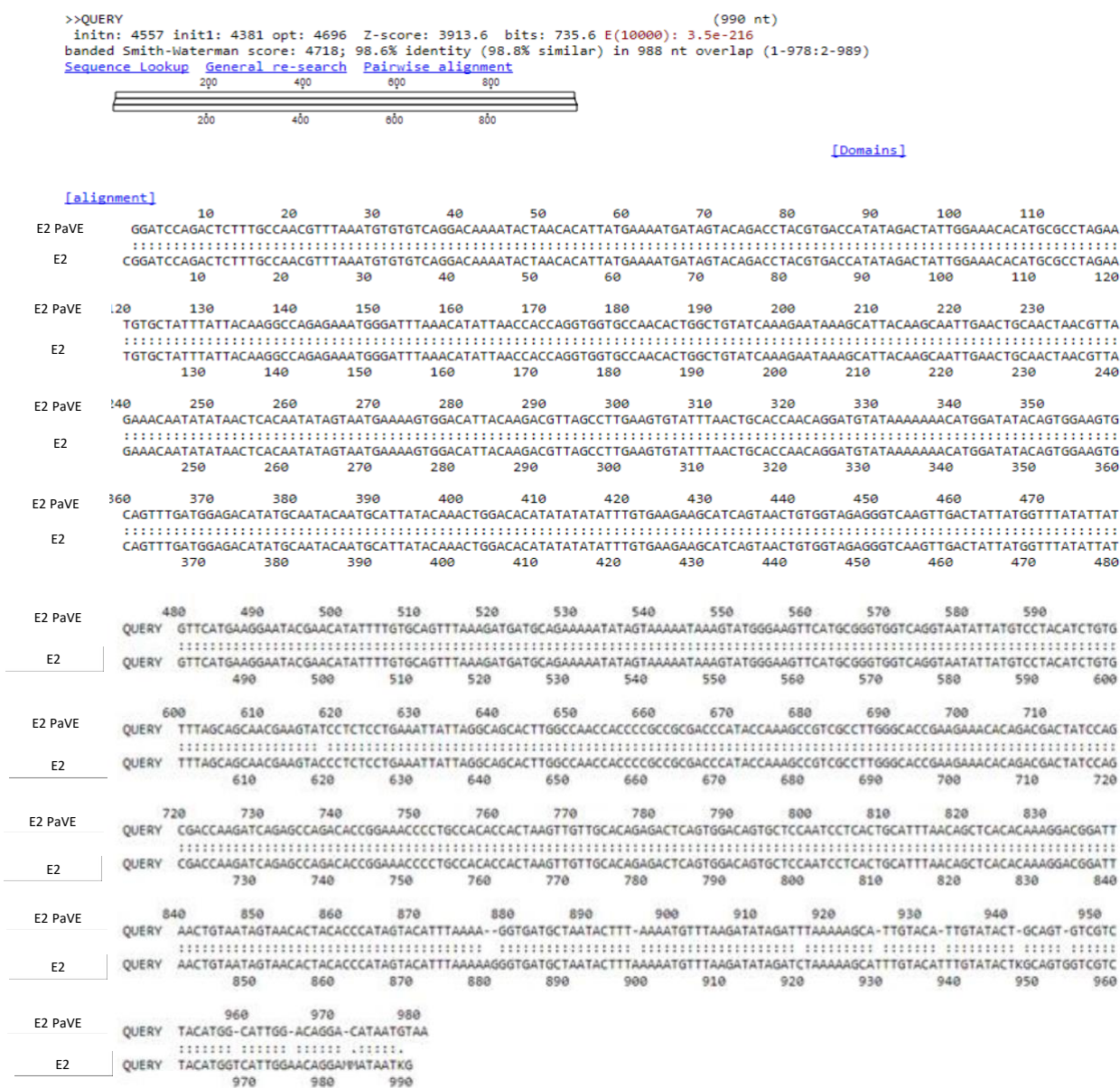


Figura 15. Alineamiento del plásmido pET-28a(+)/E2 y la secuencia de E2 reportada en PaVE

6.8 Análisis de los extractos celulares tras inducción

La Figura 16 muestra el análisis SDS-PAGE al 10% de los extractos celulares tras inducción, las células se lisaron por calor como se describe en la metodología. En dicha Figura se observa una banda de aproximadamente 39 kDa que corresponde al peso molecular de la proteína E2 del VPH16. La mayor expresión de la proteína se obtuvo cuando la inducción se realizó con IPTG 0.5 mM, sin embargo a esta concentración no se observa diferencia en la expresión de la proteína en los tiempos de incubación de 10 y 12 h posteriores a la inducción.

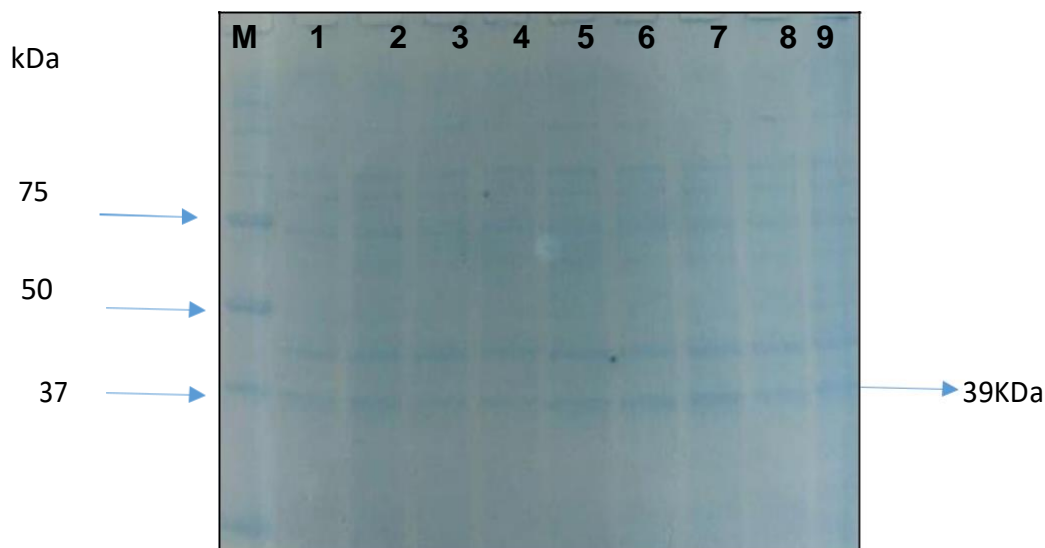


Figura 16. Análisis de los extractos celulares tras inducción en SDS-PAGE 10%. Carril M: Marcador de peso molecular de proteínas de 10-250kDa. Carriles 1- 6: inducción con IPTG 0.25mM y 2,4,6,8,y 10 h de incubación respectivamente. Carriles: 7-9 inducción con IPTG 0.5mM y 10, 12, 8 h de incubación tras la inducción respectivamente.

La Figura 17 muestra el análisis SDS-PAGE al 10% de los extractos celulares cuya inducción fue con IPTG 0.5mM y 10 h de incubación tras inducción, las células se lisaron con lisozima como se describe en la metodología. En tal Figura se puede observar una banda de aproximadamente 39 kDa que corresponde al peso molecular de la proteína E2 del VPH16.

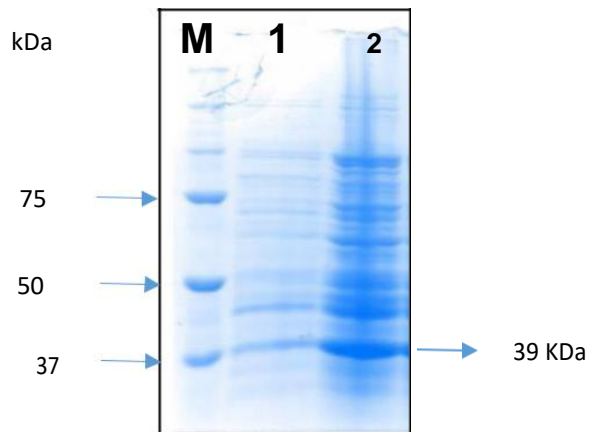


Figura 17. Análisis de los extractos celulares tras inducción en SDS-PAGE 10%. Carril M: Marcador de peso molecular de proteínas de 10-250kDa. Carril 1: control negativo. Carril 2 : inducción con IPTG 0.5mM y 10 h de incubación tras la inducción.

6.9 Purificación de la proteína rE2

Una vez que se realizó la purificación como se describe en la metodología, se determinó la concentración de la proteína rE2 de las diferentes fracciones eluidas midiendo la absorbancia a 280 nm. La Figura 18 muestra el SDS-PAGE al 10% de la de la fracción eluida que presentó la mayor concentración de proteína rE2 del VPH16 purificada.

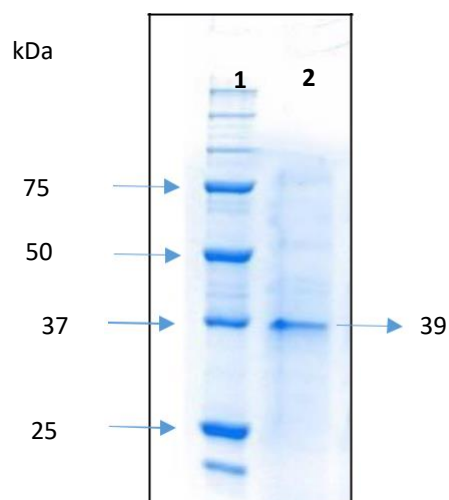


Figura 18. SDS-PAGE 10% de la proteína rE2 del VPH16 purificada. Carril 1. Marcador de peso molecular de proteínas de 10 a 250 kDa. Carril 2. Proteína rE2 purificada de 39 kDa.

6.10 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

El ensayo de interacción entre la proteína rE2 y la LCR se llevó a cabo como se describe en la metodología, en la Figura 19 (carril 2) se puede observar el retardamiento de la banda visualizada en el gel de agarosa al 1%, indicando la unión entre la proteína rE2 y La LCR durante el ensayo EMSA.

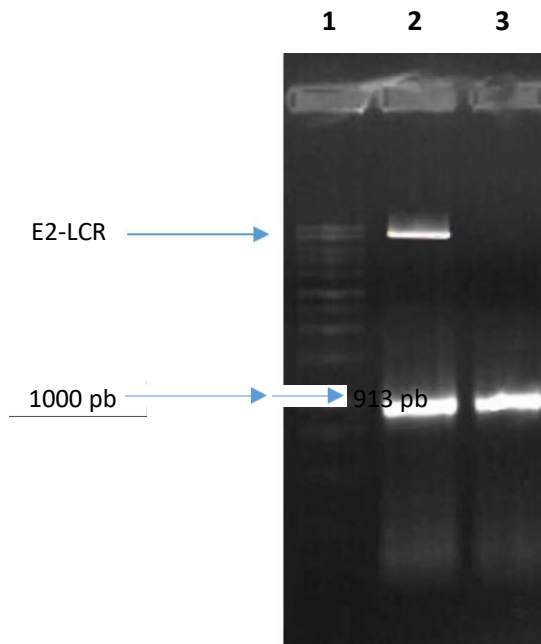


Figura 19. Electroforesis en GABr 1% del ensayo de interacción E2-LCR por EMSA. Carril 1. Marcador de peso molecular 10kb. Carril 2. Banda superior interacción E2-LCR, banda inferior LCR no unido a E2. Carril 3. LCR de 913pb.

VII. DISCUSIÓN

La infección por el VPH es extremadamente común en todo el mundo. La infección por un tipo de VPH anogenital de alto riesgo (oncogénico), a menudo a través de contactos sexuales, es el punto de partida de prácticamente todos los casos de CaCu y la mayoría de los cánceres anales (Fradet-Turcotte y Archambault, 2007).

En la actualidad no existe ningún fármaco antiviral disponible para el tratamiento de las enfermedades asociadas con el VPH a pesar de la alta incidencia de estos virus en la población sexualmente activa. Por lo tanto, la necesidad de agentes antivirales para tratar las enfermedades asociadas con el VPH sigue siendo grande.

La replicación del ADN del VPH es un blanco atractivo para el desarrollo de antivirales del VPH, ya que la inhibición de la replicación del ADN del VPH resultaría en menos genomas disponibles para la síntesis de proteínas virales, así como un menor número de genomas para la integración un paso crítico en el desarrollo de cánceres dependientes del VPH.

La unión de E2 a sitios específicos de la LCR es esencial para la iniciación de la replicación del ADN, esto hace que la proteína E2 sea un excelente blanco terapéutico. El objetivo de este trabajo de investigación fue la obtención de la proteína recombinante E2 del VPH16 y realizar ensayos de interacción entre la LCR y la proteína E2, con una futura aplicación en la búsqueda de moléculas líder que puedan ser utilizadas en el desarrollo de un tratamiento contra la infección del VPH16.

Durante el análisis del marco de lectura abierto del gen E2 así como de la secuencia de la LCR del VPH16 para el diseño de primers se detectó un 50% y 60% de guaninas y citosinas respectivamente lo que le otorgan a dichas secuencias gran estabilidad.

El vector de expresión utilizado en este trabajo fue el pET 28a(+) , en el que la proteína es expresada como proteína de fusión con una cola de histidinas en su extremo N-terminal. Existen algunos trabajos en los que se han utilizado el mismo vector para la

expresión de la proteína E2 de diferentes tipos de VPH e induciendo con IPTG a diferentes concentraciones desde el 0.3 hasta el 1 mM con temperaturas de 16-30°C de incubación (Sedman *et al.*, 1997; Chen y Stenlund, 2002; White *et al.*, 2003; Hernández E, 2008, Kantang y col., 2016) .

Se pudo observar que el tiempo tras la inducción dependía de la concentración de IPTG y temperaturas de incubación, así cuando las temperaturas eran bajas el tiempo de incubación aumentaba tal como se en el trabajo de Kantang y col., 2016 donde la inducción se llevó a cabo con IPTG 0.3mM a 16°C obteniéndose la expresión, hasta las 16 hrs después de la inducción, en contraste con los encontrado en esta investigación donde la expresión de E2 se indujo con IPTG 0.5mM a 37°C y el tiempo de incubación se redujo a 10hrs. tras la inducción, a partir de ese tiempo la expresión ya no se vió incrementada.

La proteína recombinante E2 -Histag obtenida en este trabajo fue utilizada para realizar ensayos de unión con la LCR, a pesar de que no se eliminó la cola de histidinas, mediante los ensayos EMSA realizados se pudo observar que la proteína recombinante E2 -Histag interaccionó con la LCR, estos resultados concuerdan con Frattini *et al.*, en 1994, por otro lado Bornhorst y Falke en el 2000 reportaron que el tamaño pequeño y la carga de la cola de histidinas asegura que raramente afecte la función de la proteína.

La reacción de unión la relación de proteína E2-LCR se hizo con relaciones de 2:1, 1:1 y 0.5:1, con las primeras dos relaciones se pudo observar la interacción del complejo, así como una banda correspondiente a la LCR no unida, de un tamaño igual o mayor a la banda de interacción y parecida en tamaño a la del control, a diferencia de la relación 0.5:1 en donde ya no se observó interacción, estos resultados concuerdan con los reportados por Seo *et al.*, 1993.

Otros factores que afectan la interacción proteínas-ADN son el tiempo y la temperatura de reacción, así como el voltaje de electroforesis, encontrándose que a tiempos mayores de 30 min y temperaturas arriba de los 30°C no se observaba interacción, estos resultados concuerdan con los reportados por Chen *et al.*, en 1998 y Titolo *et al.*, en el 2003 donde manejaron tiempos de 20 a 30 min e incubaron a temperatura ambiente. En cuanto al tiempo y voltaje de electroforesis, se observó a 90V/45min la

banda de interacción que, en lo referente en otros trabajos, son condiciones que varían según el tamaño aproximado del complejo Proteína-ADN.

VIII. CONCLUSIONES

- Se logró amplificar la LCR del VPH 16 por PCR punto final.
- Fue posible amplificar el gen *E2* y posteriormente clonarlo en el vector pGEM-t-easy.
- Se logró subclonar el gen *E2* en vector de expresión pET-28a (+) y expresar la proteína rE2.
- La proteína rE2 se purificó por cromatografía de afinidad en columnas de cobalto-agarosa.
- Se logró la interacción entre la LCR y la proteína recombinante E2 por medio de los ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).

IX. PERSPECTIVAS

Tras la obtención de la proteína E2 del VPH16 y la interacción de las proteínas E1-E2 en el LCR, la perspectiva es realizar estudios de inhibición de la interacción de E1-E2-LCR del VPH 16 *in vitro* para la búsqueda y evaluación de compuestos líder que puedan utilizarse como un posible fármaco contra el VPH.

X. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez A. A., Sepúlveda A., Siller L. F. Carcinogénesis inducida por el virus del papiloma humano. *Investigaciones Andinas*. 2012; 14, 438-456.

Beltran L., Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma Humano/ General aspects about the structure and function of the proteins encoded by the Human Papillomavirus. *Ciencias Biológicas*. 2014;45,123-128

Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol*, 2000; 326, 245-254.

Bruni L, Serranoa B, Boscha X, Castellsagué X. Vacuna frente al virus del papiloma humano. Eficacia y seguridad. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(5):342–354.

Castro AA, Pérez FM. Virus del Papiloma Humano. *Rev Med Cos Cen*. 2013; 70 211-217.

Chen G, Stenlund A. The E1 initiator recognizes multiple overlapping sites in the papillomavirus origin of DNA replication. *Jurnal of Virology*. 2001; 75, 292-302

Cherry J. Structure Based Identification and Characterization of Flavonoids That Disrupt Human Papillomavirus VPH16 E6 Function. *Journal Natural Cancer*, 2013; 8, 1-6.

Cortez E., Martínez N., Frecuencia de infección por virus del papiloma humano y Clamidia en uretra en hombres en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, *Rev Hosp Gral Dr. M Gea González*, 2001 ;4, 23-34

Dillner, J., Kjaer, S., Wheeler, C., Sigurdsson, K., Iversen, O., Hernandez-Avila, M., Perez, G., Brown, D., Koutsky, L., Four year efficacy of prophylactic human papillomavirus quadrivalent vaccine against low grade cervical, vulvar, and vaginal

intraepithelial neoplasia and anogenital warts. Randomised controlled trial. 2018 ;341, 3493.

Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012; 30, 55-70.

Fradet-Turcotte A, Archambault J. Recent advances in the search for antiviral agents against human papillomaviruses. *Antivir Ther*. 2007 ;12,431–451.

Frattini M., Laimins L., Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1994; 26, 12398-12402.

García J., Molina J., Blasco B. El virus del papiloma humano y el cáncer cervical. Una revisión de la historia actualizada sobre la investigación del cáncer del cuello uterino en Venezuela. *Investigación Clínica*. 2010; 51,193–208.

Guzmán L. Papiloma virus, *Vida y Salud*, [www. Vidas.com](http://www.vidas.com); 2015; 2.

Hegde RS. The papillomavirus E2 proteins: Structure, function, and biology. *Annu Rev BiomolStruct* .2002;31: 343-60.

Hernández REE, Burns J,E Zhang W Walker H.F. ,Allen S, Antson A.A., Norman J. Maitland N.J. Dimerization of the Human Papillomavirus Type 16 E2 N Terminus Results in DNA Looping within the Upstream Regulatory Region. *Journal of Virology*. 2008; 251, 4853–4861

Intituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2014
<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=19004>

Jeon S., hoffmann B.L., Lambert P.F. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *Journal of Virology*. 1995; 69,2989-2997.

Kantang W, Chunsrivirod S, Muangsin N, Poovorawan Y, Krusong K. Design of peptides as inhibitors of human papillomavirus 16 transcriptional regulator E1-E2. *Chem Biol Drug Des*. 2016, 88, 475-484.

Kjaer, S. K., Sigurdsson, K., Iversen, O. E., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Brown, D. R., Koutsky, L. A.,. A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009;2, 868–878.

Krogh V. G., Lacey C. J., Gross G., Barrasso R., Schneider A. European course on HPV associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts. *Sexually Transmitted Infections*, 2000; 76, 162–168.

Lizano S. M., Carrillo G. A., Contreras P. A. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología. *Cancerología*. 2009;19, 205-216.

López-Saavedra y Lizano-Soberón. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*. 2006; 1, 31-55.

Mendoza J. A., Muñoz M., Téllez L. E., Vielma S., Mosqueda N., Pérez S., Quintero B. Virus y cáncer; el ejemplo de los papilomavirus humanos. *Memorias congreso venezolano de microbiología*. 2007; 33.176-183.

Organización Mundial de la Salud. 2016
<http://www.who.int/immunization/diseases/hpv/es/>

PaVe, 2014. (<https://pave.niaid.nih.gov/>).

Paavonen, J., Naud, P., Salmerón, J., Wheeler, C. M., Chow, S. N., Apter, D., Kitchener, H., Castellsague, X., Teixeira, J. C. & other authors. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types : final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet*. 2009; 374, 301– 314.

Rashmi S.H., Androphy E. J. Crystal Structure of the E2 DNA-binding Domain from Human Papillomavirus Type 16: Implications for its DNA Binding-site Selection Mechanism. *Journal of Molecular Biology*. 1998; 284, 1479-1489.

Resendiz V., Estabilización de cápsides virales para su potencial uso como bionanorreactores. Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida, 2015;585, 27-31

Saavedra L., Lizano M., Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer. UNAM, 2006;123,31-55.

Seo YS, Müller F, Lusky M, Gibbs E, Kim HY, Phillips B, Hurwitz J. Bovine Papilloma Virus (BPV)-encoded E2 Protein Enhances Binding of E1 Protein to the BPV Replication Origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90,2865-2869.

Secretaría de Salud. México. 2014 <http://www.sinais.salud.gob.mx>

Sedman T., Stenlund A., Binding of the E1 and E2 Proteins to the Origin of Replication of Bovine Papillomavirus. *Jurnal and Virology*. 1997 ; 55 2887–2896

Stanley M. A. infecciones genitales virus del papiloma humano actual terapias potenciales. *Scielo*. 2012; 80:17-52.

Stanley M. A. Genital human papillomavirus infections: current and prospective therapies *Journal of General Virology*. 2012; 93, 681–691

Titolo S, Brault K, Majewski J, White PW, Archambault J. Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus E1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *Journal of Virology*. 2003;77,5178-5191

White P. W., Titolo S., Brault K., Inhibition of Human Papillomavirus DNA Replication by Small Molecule Antagonists of the E1-E2 Protein Interaction. *The journal of biological chemistry*. 2003;201, 26765–26772.

Zur H., Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*. 2009; 384, 260-5.