



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



Conocimiento al servicio de la salud

FACULTAD DE FARMACIA

**ANÁLISIS MOLECULAR DE LA RESTAURACIÓN
DE p53 POR QUERCETINA EN CÉLULAS DE
CÁNCER CERVICOUTERINO VPH POSITIVAS Y
SU IMPLICACIÓN EN EL ARRESTO DEL CICLO
CELULAR**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN FARMACIA

PRESENTA:

M.C. ALDO FRANCISCO CLEMENTE SOTO

CO-DIRECTORES DE TESIS:

DRA. LETICIA GONZÁLEZ MAYA

DR. OSCAR PERALTA ZARGOZA

CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE 2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la vida por ponerme en el camino de la ciencia, porque a través de este, es posible dar algo de ti para un bien común.

Agradezco a la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por permitir realizar mis estudios de doctorado dentro de la institución. Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención, 379417, para realizar mis estudios de doctorado. Muchas gracias a la Universidad Autónoma de Sinaloa por el apoyo brindado en parte de mis estudios de doctorado y por abrir sus puertas para incorporarme después de la conclusión de mis estudios de doctorado.

Agradezco a mi comité tutorial por el tiempo dedicado y el compromiso para conducir mi formación doctoral y porque motivaran en mí, mediante sus críticas y observaciones, la manera de hacer investigación científica. Así mismo, agradezco a mi directora de tesis, la doctora Leticia González Maya por haberme aceptado como su estudiante de doctorado y por todo el apoyo brindado, su comprensión y la confianza puesta en mí durante todo este tiempo.

También doy gracias a mi codirector de tesis, el doctor Oscar Peralta Zaragoza del INSP, por permitirme realizar la estancia de investigación en su laboratorio y por la disposición que siempre brindó hacia mí, en bien del proyecto.

Muchas gracias al doctor Ramón González del CIDC-IICBA, quien siempre me dio la facilidad y la confianza de entrar a su laboratorio, siendo esto clave en la realización de del proyecto. Gracias también a todos sus estudiantes que siempre me recibieron amablemente y me hicieron sentir parte del grupo, en el laboratorio y seminarios y en el ámbito social.

Agradezco al doctor Enrique Salas Vidal del IBt de la UNAM por haber colaborado con nosotros en el proyecto, y por mostrar siempre disposición en brindar su tiempo y sus conocimientos para este trabajo.

Gracias al doctor César Pacheco Milán de la Facultad de Farmacia de la UAEM por colaborar en este trabajo y el compromiso puesto en el mismo.

Gracias a los doctores Pavel Isa, del IBt de la UNAM y Elizabeth Villanueva, de la Facultad de Medicina de la UNAM, por brindarme su apoyo y experiencia que resultaron clave para hacer más simple mi trabajo.

Gracias a todos los mencionados, porque sin ellos, lo aquí obtenido no sería una realidad.

DEDICATORIA

Dedico con mucho cariño este trabajo, a mi familia que son mi inspiración y parte importante de mi vida. A mi esposa Marcela que me sabe comprender y apoyar. A mi hija Coral que es el mejor regalo que la vida me dio. A ellas que amo tanto y con las que compartí mi doctorado, dedico mi esfuerzo y gusto puesto en este trabajo.

Dedico también este trabajo a mis padres, a quienes debo en gran medida haber llegado a estas instancias de mis estudios. Porque por los valores inculcados en mi persona y por su ejemplo de vida, he podido cumplir metas como esta de gran importancia para mí.

Este logro lo comparto también con mis hermanos, con los que tantas otras cosas he compartido.

Este trabajo fue más ameno con el apoyo y la amistad de mis compañeros que permanecen o han pasado por este laboratorio: Erick, Jessica, Casandra, Lucero, Elizabeth, Vero Márquez y Vero Cuevas, Stacey, Héctor, Paco, Mariana, María José, todos comandados por la doctora Lety, de quién hemos aprendido mucho. Gracias de nuevo doctora Lety por su apoyo y sus aprendizajes.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Cáncer.....	3
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1. Cáncer cervicouterino y su agente etiológico.....	6
2.2. Mecanismos moleculares de la carcinogénesis cervical por VPH.....	10
2.2.1. Actividades de E6 y E7 del VPH en la carcinogénesis.....	11
2.3. VPH, desde la infección hasta el establecimiento del cáncer cervicouterino.....	13
2.4. Diagnóstico y tratamiento del cáncer cervicouterino.....	14
2.5. El ciclo celular.....	16
2.5.1. Papel de p53 en ciclo celular.....	19
2.6. Apoptosis.....	21
2.6.1. Rol de p53 en apoptosis.....	22
2.7. Flavonoides.....	25
2.7.1. Actividad anticáncer de los flavonoides.....	27
2.7.2. Actividades antioxidante/prooxidante de quercetina.....	28
2.7.3. Actividad inhibitoria de los flavonoides sobre E6 y E7 HPV y la restauración de p53.....	31
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVOS.....	34
5.1 Objetivo general.....	34
5.2 Objetivos específicos.....	34
6. METODOLOGÍA.....	35
6.1. Células y Moléculas.....	35
6.1.1. Mantenimiento de las células.....	35

6.2. Viabilidad celular por tetrazolio.....	35
6.2.1. Determinación de la concentración inhibitoria 50	36
6.3. Citometría de flujo	36
6.4. Determinación del índice mitótico.....	37
6.5. Evaluación de rasgos celulares apoptóticos	37
6.6. Ensayo de localización de p53	38
6.7. Ensayo de actividad de caspasas	39
6.8. Western blot	39
6.9. RT-PCR	40
6.10. Análisis de acoplamiento molecular.....	41
7. RESULTADOS	42
7.1. Citotoxicidad de quercetina en células de cáncer cervicouterino	42
7.2. Quercetina aumenta la población G2/M en células de cáncer cervicouterino	44
7.3. Quercetina arresta células de cáncer cervicouterino en la fase G2 del ciclo celular	46
7.4. Quercetina incrementa la expresión de p53 y su localización nuclear	48
7.5. Quercetina aumenta la expresión de blancos transcripcionales de p53.....	50
7.6. Quercetina induce apoptosis en células de cáncer cervicouterino	51
7.7. Quercetina induce actividad de caspasas en células de cáncer cervicouterino	52
7.8. La reactivación de p53 inducida por quercetina en células de cáncer cervicouterino es independiente de la expresión de E6 VPH.....	53
7.9. Acoplamiento molecular predice la unión de quercetina a E6 VPH sobre el sitio de unión de E6AP	54
8. DISCUSIÓN.....	57
9. CONCLUSIONES	65
9.1. CONCLUSIÓN GENERAL	65
9.2. CONCLUSIONES PARTICULARES.....	65
10. REFERENCIAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de mortalidad de cáncer cervicouterino y tendencia de mortalidad por cada 100,000 mujeres del año 2000 a 2012, en México	5
Figura 2. Infección por el virus del papiloma humano.....	6
Figura 3. Fases de replicación del virus de papiloma humano.....	9
Figura 4. Consecuencias de integración del VPH.	11
Figura 5. Roles de las proteínas E6 y E7 VPH en el ciclo celular y apoptosis.....	12
Figura 6. Esquema general de la regulación del ciclo celular.....	17
Figura 7. Regulación de la transición G2/M por p53.	21
Figura 8. Vías apoptóticas mitocondriales de p53.....	24
Figura 9. Clasificación de flavonoides y ejemplos representativos de cada grupo. ..	26
Figura 10. Mecanismo de transformación oxidativa de quercetina.	29
Figura 11. Estructuras de quercetina con numeración atómica y en complejo con ion metal.....	30
Figura 12. Mecanismo prooxidante de quercetina.....	31
Figura 13. Ensayo de citotoxicidad de quercetina en células de cáncer cervicouterino.....	43
Figura 14. Ensayo del efecto de quercetina en el ciclo celular de células de cáncer cervicouterino.....	45
Figura 15. Análisis estadístico del ciclo celular.	46
Figura 16. Ensayo del índice mitótico tras el tratamiento de quercetina en células HeLa y SiHa.	47
Figura 17. Estabilización de la proteína p53 por quercetina en células HeLa y SiHa.	48
Figura 18. Análisis de la localización nuclear de p53 en células de cáncer cervicouterino.....	49
Figura 19. Análisis de la expresión de p21.....	50
Figura 20. Análisis de la expresión de Bax y Bcl-2.....	51
Figura 21. Ensayo de rasgos morfológicos apoptóticos en células de cáncer cervicouterino.....	52
Figura 22. Evaluación de la actividad de caspasas en células de cáncer cervicouterino.....	53
Figura 23. Análisis de la expresión de E6 VPH tras el tratamiento con quercetina en células de cáncer cervicouterino.	54
Figura 24. Imágenes seleccionadas de 1 docking de quercetina sobre E6 VPH-16.56	
Figura 25. Ilustración comparativa de los flavonoides luteolina, quercetina y miricetina.	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número estimado de nuevos casos de cáncer y de muertes a nivel mundial entre mujeres, por nivel de desarrollo, 2012.	4
Tabla 2. Estadíos del cáncer cervicouterino por FIGO.	15
Tabla 3. Oligonucleótidos específicos para los transcritos p21 y GAPDH.	41
Tabla 4. Viabilidad celular en células HeLa, SiHa y HFF.	42

RESUMEN

Objetivo. Este estudio tuvo la finalidad de aportar conocimiento al mecanismo del efecto citotóxico de quercetina en células de cáncer cervicouterino HeLa y SiHa, particularmente, en la inducción del arresto celular y apoptosis, asociado a la activación de p53, independientemente de la expresión de la oncoproteína E6 VPH.

Metodología. Se ensayó la citotoxicidad de quercetin en células HeLa y SiHa por MTS, además de su impacto en el ciclo celular por citometría. La apoptosis se evaluó por microscopía, actividad de caspasas, y molecularmente por la relación de la expresión Bax/Bcl-2 por western blot. Particularmente se analizó la expresión de p53 por western blot y su localización celular por microscopía confocal. La actividad de p53 se investigó mediante la expresión algunos de sus blancos transcripcionales, por western blot o RT-PCR. Además, se evaluó la expresión de E6 VPH por western blot. Finalmente, se predijo computacionalmente, la unión de quercetina a E6 VPH.

Resultados. Los resultados revelaron que la toxicidad de quercetina involucró arresto celular en la fase G2 e inducción de apoptosis a tiempos más tardíos. Identificamos que quercetina incrementó la proteína total de p53 y su localización nuclear. Así mismo, quercetina aumentó la expresión de los blancos transcripcionales de p53, p21 y Bax, sugiriendo la activación transcripcional de p53 y su rol en ciclo celular y apoptosis. Interesantemente, la activación de p53 en células HeLa y SiHa, no involucró cambios de expresión de E6 VPH, el regulador negativo de la expresión de p53 en células de cáncer cervicouterino infectadas por VPH, lo que supone un efecto de quercetina sobre la actividad de E6. Esta noción es apoyada por el ensayo computacional que predijo que quercetina se une a residuos claves de E6 VPH para la formación del complejo E6/E6AP, y por lo tanto, la degradación de p53.

Conclusión. Quercetina induce arresto en la fase G2, seguido de apoptosis, en células HeLa y SiHa, posiblemente a través de la activación de p53, derivado del impedimento de la formación del complejo E6/E6AP.

Aportación. Este estudio aporta conocimiento sobre las acciones moleculares y celulares de quercetina en las células de cáncer cervicouterino HeLa y SiHa. Además, propone que quercetina es una molécula con interesantes actividades biológicas que deberían ser exploradas a fondo.

SUMMARY

Objective. The aim of this study was to contribute knowledge to the cytotoxic mechanism of quercetin in cervical cancer cells, HeLa and SiHa, mainly in cell cycle arrest and apoptosis, associated with the activation of p53 which resulted independent of the expression of HPV E6 oncoprotein.

Methods. The cytotoxicity of quercetin in HeLa and SiHa cells was tested by MTS. The effect of quercetin on the cell cycle was assessed by cytometry and by the rate of mitotic nuclei. Apoptosis was tested by microscopy, by caspases activity, and by measuring the Bax/Bcl-2 ratio. The expression of total p53 protein was analyzed by western blot, while, its cellular localization it was try out by confocal microscopy. We also investigated the expression of transcriptional targets of p53, by western blot or RT-PCR. The expression of HPV E6 was evaluated by western blot. The binding between quercetin and HPV E6 was predicted by molecular docking.

Results. The results revealed that the toxicity of quercetin involved G2 phase cell arrest and triggering of apoptosis at later times. We identified that quercetin increased the total p53 protein and its nuclear signal. Likewise, quercetin increased the expression of the p53 targets genes, p21 and Bax, suggesting the transcriptional activation of p53 and its role in cell cycle and apoptosis. Interestingly, the activation of p53 in HeLa and SiHa cells did not involve changes of the E6 HPV expression, the negative regulator of p53, which presumes an effect of quercetin on the activity of E6, rather than on its expression. This assumption is supported by the molecular docking assay that predicted quercetin binds to key HPV E6 residues in the formation of the E6 / E6AP complex, and therefore, the degradation of p53.

Conclusion. Quercetin causes G2 arrest, followed by apoptosis in HeLa and SiHa cells, possibly through the activation of p53, derived from disrupting of the E6/E6AP complex formation.

Contribution. This study provides knowledge about the molecular and cellular actions of quercetin in HeLa and SiHa cervical cancer cells. In addition, it proposes that quercetin possess interesting activities that should be thoroughly explored.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

El cáncer es un término designado a un conjunto de células que han perdido el control de la división celular y que se han vuelto inmortales, de tal manera, que alcanzan altas tasas de proliferación, pudiendo llegar a formar tejido con anatómica y funcionalmente distinto a la del tejido proveniente. Además, en etapas tardías del cáncer, este tipo de células cancerosas pueden llegar a invadir a órganos distantes a través del sistema linfovascular. Este proceso de invasión es conocido como metástasis y es la casusa principal de muertes por cáncer con un aproximado del 90% [Seyfried T. et al., 2013]. En 2015, se registraron 8.8 millones de muertes por cáncer, lo correspondiente a 1 de cada 6 muertes a nivel global, y se estima que entre el 30 y 50% de los cánceres podrían ser prevenidos, evitando hábitos como el consumo de tabaco o por la inmunización contra infecciones causantes de cáncer [WHO cancer, 2018]. Uno de estos tipos de cánceres que puede ser prevenido por inmunización, es el cáncer cervicouterino, pero a pesar de ello, es actualmente el cuarto cáncer más común que afecta mujeres, contando con alrededor de 530 000 nuevos casos y 270 000 muertes por año en todo el mundo. Alrededor del 90% de la incidencia y de la mortalidad por cáncer cervicouterino ocurren en países menos desarrollados económicamente, situando a este tipo de cáncer en el segundo lugar de incidencia y el tercero en mortalidad, entre todos los tipos de cánceres que afectan mujeres en países menos desarrollados y el cuarto a nivel mundial (Tabla 1) [GLOBOCAN, 2012].

Tabla 1. Número estimado de nuevos casos de cáncer y de muertes a nivel mundial entre mujeres, por nivel de desarrollo, 2012.

Cases		Deaths	
Worldwide			
Breast	1,671,100	Breast	521,900
Colorectum	614,300	Lung, bronchus, & trachea	491,200
Lung, bronchus, & trachea	583,100	Colorectum	320,300
Cervix uteri	527,600	Cervix uteri	265,700
Stomach	320,300	Stomach	254,100
Corpus uteri	319,600	Liver	224,500
Ovary	238,700	Pancreas	156,600
Thyroid	229,900	Ovary	151,900
Liver	228,100	Esophagus	119,000
Non-Hodgkin lymphoma	168,100	Leukemia	114,200
All sites*	6,657,500	All sites*	3,548,200
More developed			
Breast	788,200	Lung, bronchus, & trachea	209,900
Colorectum	338,000	Breast	197,600
Lung, bronchus, & trachea	267,900	Colorectum	157,800
Corpus uteri	167,900	Pancreas	91,300
Ovary	99,800	Stomach	68,000
Stomach	99,400	Ovary	65,900
Thyroid	93,100	Liver	42,700
Pancreas	92,800	Leukemia	40,300
Melanoma of skin	91,700	Cervix uteri	35,500
Non-Hodgkin lymphoma	88,500	Corpus uteri	34,700
All sites*	2,826,900	All sites*	1,287,000
Less Developed			
Breast	882,900	Breast	324,300
Cervix uteri	444,500	Lung, bronchus, & trachea	281,400
Lung, bronchus, & trachea	315,200	Cervix uteri	230,200
Colorectum	276,300	Stomach	186,100
Stomach	220,900	Liver	181,800
Liver	185,800	Colorectum	162,500
Corpus uteri	151,700	Esophagus	103,700
Ovary	139,000	Ovary	86,000
Thyroid	136,800	Leukemia	73,800
Esophagus	114,400	Pancreas	65,300
All sites*	3,830,600	All sites*	2,261,200

* Exclude skin cancer no-melanoma. Fuente: GLOBOCAN, 2012.

En México, desde el año 2000 a 2012, la incidencia y la mortalidad del cáncer cervicouterino presentaron una tendencia a la baja, asociada principalmente a la revisión ginecológica y detección oportuna del agente etiológico, la infección por virus de papiloma humano (VPH), y de neoplasias intraepiteliales cervicales (NICs), aunado a la implementación de esquemas de prevención a través de inmunización contra el VPH. Sin embargo, el cáncer cervicouterino es aún, el segundo tipo de cáncer más mortal entre mujeres, en México. Los datos manifiestan que este tipo de cáncer ocasiona 4769 decesos anuales, lo que corresponde al 12% de todas las muertes por cáncer en mujeres mexicanas (Figura 1). Además, el cáncer cervicouterino en México ocupa una incidencia de 23.7 nuevos casos por año por cada 100 000 mujeres [Mohar-Betancourt. et al., 2017].

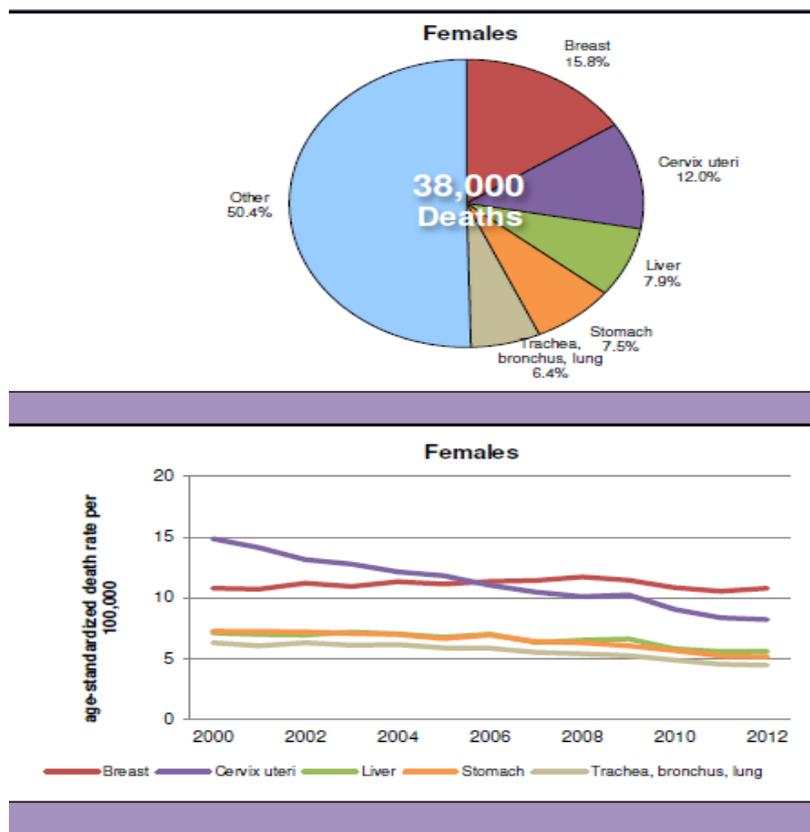


Figura 1. Perfil de mortalidad de cáncer cervicouterino y tendencia de mortalidad por cada 100,000 mujeres del año 2000 a 2012, en México [WHO-Cancer Country Profiles, 2014].

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer cervicouterino y su agente etiológico.

La infección por VPH de alto riesgo es necesaria en la carcinogénesis del cáncer cervicouterino, ya que en virtualmente todos los tejidos cancerosos cervicales, un tipo de VPH de alto riesgo está presente [Walboomers J. et al., 1999; Villiers E. et al., 1981; Dürst M. et al., 1983], siendo los tipos 16 y 18 los más prevalentes, y los responsables del 70% del total de cánceres de cervicouterino [So K. et al., 2016].

La infección por VPH está limitada a las células basales del epitelio estratificado, a las cuales el virus tiene acceso solamente después de un trauma mecánico o químico sobre el epitelio.

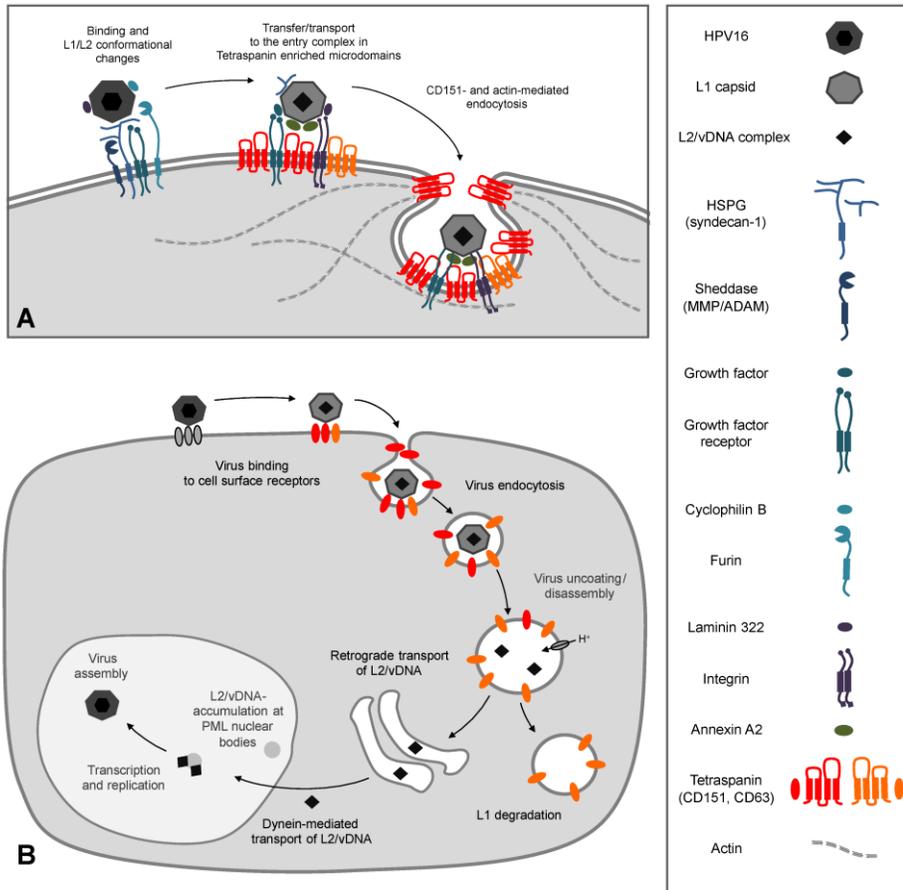


Figura 2. Infección por el virus del papiloma humano [Scheffer K. et al., 2014].

El proceso de infección por VPH (Figura 2) inicia desde las interacciones moleculares membrana basal-virus-célula que son indispensables para mediar la entrada del virus a la célula basal. Estas interacciones incluyen el reconocimiento entre la proteína de cápside viral L1 y los proteoglicanos de heparán sulfatos (HSPGs, por sus siglas en inglés) que emergen de la membrana basal (MB), lo que provoca un cambio conformacional de la proteína de cápside viral L2, que expone su N-terminal para su corte proteolítico por furina **[Giroglou T. et al., 2001; Richards R. et al., 2006]**. Estos eventos conllevan a una disminución de la afinidad de L1 por HSPGs, y por la tanto, facilita la transferencia de la partícula viral a receptores secundarios específicos de queratinocitos, cuya identidad es aún desconocida.

Subsecuentemente, las partículas son internalizadas por una vía endocítica que no requiere de clatrina, caveolina, dinamina, ni balsas lipídicas, pero requiere polimerización de actina y del receptor de membrana tetraspanina, aunque el mecanismo no es conocido **[Spoden G. et al., 2013; Schelhaas M. et al., 2012]**. Además existe coincidencia en que la proteína de cápside L2 permanece en complejo con el genoma viral y que este complejo escapa del endosoma tardío, para después conseguir la entrada a núcleo, una vez que la ruptura de la membrana nuclear durante la mitosis, tiene lugar **[Schiller J. et al., 2010]**.

Aunque los eventos tempranos de la infección pueden tener lugar en tipos celulares permisivos y no permisivos, existe una restricción de las funciones de replicación viral y de la producción de viriones, determinada por factores limitados al programa de diferenciación de queratinocitos.

La entrada del ADN viral al núcleo es seguida de la activación del promotor localizado en la región regulatoria río arriba (URR) que inicia la expresión de proteínas virales tempranas. Dos de estas proteínas, E1 y E2, se apropian de los factores de replicación celular y los dirigen hacia el origen de replicación viral localizado en la URR. La proteína E1 es responsable de la apertura del ADN genómico en el origen y del subsecuente separación de la doble hebra de ADN, siendo la proteína E2 quien confiere especificidad de unión al DNA de la cual carece E1 **[Chiang C. et al., 1992]**.

Los papilomavirus han evolucionado para adaptar su ciclo de vida al proceso de maduración de los queratinocitos, para ello han adoptado un modo de replicación de

tres fases (Figura 3). La primera de estas fases consta de una amplificación transitoria del genoma en células basales proliferando, resultando en un incremento del número de copias de DNA viral por célula. Después, el genoma viral entra en una segunda fase de mantenimiento del genoma, donde el número de copias de DNA viral extracromosomal por célula, es mantenido establemente a un nivel casi constante durante las divisiones subsecuentes de las células basales. En esta fase, el genoma viral que es aproximadamente duplicado durante la fase S del ciclo celular, es casi equitativamente segregado dentro de los núcleos de las células hijas. Para la segregación equitativa del genoma viral en las células hijas, la proteína E2 del VPH particiona y mantiene el genoma viral unido a los husos mitóticos [Kadaja M. et al., 2009; McBride A. et al., 2008]. La tercera fase de replicación viral es denominada amplificación vegetativa, donde los genomas virales son amplificados a un alto número de copia para ser empaquetados por las cápsides y producir finalmente progenie viral. La amplificación vegetativa ocurre solamente en queratinocitos diferenciando, los cuales se han desprendido desde la membrana basal, y migran hacia las capas celulares suprabasales como parte del proceso de diferenciación epitelial [Kadaja M. et al., 2009]. Sin embargo, estas células hospederas arrestadas no producen la maquinaria de replicación necesaria para la replicación de los papilomavirus. Los mecanismos moleculares para la desconexión del arresto celular desde el proceso de diferenciación de queratinocitos, no son bien comprendidos, pero las oncoproteínas virales E6 y E7 son absolutamente requeridas para establecer un estado competente de replicación vegetativa [McBride A. et al., 2008]. Pero se propone que las oncoproteínas virales E6 y E7 podrían alterar los puntos de regulación del ciclo celular para generar o mantener una pseudofase S, de modo que la maquinaria de replicación celular esté disponible para la replicación viral.

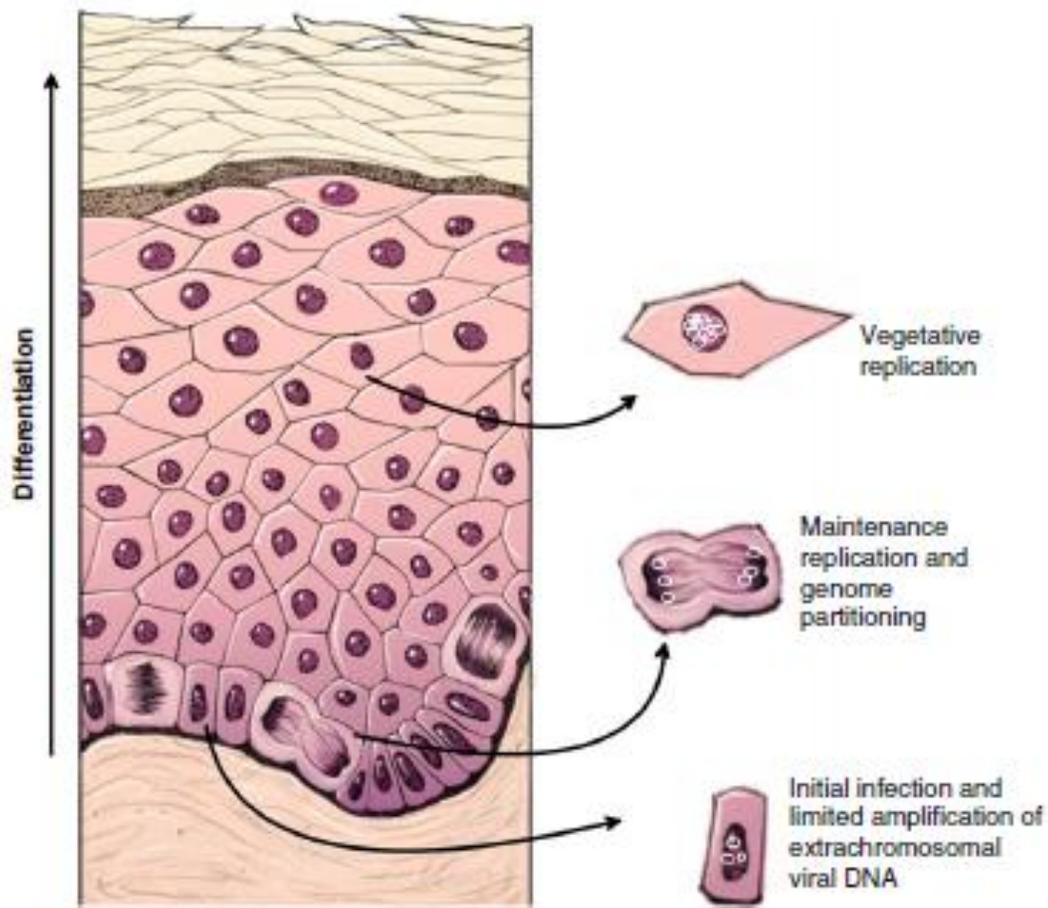


Figura 3. Fases de replicación del virus de papiloma humano [McBride A. et al., 2008].

Al final del ciclo de replicación viral del VPH, la expresión de las proteínas tardías estructurales L1 y L2 se desencadena, y el ensamblaje del genoma viral ocurre en las células de las capas superiores del epitelio. Los viriones producidos al no ser líticos, son liberados una vez que las células infectadas que los contienen alcanzan la superficie del epitelio y son desprendidas. De este modo el ciclo de replicación viral es completado y las partículas virales infecciosas generadas pueden nuevamente iniciar otro nuevo ciclo [Conway M. et al., 2009].

2.2. Mecanismos moleculares de la carcinogénesis cervical por VPH.

En lesiones precancerosas cervicales, el genoma de VPH es mantenido de forma episomal, pero en la mayoría de los casos la infección puede revertir y el virus ser eliminado en un periodo de meses. Por el contrario, la frecuencia de integración de ADN viral en el ADN cromosómico, incrementa conforme una lesión precancerosa progresa a cáncer **[McBride A. et al., 2017]**. Esto toma sentido por el hecho de que la integración del DNA viral, normalmente involucra ruptura del genoma viral en regiones E1 y E2, generando marcos abiertos de lectura incompletos y la inactivación de estos genes. Por consecuencia, se genera una expresión incrementada de los oncogenes E6 y E7, al ser perdido su represor transcripcional, la proteína E2 (Figura 4). Además, la integración de VPH en el genoma de células de cáncer cervicouterino ocasiona variaciones estructurales genómicas, incluyendo amplificaciones focales, deleciones y/o translocaciones. Estas alteraciones genómicas frecuentemente interrumpen la expresión y estructura de genes vecinos involucrados en carcinogénesis, y resulta también, en la amplificación y expresión de los genes E6 y E7. Por lo tanto, la integración del VPH, y la concomitante pérdida del gen E2 son consideradas eventos críticos en la carcinogénesis asociada a este virus **[Shulzhenko N. et al., 2014; Zhang R. et al., 2016]**.

En efecto, la expresión exógena de E2 en células HeLa indujo apoptosis y reactivó la transcripción dependiente de p53, un blanco de degradación de E6 **[Desaintes C. et al., 1997]**.

Una inestabilidad genómica adicional a la ocasionada por la integración del VPH, resulta de las actividades oncogénicas de las proteínas virales E6 y E7. La expresión exógena de estas proteínas immortalizan células humanas en pasajes tempranos, pero a través de pasajes extensivos, conducen a la acumulación de aberraciones genómicas que conllevan a un fenotipo transformante, sugiriendo que la ganancia de la inestabilidad genómica originada por E6 y E7 a lo largo del tiempo, son cruciales en la carcinogénesis por VPH **[Schlecht N. et al., 2003]**.

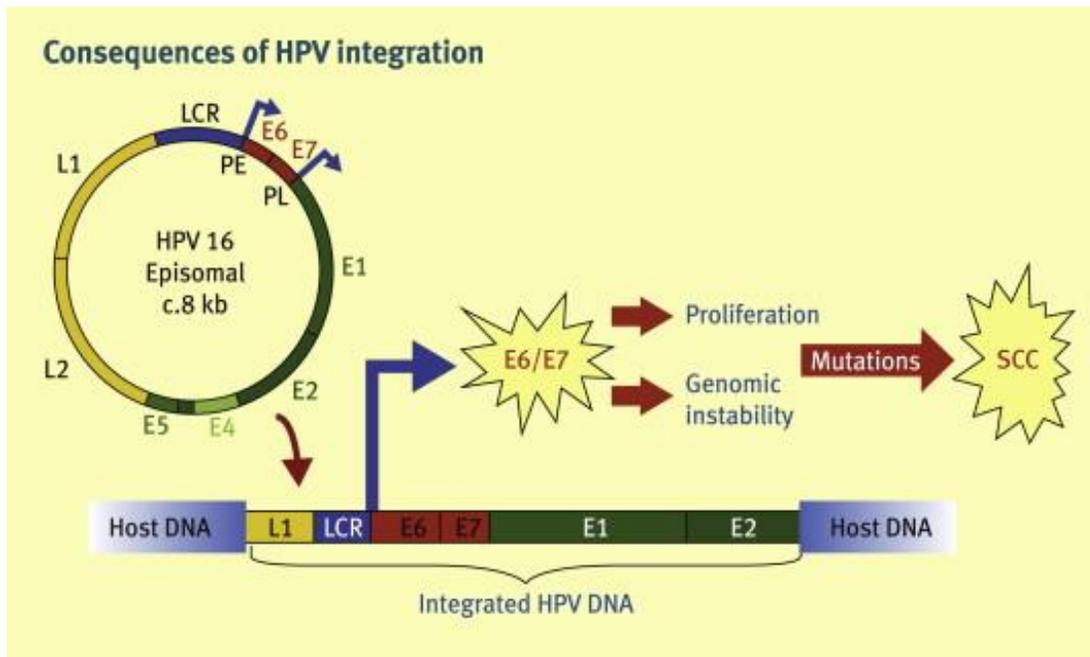


Figura 4. Consecuencias de integración del VPH [Powell N. et al., 2015].

2.2.1. Actividades de E6 y E7 del VPH en la carcinogénesis.

Como se mencionó anteriormente, el VPH como parte de su ciclo de replicación requiere y es capaz de tomar control del ciclo celular a través de las oncoproteínas E6 y E7, pero además tiene la habilidad de promover la supervivencia celular inhibiendo la muerte por apoptosis. La manera en que consigue esto, es inactivando a las proteínas supresoras de tumores p53 y RB, respectivamente, quienes tienen roles importantes en controlar la progresión del ciclo celular y la apoptosis (Figura 5), por lo tanto estos controles celulares se pierden con la expresión de estas proteínas virales [Werness B. et al., 1990; Dyson N. et al., 1989]. La proteína E7 se asocia a RB e induce su degradación en una manera dependiente del proteasoma, lo que ocasiona la liberación del factor transcripcional E2F y con esto, la pérdida del control de la transición G1/S, por lo tanto, se establece una permisiva entrada a la fase S de síntesis del ADN incluso en presencia de ADN dañado desde la fase G1.

Por su parte, E6 a través de su región hidrofóbica (pocket E6) interactúa con la ubiquitina ligasa E3 celular, E6AP y forman el complejo E6/E6AP que induce la

conformación competente de E6 para asociarse a p53 e inducir su degradación por ubiquitinación, dirigida por E6AP [Talis A. et al., 1998]. Para lograr dicha conformación de E6, se mostró que es suficiente su unión a un fragmento de E6AP de tan solo de 11 a 18 residuos que incluye el motivo LQELL [Ansari T. et al., 2012]. Entonces, solamente una vez que el complejo E6/E6AP ha sido formado, la proteína p53 puede ser reclutada y poliubiquitinada por E6AP y, posteriormente degradada por el proteasoma. Pero de manera independiente ni E6 ni E6AP son capaces de unirse a p53. Entonces, E6 se apodera del control de la estabilidad de p53 volviéndose dependiente de la ligasa E6AP e independiente de la ligasa celular E3, HDM2 [Hengstermann A. et al., 2001].

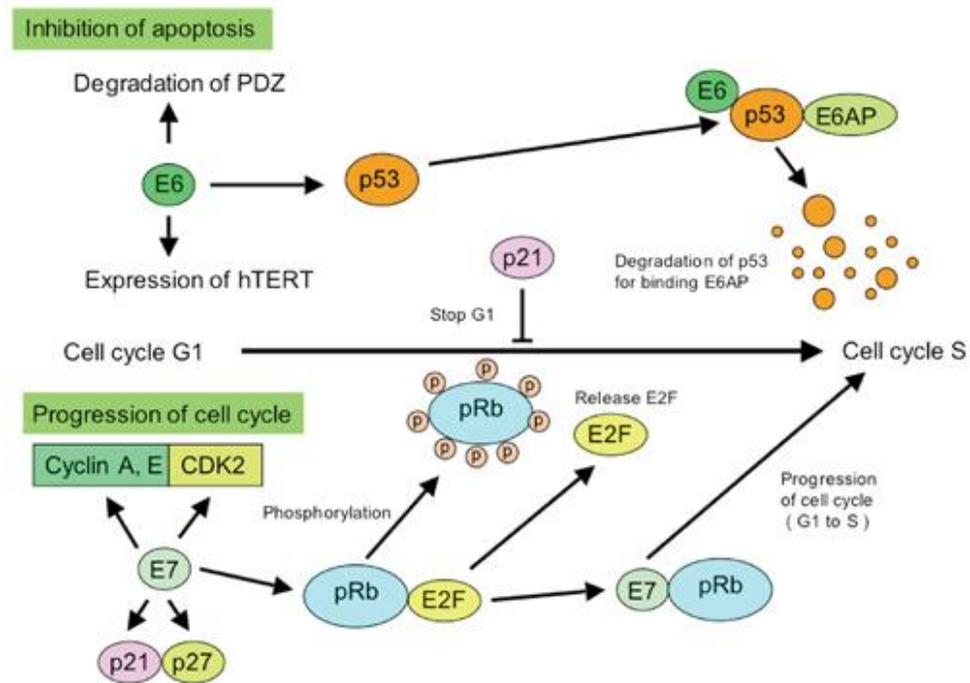


Figura 5. Roles de las proteínas E6 y E7 VPH en el ciclo celular y apoptosis [Senba M. et al., 2012].

Consecuentemente, con la degradación de p53 se pierde un importante control del ciclo celular en las fases intra-S y G2, aunado al control de la fase G1 por E7-RB, previamente mencionado. La degradación de p53, conlleva además a la pérdida de una eficiente reparación de daños al ADN, así como a una disminución de la

sensibilidad a estímulos o señales de muerte dependientes de p53. Lo anterior, provoca una progresión del ciclo celular permanente, con potencial acarreo de ADN dañado, y por lo tanto, a una susceptibilidad de la célula a la ganancia de inestabilidad genómica que, a lo largo del tiempo puede llevar a la generación de una neoplasia y después a un cáncer.

2.3. VPH, desde la infección hasta el establecimiento del cáncer cervicouterino.

Es claro entonces, que la inestabilidad genómica es favorecida por el VPH, y dicha inestabilidad es primordial en la carcinogénesis en cervicouterino asociada a este virus. Aunque, el tiempo necesario desde la infección hasta el establecimiento del cáncer cervicouterino, puede ser tan prolongado, como un periodo de varios años. Durante este tiempo se habrán presentado distintos grados de lesiones precancerosas, las NICs. Así mismo, el tiempo que transcurre desde el momento de la infección por algún tipo de VPH de alto riesgo, hasta la generación de una NIC, es difícil de precisar. Aunque, un estudio estimó que el riesgo de desarrollar una NIC es mayor cuando la infección persistente (por un tiempo de 6 meses o más) es por VPH 16, y este mismo tipo de VPH es menos probable de ser eliminado, entre todos los VPH oncogénicos. En el mismo estudio, estimaron que a partir del momento de la detección de la infección, hasta un periodo de 48 meses el 89% de la población eliminó el virus, siendo los menos probables de eliminar, los tipo 16 y 33. Mientras que, el riesgo de que una infección por VPH 18 progrese a una NIC es menor en comparación a otros VPHs oncogénicos, pero el riesgo de que una NIC3 progrese a cáncer cervicouterino invasivo (CCI) es mayor cuando la NIC es asociada a VPH 18. Es decir, que la oncogenicidad del VPH 18 está dada por la alta tasa de progresión de una NIC- VPH 18 a cáncer, más que por una alta tasa de progresión de una infección por VPH 18 a una lesión precancerosa **[Jaisamrarn U. et al. 2013]**. El tiempo que transcurre para que una NIC2/3 progrese a CCI es difícil precisar, ya que los estudios longitudinales no son permitidos, porque al momento en que una NIC2/3 es detectada debe ser intervenida. Sin embargo, empleando modelos estadísticos y datos de registros nacionales holandeses se ha estimado que el tiempo medio de progresión de una NIC2/3 a cáncer cervical es de 23.5 años **[Vink**

M. et al., 2013]. En el caso particular de las NIC2/3 VPH 16 positivas, el tiempo de progresión requerido para establecer un cáncer, es altamente variable en comparación a las NIC2/3-VPH 16 negativas. Este hecho tiene sentido con los reportes actuales, que indican que la mayoría de los cánceres cervicouterino, en mujeres jóvenes y en las de edad más avanzada, son VPH 16 positivos **[Jaisamrarn U. et al., 2013]**. En general, el tiempo para el establecimiento del cáncer cervicouterino a partir de la detección de una neoplasia, es lo suficientemente prolongado para la intervención terapéutica oportuna y exitosa, cuando los estudios de detección se hacen con la frecuencia recomendada **[Skinner S. et al., 2016]**.

2.4. Diagnóstico y tratamiento del cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino es una enfermedad clínicamente organizada, de tal manera que, es posible determinar el grado de avance de esta enfermedad, lo cual cobra relevancia para establecer un óptimo esquema de tratamiento. La biopsia cervical es la investigación clínica más importante en el diagnóstico del cáncer cervicouterino, sin embargo, para clasificar adecuadamente la etapa de avance del cáncer, el sistema de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) toma en cuenta resultados de la examinación física, colposcopia, histopatología (biopsia cervical o conización), radiografía y endoscopia. Este sistema de clasificación considera **12 etapas** que son ilustradas en la tabla 2 y, dependiendo de la etapa de avance en que se detecte el cáncer, es el tipo de tratamiento que debe establecerse. Por ejemplo, la quimioradioterapia es el tratamiento estándar en cánceres avanzado localmente o en etapa temprana con factores de mal pronóstico; la quimioterapia, es paliativa solo en pacientes con cáncer metastásico o recurrente cuya expectativa de sobrevivencia es baja; mientras que pacientes, con carcinomas invasivos confinados a cérvix, pueden ser tratados quirúrgicamente (solo pacientes candidatos a cirugía), seguido de radioterapia o quimioradioterapia **[Janicek M. et al., 2001; Petignat P. et al., 2007]**.

Tabla 2. Estadíos del cáncer cervicouterino por FIGO [Janicek M. et al., 2001].

Estadio I
El carcinoma es confinado estrictamente al cérvix (La extensión al corpus debería ser descartada).
<p>Estadio IA: El cáncer invasivo es identificado solo microscópicamente. Todas las lesiones graves, incluso con invasión superficial, son cánceres en estadio IB. La invasión se limita a la invasión estromal medida con una profundidad máxima de 5.0 mm y no más ancha que 7.0 mm.</p> <p>Estadio IA1: Invasión medida del estroma no mayor a 3.0 mm de profundidad y no más ancha que 7.0 mm.</p> <p>Estadio IA2: invasión medida del estroma mayor de 3.0 mm y no mayor de 5.0 mm y no mayor de 7.0 mm. La profundidad de la invasión no debe ser más de 5.0 mm tomada desde la base del epitelio, ya sea superficial o glandular, desde donde se origina. La afectación del espacio preformado (vascular o linfático) no debe alterar la estadificación, pero debe registrarse específicamente para determinar si debería afectar las decisiones de tratamiento en el futuro.</p> <p>Estadio IB: lesiones clínicas confinadas al cuello uterino o lesiones preclínicas mayores de IA.</p> <p>Estadio IB1: Las lesiones clínicas no más grandes a 4.0 cm en tamaño.</p> <p>Estadio IB2: Las lesiones clínicas más grandes a 4.0 cm en tamaño.</p>
Estadio II
El carcinoma se extiende más allá del cuello uterino, pero no se ha extendido a la pared pélvica. El carcinoma afecta a la vagina, pero no tanto como al tercio inferior.
<p>Estadio IIA: No hay afectación parametrial evidente.</p> <p>Estadio IIB: Afectación parametrial evidente.</p>
Estadio III
El carcinoma se ha extendido a la pared pélvica. En el examen rectal, no hay espacio libre de cáncer entre el tumor y la pared pélvica. El tumor afecta al tercio inferior de la vagina. Se incluyen todos los casos con hidronefrosis o riñón no funcional, a menos que se sepa que se deben a otras causas
<p>Estadio IIIA: El tumor no se extiende a la pared pélvica.</p> <p>Estadio IIIB: El tumor se extiende a la pared pélvica y/o hidronefrosis o riñón no funcional</p>
Estadio IV
El carcinoma se ha extendido más allá de la pelvis verdadera o ha afectado clínicamente la mucosa de la vejiga o el recto. Un edema buloso como tal no permite que un caso sea asignado a la Etapa IV.
<p>Estadio IVA: El tumor se disemina a órganos adyacentes.</p> <p>Estadio IVB: El tumor se disemina a órganos distantes.</p>

Cisplatino es una molécula de naturaleza orgánica que entra a la célula por múltiples vías, y forma aductos DNA-platino. Cisplatino es considerado un quimiofármaco de primera línea en el tratamiento del cáncer cervicouterino. El uso combinado de radioterapia y quimioterapia basada en cisplatino ha probado mejorar la tasa de supervivencia en mujeres con cáncer cervicouterino avanzado localmente, en comparación con la combinación de radioterapia y quimioterapia basada en hidroxiurea [Rose P. et al., 1999; Hu Q. et al., 2016]. Sin embargo, la eficiencia que inicialmente exhibe cisplatino, en la mayoría de los pacientes con cáncer cervicouterino, eventualmente se desarrolla resistencia al fármaco [Li Y. et al., 2015]. Los eventos celulares que subyacen a la pérdida de la sensibilidad a cisplatino son la supervivencia celular, proliferación celular, reparación del daño al DNA y endocitosis. La proteína p53 juega un rol clave en la regulación de estos procesos celulares. La pérdida de la señal de localización nuclear en p53 resultó en una dramática disminución de la sensibilidad a cisplatino [Mandic R. et al., 2005]. En efecto, la quimioterapia basada en cisplatino es más efectiva en pacientes que albergan p53 silvestre que en pacientes con p53 mutado [Garzetti G. et al., 1995]. Adicionalmente, pacientes que responden bien a cisplatino muestran una mayor proporción de células p53 positivas, que aquellos que no responden. Por lo tanto, las actividades de p53 son importantes en la sensibilidad a cisplatino.

2.5. El ciclo celular

Entre las actividades mejor caracterizadas de p53 se encuentran aquellas involucradas en el control del ciclo celular. El ciclo celular se compone de un conjunto de eventos que se repiten periódicamente y son regulados para lograr que dos células hijas posean idéntico tamaño y contenido genético al final del ciclo (Figura 6). El ciclo celular, temporalmente en cuatro fases. Las células, antes de iniciar un nuevo ciclo celular, deben garantizar una tasa de síntesis de proteínas, lo mismo que niveles energético y metabólico adecuados, así como un tamaño celular crítico para que la fase G1 progrese a través del ciclo celular. Los principales reguladores en la progresión del ciclo celular son las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks). Los complejos Cdk-ciclina pueden activar o inhibir una plétora de sustratos que promueven o detienen, respectivamente, el inicio y la

progresión de la síntesis del DNA y la mitosis. En la fase G₁, hay dos principales clases de ciclinas: ciclina D y ciclina E. La ciclina D interactúa con Cdk4 o Cdk6, y ciclina E interactúa con Cdk2. El complejo Cdk4/6-ciclina D fosforila al supresor de tumores, retinoblastoma (RB) que se encuentra asociado a factores de transcripción E2F, para producir RB hipofosforilado [Kato J., 1993]. La forma hipofosforilada de RB, es capaz de asociarse e inhibir a factores de transcripción de la familia E2F, que activan la expresión de genes que promueven la progresión a la fase S. Por lo tanto, la expresión de estos genes regulados por E2F, permanece apagada. Por otra parte, RB hipofosforilado se disocia de las desacetilasas de histonas y, consecuentemente la expresión génica de ciclina E es activada [Zhang H. et al., 2000]. Entonces, ciclina E forma un complejo con Cdk2, el complejo Cdk2/ciclina E que fosforila a RB para generar la forma hiperfosforilada [Hinds P. et al., 1992]. RB hiperfosforilado se disocia del factor transcripcional E2F y, E2F libre activa la transcripción de varios genes implicados en la replicación del DNA (POLA2, MCM3, TOP2A, PCNA) y en la regulación del ciclo celular (CCNA2 (ciclina A), CDK2, CDC2 (Cdk1), CDC25A) [Ren B. et al., 2002].

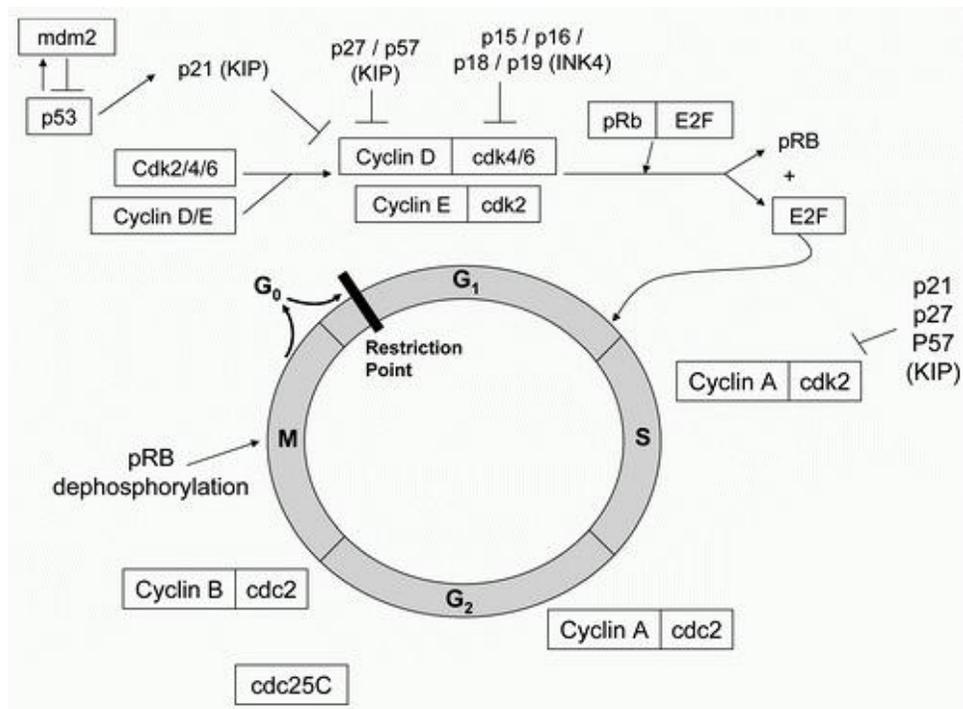


Figura 6. Esquema general de la regulación del ciclo celular.

La actividad de los complejos Cdk2-ciclina E/A es necesaria para iniciar la replicación del DNA (entrada a la fase). A su vez, la actividad de estos complejos es positivamente regulada por la fosfatasa Cdc25A que remueve fosfatos inhibitorios desde la tirosina 15 de Cdk2 **[Blomberg I. et al., 1999]**. Los orígenes de replicación tempranos son específicamente encendidos por el complejo Cdk2-ciclina E/A, mientras que los orígenes de replicación tardíos son preferencialmente encendidos por el complejo Cdk1-ciclina A, durante la mitad y hacia el final de la fase S **[Katsuno Y. et al., 2009]**. El encendido de los orígenes de replicación implica la fosforilación de proteínas iniciadoras específicas, las cuales nuclea el ensamblaje de un gran complejo de proteínas que activa la DNA helicasa y reclutan la maquinaria de replicación al complejo de pre-replicación del DNA en el origen **[Leman A. et al., 2013]**.

Una vez que el DNA es replicado, el ciclo celular progresa hacia la fase G2. Esta fase tiene como prioridad verificar y reparar los daños al DNA que surgen durante las fases previas, G1 o S y que han escapado de sus propios puntos de verificación (checkpoints). La reparación de daños al DNA en la fase G2 garantiza que la célula no transite a mitosis (fase M) con dichas aberraciones, manteniendo así la integridad del genoma, que resulta importante para las funciones celulares normales y la prevención de enfermedades como cáncer **[Kousholt H. et al., 2012]**. Hacia el final de la fase S, la transcripción de la ciclina B1 es iniciada y, la proteína es principalmente citoplasmática. Pero al final de la fase G2, ciclina B1 se trasloca y acumula en núcleo para formar junto con Cdk1, el complejo Cdk1-ciclina B1. Este complejo permanece inactivo por fosforilación de Cdk1 en los residuos T14 y Y15 dependiente de Myt1 y Wee1, respectivamente **[Booher R. et al., 1997; Parker L., et al., 1993]**. Estos fosfatos inhibitorios son removidos por la fosfatasa Cdc25C, cuya síntesis es iniciada al final de la fase S. La completa activación de Cdk1-ciclina B1 requiere la fosforilación activante por la quinasa CAK en el residuo treonina 161 (Thr 161) de Cdk1 **[Castedo M. et al., 2002]**. Una vez activado, el complejo Cdk-ciclina B1, puede fosforilar una plétora de sustratos para promover sustancial reorganización de la arquitectura celular, de los cuales depende la mitosis y la citocinesis. Estos sustratos son nucleares y citoplasmáticos, que incluyen componentes del microtúbulo del citoesqueleto, actina, y filamentos intermediarios, láminas nucleares, complejos del poro nuclear, y el complejo APC/C (la ligasa que

eventualmente degrada ciclina B en mitosis). Estos sustratos resultan cruciales para la formación del huso mitótico, la condensación de la cromatina, la ruptura de la envoltura nuclear que caracterizan a la mitosis en animales [Gavet O. et al., 2010]. Después, la degradación de ciclina B1 es requerida para el establecimiento de la anafase, de manera tal que, ciclina B1 debe ser degradada en la metafase por APC/C quien es activada por la unión a Cdc20 [Chang D. et al., 2003]. En consecuencia, la activación de APC/C, activa a la proteasa separasa, la cual promueve la disociación de las cromátides hermanas por degradación de cohesinas para que mitosis progrese.

2.5.1. Papel de p53 en ciclo celular

p53 es una proteína de vida media relativamente muy corta (5-20 minutos en promedio), cuya estabilidad es regulada por HdM2, una ubiquitina ligasa tipo E3 que poliubiquitina a p53 para su degradación por el proteasoma. Sin embargo, un rango de insultos celulares incluyendo quimioterapia y estrés oxidativo, pueden causar daño al DNA y desencadenar la activación de la quinasa ATM (Figura 7) [Guo Z. et al., 2010]. ATM activada fosforila a p53 en la serina 15 y activa por fosforilación a ChK2, la cual en cambio, fosforila a p53 en la serina 20, un sitio clave para la unión a HdM2. Aunque, estudios bioquímicos indican que la fosforilación de estos sitios en p53 no fueron suficientes para su estabilización. En efecto, la estabilización de p53 requiere la fosforilación de HdM2 en al menos dos sitios blancos de ATM, después de la inducción del daño al DNA [Cheng Q. et al., 2009]. Lo anterior es consistente con la noción de que la activación de ATM induce la degradación de HdM2.

La estabilización de p53 involucra homotetramerización y unión de un doble tetrámero a elementos de DNA de respuesta (ER) a p53 [Kearns S. et al., 2016]. El promotor del gen p21 contiene dos ER a los que p53 se une para activar su transcripción y en consecuencia, incrementar los niveles de proteína p21. Altos niveles de p21 se asocian e inhibe al complejo Cdk2-ciclina E/A induciendo cambios conformacionales. Por lo tanto, pRB no es subsecuentemente fosforilado por Cdk2-ciclina E y permanece asociado a factores de transcripción E2F, de manera que la entrada a la fase S es retardada. Adicionalmente, a su capacidad de arrestar en G1

por asociación con complejos Cdk-ciclina, p21, por asociación a PCNA inhibe la síntesis de DNA y arresta en G1 y G2 **[Cayrol C. et al., 1998]**.

La participación de p53 en el checkpoint durante la fase S es menos claro, pero hay evidencia que el estatus de p53 en fibroblastos tiene un rol en el arresto intra S. A diferencia de los fibroblastos que expresan p53, los fibroblastos isogénicos que no expresan p53, progresaron a mitosis con un contenido de DNA menor a 4N, lo que derivó en la propuesta que p53 evita que la célula con DNA no replicado progrese a mitosis **[Taylor W. et al., 1999]**. Otro trabajo mostró evidencia que una nueva isoforma de p53 ($\Delta p53$) pero no p53 canónico, sobre la activación de ATR, indujo la transcripción de p21. La inducción de p21 resultó en la disminución de la actividad Cdk1/2-ciclina A con una concomitante atenuación de la progresión de la fase S **[Rhoaly G. et al., 2005]**.

La progresión G2/M implica un tamaño celular adecuado, un DNA sin daños y enteramente replicado. Si alguna de estas no cumple, el arresto G2 puede ocurrir. El rol de p53 en el arresto G2 es atribuido a su actividad transcripcional. Cuando p53 es estabilizado por ATM y ChK1/2, activa la transcripción de múltiples genes que actúan retardando la progresión a mitosis. Entre ellos, está p21 que a niveles altos se asocia e inhibe al complejo Cdk1-ciclina B1 **[Bunz F. et al., 1998]**. También el producto del gen 14-3-3 σ , quien es inducido por p53, se une y secuestra en citoplasma a la fosfatasa Cdc25C previamente fosforilada por ChK1/2, para impedir la activación de Cdk1 en núcleo **[Hermeking H. et al., 1997; Peng CY. et al., 1997]**. Además, GADD45 cuya transcripción es activada por p53, induce la disociación del complejo Cdk1-ciclina B1, de tal forma que Cdk1 permanece inactiva **[Kastan M. et al., 1992; Wang X. et al., 1999]**. p53 mediante su actividad represora disminuye la expresión de ciclina B1 **[Krause. K. et al., 2000]**, Cdk1 **[Yun J. et al., 1999]** y Cdc25C **[Clair S. et al., 2004]**. En todos los casos, los estudios tempranos en los que caracterizaron esta actividad de p53, observaron que formas mutantes de p53, pero no p53 silvestre, fueron incapaces de reprimir los promotores de estos genes, y fue soportado por ensayos mutagénicos sobre los promotores de estos genes, encontrando que ciertos elementos secuencia, como la secuencia distal CCAAT en el promotor Cdk1 o el elemento CDE/CHR en el promotor Cdc25C, son necesarios para la unión de p53 y la represión del promotor. Por lo tanto, es claro el rol

importante que tiene p53 en la regulación del ciclo celular en la fase G2 para asegurar una estabilidad genética.

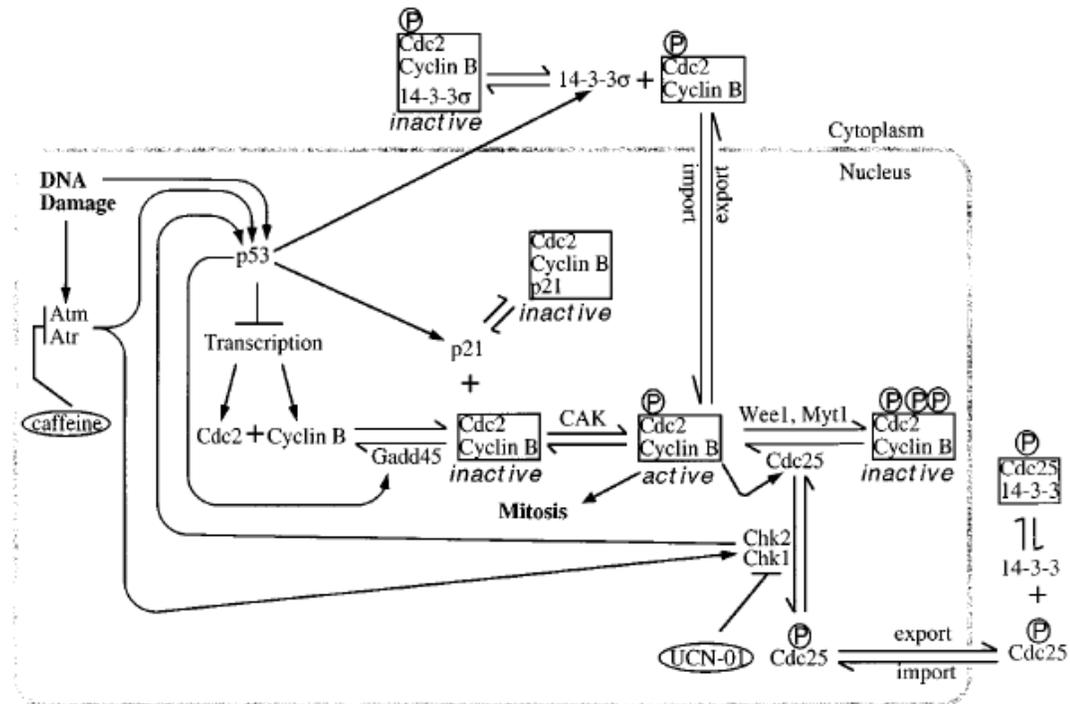


Figura 7. Regulación de la transición G2/M por p53 [Taylor W. et al 2001].

2.6. Apoptosis

La muerte celular puede ocurrir por diferentes vías dependiendo del tipo y del grado de estímulo. Entre los tipos de muerte que se conocen, se encuentran apoptosis, necrosis, autofagia y necroptosis, etc. Pero los tipos de muerte que mejor se han caracterizado son necrosis y apoptosis, dos procesos que pueden ocurrir independientemente, secuencialmente y simultáneamente, [Hirsch G. et al., 1997; Zeiss C., 2003] y pueden incluso, obedecer a un mismo tipo de estímulo. Por ejemplo, necrosis la cual por mucho tiempo fue asociada a una muerte no programada, puede ser provocada por daños celulares que obedecen a estímulos como choque térmico, radiación, fármacos quimioterapéuticos, etc., principalmente, cuando estos están presentes a un nivel excesivo. Sin embargo, estos mismos estímulos pueden inducir apoptosis pero cuando están presentes a un relativo

menor nivel. También es contemplado que la inducción de apoptosis o necrosis depende del tipo celular [Laster S. et al., 1998]. De igual manera, fue descrito que la expresión de caspasas o la disponibilidad de ATP intracelular, son determinantes para la decisión entre apoptosis y necrosis, lo que significa que células que expresan caspasas, o con niveles adecuados de energía (ATP), se someten jerárquicamente a apoptosis sobre necrosis, sobre un estímulo de muerte determinado, pero bajo el mismo estímulo de muerte, las células con expresión nulificada de caspasas o con niveles de energía depletados se someten a necrosis [Oppenheim R. et al., 2001; Nicotera P. et al., 1998].

Necrosis morfológicamente puede distinguirse por el hinchamiento celular, formación de vacuolas citoplasmáticas, la ruptura de la membrana celular, por mencionar algunas [Elmore S., 2007].

Por su parte, apoptosis ocurre de manera programada, a través de eventos moleculares secuenciales mediados por receptor (extrínseca) o a través de la mitocondria (intrínseca), pero ambos tienen en común que activan caspasas, unas proteasas que escinden proteínas conteniendo motivos DXXD y que entre sus muchos sustratos se hayan las nucleasas CAD (DNasa activada por caspasa), las cuales son activadas por escisión. Una vez activas, estas nucleasas catalizan la ruptura del DNA cromosómico en fragmentos de aproximadamente 200pb.

Del mismo modo, los cambios morfológicos que caracterizan la apoptosis suceden de manera secuencial. Los eventos morfológicos más tempranos son la disminución del tamaño celular, la redondez celular y la condensación de la cromatina. Posteriormente, las invaginaciones de la membrana celular son evidenciadas, así como la formación de cuerpos apoptóticos que consisten de citoplasma conteniendo organelos con o sin fragmentos de DNA [Elmore S., 2007].

2.6.1. Rol de p53 en apoptosis

Una variedad de estímulos apoptóticos, que van desde radiación ionizante, hipoxia y moléculas pequeñas, promueven también la activación de p53. Por su parte, el rol de p53 en apoptosis ha sido bien estudiado, y se conoce que su activación puede originar apoptosis mediante sus actividades transactivadora y transrepresora de la

transcripción de genes apoptóticos que controlan ambas vías, la extrínseca (mediada por receptor) y la intrínseca (mediada por mitocondria). También p53 puede activar apoptosis por un mecanismo independiente de la transcripción, que implica su participación directa en mitocondria (Figura 8). Mediante ensayos en animales, se observó que en órganos radiosensibles, p53 se acumula en mitocondria tan pronto los ratones son irradiados por radiación γ . Como resultado, una primera onda apoptótica independiente de la transcripción de p53 es desencadenada, seguida de una segunda onda apoptótica dependiente de la transcripción de p53 [Erster S. et al. 2004]. La acumulación mitocondrial de p53 en timocitos irradiados, conduce a la formación de complejos con Bcl-xL y Bcl-2 a través del dominio de transactivación de p53, lo que deriva en la liberación de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak, y la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, además de una concomitante liberación de citocromo C [Mihara M. et al., 2003]. Otros trabajos muestran que la traslocación mitocondrial de p53 conduce a la oligomerización de Bax [Chipuk J., et al., 2004] y Bak [Leu J. et al., 2004] y a la activación de apoptosis.

Después de la permeabilización de la membrana, citocromo C es liberado, y en presencia de Apaf-1 y dATP, oligomeriza para formar un gran complejo denominado, apoptosoma, el cual recluta y procesa a la pro-caspasa-9 para producir caspasa-9 activa [Yuan S. et al., 2013]. Caspasa-9 recluta y activa a caspasas efectoras -3 y -7, que desencadenan la apoptosis por escisión de múltiples sustratos, como las nucleasas anteriormente mencionadas [Li P. et al., 1997].

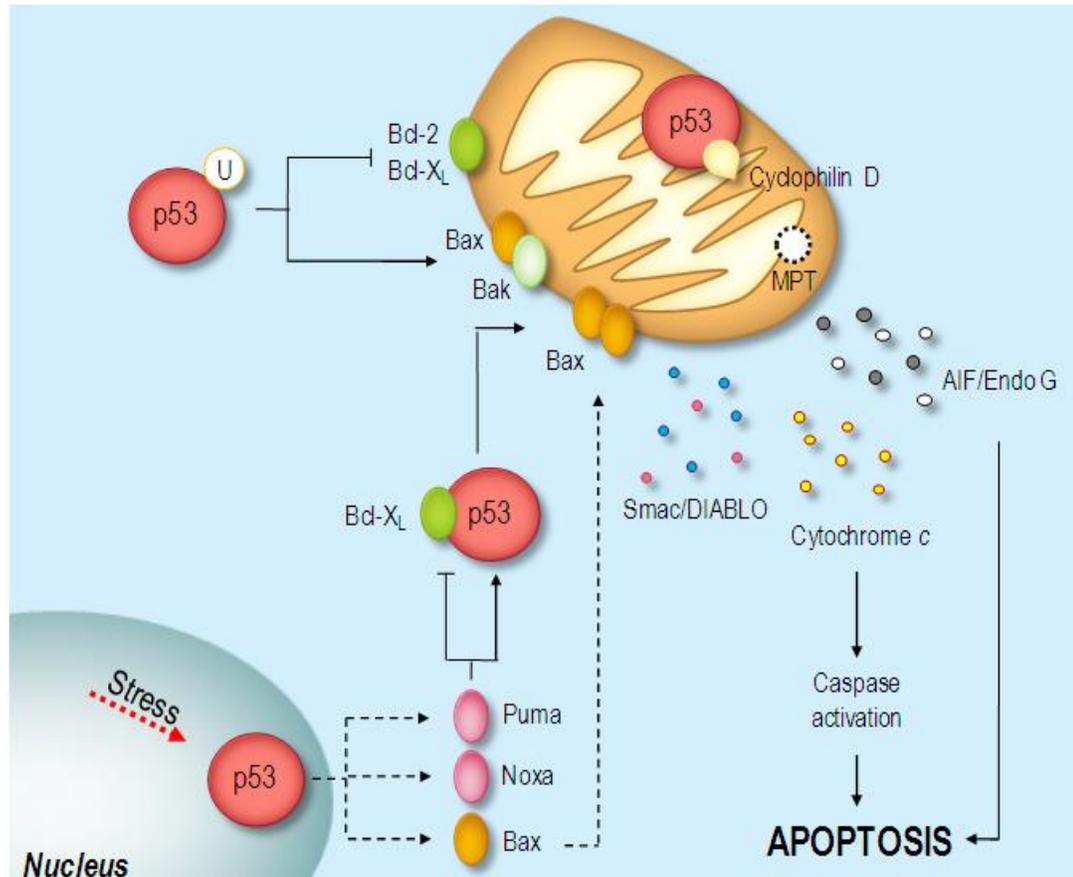


Figura 8. Vías apoptóticas mitocondriales de p53 [Amaral J. et al., 2010].

Los reportes más tempranos establecieron un rol de p53 en apoptosis que requiere de su actividad de transactivación, mediante la cual incrementa la expresión de genes pro-apoptóticos Bax [Miyashita T. et al., 1995], Puma [Nakano K. et al., 2001], Noxa [Oda E. et al., 2000], Bid [Sax J. et al., 2002]. Mientras que por su actividad transrepresora, p53 reprime la expresión de genes anti-apoptóticos como Bcl-2, lo que resulta en la disminución de su producción y la inducción de apoptosis a través de la formación de poros y la permeabilización de la membrana externa mitocondrial [Miyashita T. et al., 1994].

2.7. Flavonoides

Los flavonoides son moléculas fenólicas hidroxiladas que pertenecen al grupo de los polifenoles y son producidos por la vía de fenil-propanoides, en una amplia variedad de plantas, tales como cebolla, té verde y frutos rojos, entre otros. En plantas los flavonoides juegan un rol importante, brindando protección contra distintos estreses de origen bióticos y abióticos, como bacterias, virus y rayos UV [Kumar S. et al., 2013]. Pero la importancia central del estudio de estas moléculas, deriva de las actividades benéficas para la salud en humanos. Las actividades de los flavonoides son dependientes de la estructura, que a su vez, depende de la clase estructural, del grado de hidroxilación y polimerización, así como, de otras sustituciones y conjugaciones [Kelly E. et al., 2002; Kumar S. et al., 2013], pero la actividad *in vivo*, incluso, puede depender de la capacidad de captación/retención del flavonoide por la célula [Wätjen W. et al., 2005]. La base estructural de los flavonoides consiste de un esqueleto de 15 carbonos formado por dos anillos bencenos unidos por un anillo pirano heterocíclico. Los flavonoides se clasifican básicamente, en base a las sustituciones de hidroxilos sobre sitios específicos de su estructura base en: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, isoflavonas, flavan-3-oles o catequinas, antocianinas y chalconas (Figura 9, muestra representativos de subgrupos de flavonoides). Los flavonoides pueden existir como agliconas, glicósidos y derivados metilados. Las hidroxilaciones en los flavonoides ocurren en las posiciones 3, 5, 7, 2, 3', 4' y 5'. Sobre dichas hidroxilaciones, las conjugaciones tipo metilo pueden ocurrir de manera natural. Mientras que las formas glicosiladas de los flavonoides, que incluyen L-ramnosa, D-glucosa, galactosa, arabinosa, ocurren sobre las posiciones 3 o 7 [Gonzales G. et al., 2015].

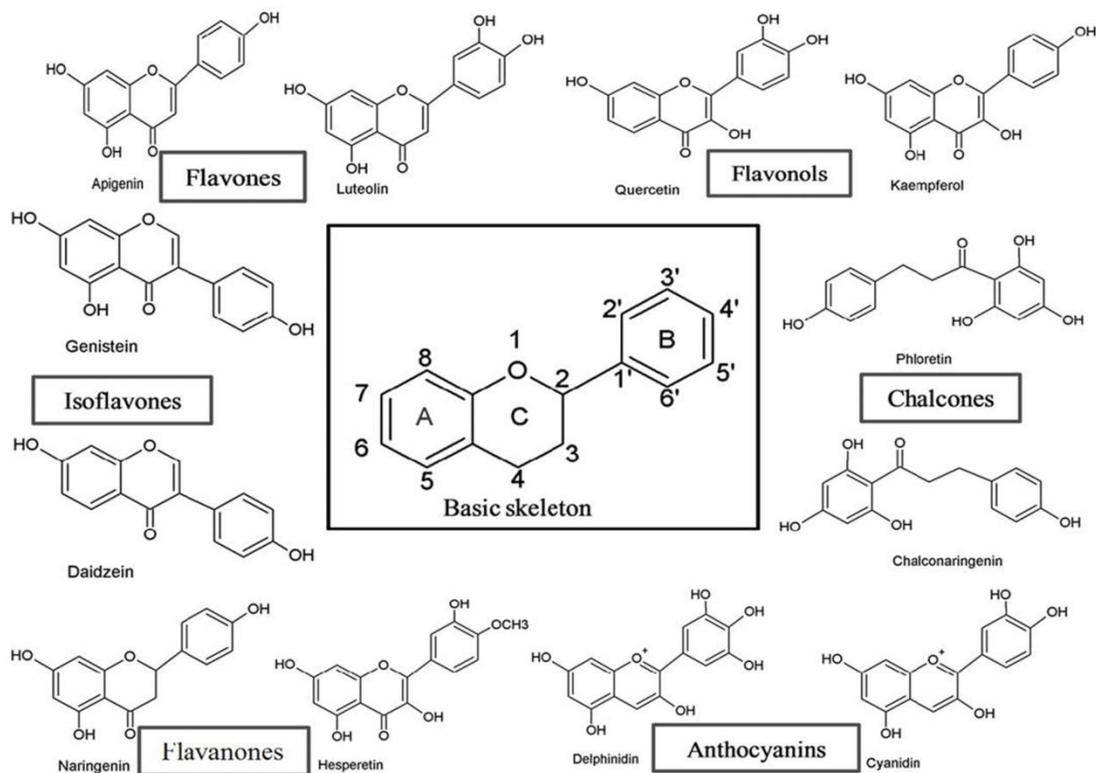


Figura 9. Clasificación de flavonoides y ejemplos representativos de cada grupo [Panche A. et al., 2016].

Estas modificaciones sobre su estructura pueden impactar en las actividades benéficas de los flavonoides, por ejemplo los flavonoides tipo O-glicósidos, en comparación a su correspondiente aglicona, pueden aminorar sus actividades antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica, antitumoral, anticoagulante, inmunomodulatoria, etc. pero otras actividades, tales como anti-HIV, tirosinasa inhibición, antirotavirus, anticolinesterasa potencial, pueden ser mejoradas por estos mismos glicósidos [Xiao J. et al., 2017]. Es ampliamente conocido que la biodisponibilidad de cualquier molécula juega un rol determinante en alcanzar el efecto esperado, y a su vez, la biodisponibilidad depende de diversos factores como la absorción, metabolismo, excreción, y otros aspectos propios de la molécula. El flavonol quercetina, por ejemplo, en su forma quercetina-glicósido presenta más alta biodisponibilidad que otros quercetina-glicósidos, lo cual es atribuido principalmente a la diferencia en la eficiencia de absorción entre estas moléculas

[Hollman P. et al., 1999]. Por lo tanto, es importante considerar que las actividades de los flavonoides pueden ser afectadas por diversas causas, incluyendo la fisicoquímica de la molécula, además de las mencionadas.

2.7.1. Actividad anticáncer de los flavonoides.

Dentro de las múltiples actividades biológicas de los flavonoides, la actividad anticáncer es una de las más estudiadas. Esta actividad anticáncer de los flavonoides se mantiene frente a diversos tipos de cánceres, como el prostático, mamario, pancreático, Colorrectal, hepático, cervical, entre otros. Así mismo, existe una correlación positiva entre una dieta rica en flavonoides y un riesgo bajo de desarrollar cáncer colorrectal, prostático o mamario, por lo que, los flavonoides son considerados agentes quimiopreventivos **[Wenzel U. et al., 2000; Vue B. et al., 2016; Dal-Ho H. et al., 2001]**. Los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos anticáncer de los flavonoides son variados, y diversos estudios indican que sus propiedades antioxidantes, junto con las interacciones proteína-ligando son claves en estos para alcanzar estos efectos benéficos. En estas interacciones, el núcleo fenólico de los flavonoides favorece interacción de tipo Vander wall y electrostáticas con algunas enzimas y ligandos de receptores involucrados en la transducción de señales **[Batra P. et al., 2013]**. Las proteínas quinasas, EGFR, PI3K, Akt, MAPKs, Cdk, juegan un papel importante en muchos procesos celulares, que van desde transcripción, estabilización y degradación de proteínas, replicación del DNA, mitosis, entre muchos otros, por lo que su expresión y actividades deben ser finamente controladas. En cáncer, las actividades de estas enzimas están frecuentemente incrementadas, ocasionando un descontrol en estos procesos celulares.

Un mecanismo asociado al potencial efecto anticáncer de los flavonoides es la inhibición de proteínas quinasas. La isoflavona genisteína, inhibe la actividad del receptor tirosina quinasa, EGFR, por la disminución de su fosforilación **[Gruca A. et al., 2014]**. Además, otros flavonoides como quercetina, kaempferol, daidzeína, genisteína y luteolina pueden inhibir la actividad de Cdk y causar un arresto celular en células de melanoma OCM-1, lo mismo que, el flavonoide silimarina en células

de cáncer de próstata DU145 [Zi X. et al., 1998; Casagrande et al., 2001;]. Así mismo, el efecto anticáncer de flavonoides como quercetina, isorhamnetina, genkwanina, acacetina, entre otros se ha asociado a la inhibición de la actividad quinasa de PI3K, una quinasa de serina/treonina clave para la activación de la quinasa Akt [Zhang H. et al., 2018]. La inhibición de Akt, compromete la activación de muchas vías de señalización reguladas por esta quinasa, que promueven procesos asociados a carcinogénesis, como proliferación, sobrevivencia, angiogénesis.

La inhibición de apoptosis y la progresión acelerada del ciclo celular que favorecen la oncogénesis, son revertidas por los flavonoides. El flavonoide EGCG activó a p53 y al proapoptótico Bax e indujo apoptosis en células MDA-MB-468 de cáncer de mama [Roy A. et al., 2005]. El flavonoide Genisteina indujo apoptosis y arresto celular en células de gliomas, acompañado de la activación de p53 y p21 [Schmidt F. et al., 2008]. Por lo tanto, por los múltiples mecanismos anticáncer de los flavonoides, sitúan a estas moléculas como potenciales quimioterapéuticos.

Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y superóxido, son moléculas altamente reactivas que pueden actuar como mutagénicos, al causar daño al DNA. Por su efecto antioxidante, los flavonoides disminuyen el nivel de ROS, potencialmente perjudicial para la célula. El efecto antioxidante de los flavonoides se asocia al menos a tres mecanismos: 1) por inhibición de enzimas productoras de ROS, como lipooxigenasas (LOX), ciclooxigenasas (COX) y xantina oxidasa (XO) [Lee J. et al., 2010]; 2) por quelación de iones metálicos [Mira L. et al., 2002] y 3) por su capacidad “scavenging”, en la que el flavonoide estabiliza radicales libres altamente reactivos para convertirse por oxidación, en un radical libre mucho más estable [Williams R. et al., 2004].

2.7.2. Actividades antioxidante/prooxidante de quercetina

El grado antioxidante entre flavonoides, es variable y está dado por los sustituyentes y la posición que estos ocupan en la estructura base de los flavonoides. Entre los flavonoides, quercetina es considerado un potente antioxidante, ya que los tres

mecanismos de la actividad antioxidante reportada para flavonoides han sido atribuidos a quercetin [Lee J. et al., 2010; Leopoldini M. et al., 2006]. El mecanismo antioxidante scavenging de quercetina se puede entender porque tras la donación de un protón para la estabilización de un radical libre, quercetina se vuelve un radical mucho más estable, debido a que su estructura polifenólica es capaz de soportar la inestabilidad propia de un radical, al entrar en resonancia a través de sus dobles enlaces conjugados de los anillos aromáticos del flavonoide, como se muestra en la Figura 10.

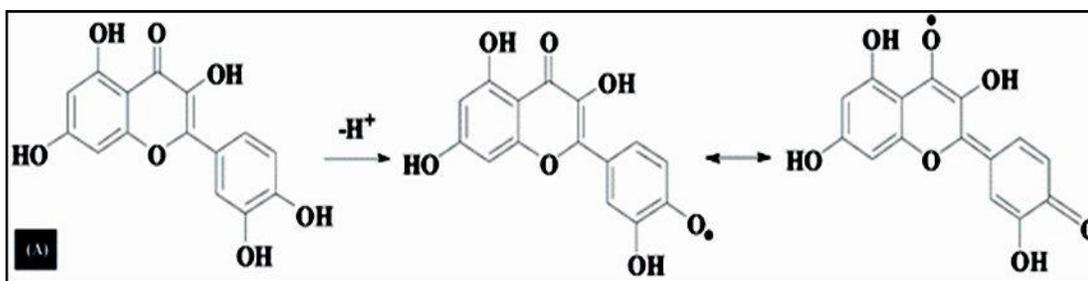


Figura 10. Mecanismo de transformación oxidativa de quercetina. [Tu B. et al., 2015].

Los iones metálicos son bien conocidos por su capacidad redox y por su habilidad de activación de oxígeno. El DNA es una molécula sensible a la oxidación y puede sufrir rupturas por la acción de estos iones metálicos derivando en muchos desórdenes como envejecimiento, cáncer, y enfermedades neurológicas. Por lo tanto, moléculas con actividad quelante son de interés como potenciales fármacos anticáncer. La quercetina ha sido ampliamente estudiada en este aspecto, y ha mostrado que al menos en parte su actividad antioxidante obedece a su capacidad quelante al formar complejos con varios iones metales. Existe incluso, la propuesta que los grupos OH en la posición 3-4, 4-5, y 3'-4' son preponderantes en este mecanismo (Figura 11).

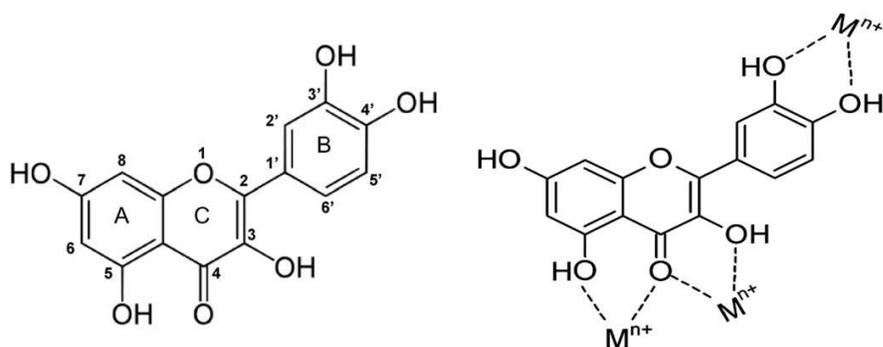


Figura 11. Estructuras de quercetina con numeración atómica y en complejo con ion metal. [Andrea G. et al., 2015; Chobot B. 2010].

La formación de radicales libres puede ser originada por reacciones enzimáticas celulares, por las enzimas prooxidantes, COX-1, COX-2, LOX y NO (óxido nítrico sintasa). La actividad inhibitoria de quercetina sobre cada una de estas enzimas prooxidantes fue ensayada en condiciones *in vitro* libre de células, y quercetina mostró inhibición en todos los casos [Lee J. et al., 2010].

Paradójicamente, quercetina posee efectos prooxidantes, totalmente opuestos al popular efecto antioxidante. Wätjen y colaboradores (2005) reportaron que la concentración de quercetina es determinante entre la suscitación de un efecto antioxidante o prooxidante. Ellos observaron que concentraciones entre 10-25 μM de quercetina, protegieron al DNA de la ruptura y disminuyeron la actividad de caspasa, inducida por H_2O_2 en células de hepatoma de rata. Sin embargo, a concentraciones mayor de 50 μM , quercetina actuó como un agente prooxidante, generando estrés oxidativo, daño al DNA y finalmente la activación de apoptosis. Adicionalmente, los flavonoides quercetina y fisetina fueron quien más se acumularon en las células, entre todos los flavonoides (quercetin, fisetina, taxifolina, miricetina, morina, rutina y catequina) ensayados en este trabajo. Lo que explicaría por qué solamente estas dos moléculas tuvieron efectos protectores en ensayos en las células, pero no así, el resto de los flavonoides los cuales mostraron efecto antioxidante solo en ensayos libres de células [Wätjen W. et al., 2005]. La inducción de apoptosis o la actividad de ruptura de DNA por concentraciones de quercetina mayores a la de 50 μM asociada a la actividad prooxidante ha sido reportada por varios grupos de investigación [Kim G. et al., 2009; Yang B. et al., 2012]. La capacidad prooxidante de quercetina depende de la concentración

puede ser explicada porque su degradación oxidativa catalizada enzimáticamente conduce a la formación de *o*-quinona y *o*-semiquinona, los cuales facilitarían la formación de superóxido y la depleción de glutatión (GSH) [Metodiewa D. et al., 1999]. Además, estas quinonas de quercetina son capaces de formar aductos con moléculas como DNA, RNA y GSH, lo que deriva en un daño de estas moléculas celulares (ver figura 12) [Awad H. et al., 2000]. Entonces, las concentraciones altas de quercetina que la vuelven tóxica para las células de cáncer, pueden ser deseadas desde un punto de vista quimioterapéutico.

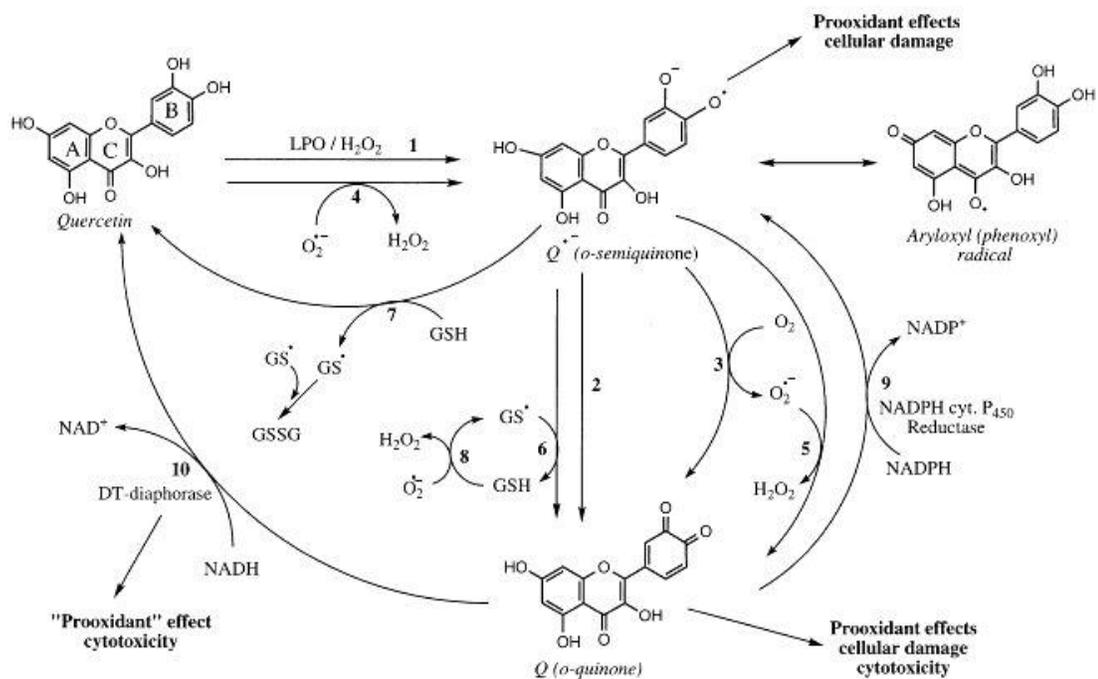


Figura 12. Mecanismo prooxidante de quercetina [Metodiewa D. et al., 1999].

2.7.3. Actividad inhibitoria de los flavonoides sobre E6 y E7 HPV y la restauración de p53

La actividad anticáncer de ciertos flavonoides ha sido ensayada en líneas celulares de cáncer cervicouterino. Interesantemente, algunos de ellos han mostrado actividad inhibitoria sobre las oncoproteínas del VPH expresadas en dichas células, aunque no se ha descrito un mecanismo de acción preciso. Diferentes flavonoides a

concentraciones de 10 a 200 μM , han provocado disminución de los niveles de transcritos y/o de las proteínas E6 y E7, junto con un incremento en la expresión de la proteína p53, en células de cáncer cervicouterino. Por ejemplo, el flavonoide luteolina quien presenta alta similitud estructural con quercetina, disminuyó los niveles de transcrito de E6 y de E7 e incrementó la proteína p53 en células HeLa **[Ham S., et al. 2014]**. Otros autores, prácticamente vieron el mismo resultado, en términos de la represión de los transcritos de E6 y E7 (aunque los niveles de proteína de E6 y E7 no fueron ensayados) y de la restauración de p53, cuando trataron las células de cáncer cervicouterino CaSki y SiHa, con el flavonoide wogonina **[Kim M. et al., 2013]**.

En otro estudio muy interesante en el que realizaron ensayos de unión *in vitro* entre E6 y un fragmento de 70 aminoácidos de E6AP que abarca el sitio de unión a E6, encontraron que la unión entre dichas proteínas disminuyó a distinto grado con la adición del flavonoide luteolina o nuevos compuestos sintéticos con alta similitud estructural a quercetina y luteolina. También mostraron que luteolina y CAF-24 (unos de los nuevos compuestos tipo flavonoides) elevaron niveles de p53 y p21 en células de cáncer o en queratinocitos inmortalizados expresando E6 VPH **[Cherry J., et al 2013]**.

Estos antecedentes de la actividad inhibitoria de los flavonoides sobre E6 indican que son moléculas promisorias para retar a células de cáncer cervicouterino u otras transformadas a través de la acción de E6 VPH y, que un análisis más detallado y extenso es necesario para un mayor entendimiento.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino es considerado un problema de salud pública por sus asociadas altas tasas de mortalidad y de morbilidad, principalmente en países subdesarrollados, como México. Una alternativa para combatir dicho problema es la implementación de nuevos fármacos en la quimioterapia. En células de cáncer cervicouterino, quercetina induce apoptosis, arresto del ciclo celular y restaura la expresión de p53. Sin embargo, no existe información de los eventos que conducen al arresto del ciclo celular, ni a la posible activación de p53. Por lo tanto, consideramos importante estudiar estas cuestiones alrededor del arresto del ciclo celular inducido por quercetina y la activación de p53. Por lo que, nos propusimos analizar la expresión de genes blancos transcripcionales de p53 que regulan el ciclo celular y la apoptosis. Así mismo, nos resultó interesante averiguar si la restauración de p53 inducida por quercetina es una consecuencia de la disminución de la expresión de E6 VPH, el principal regulador de p53 en células VPH positivas.

4. HIPÓTESIS

Quercetina restaura la expresión de p53 en células de cáncer cervicouterino mediante la inhibición de E6 y promueve arresto del ciclo celular y apoptosis por la activación de genes que responden a la actividad transcripcional de p53.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el rol de quercetina en la regulación de la expresión de p53, a través del análisis de la expresión de E6 del virus del papiloma humano y analizar la expresión de genes de ciclo celular y apoptosis regulados por p53.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la citotoxicidad de quercetina en células HeLa y SiHa.
- Analizar el efecto de quercetina sobre el ciclo celular en células HeLa y SiHa.
- Analizar cambios en el nivel de expresión y localización de la proteína p53 inducidos por quercetina en células HeLa y SiHa.
- Analizar el efecto de quercetina sobre la expresión de genes de blancos de la actividad transcripcional de p53 en células HeLa y SiHa.
- Evaluar la apoptosis inducida por quercetina en células HeLa y SiHa.
- Evaluar el efecto de quercetina sobre la expresión de la proteína E6 VPH en células HeLa y SiHa.
- Predecir la unión entre quercetina y E6 VPH 16 por ensayo de acoplamiento molecular (docking).

6. METODOLOGÍA

6.1. Células y Moléculas

En este estudio, las células derivadas de cáncer cervicouterino HeLa (VPH 18) y SiHa (VPH 16) fueron empleadas para analizar el efecto molecular y celular de quercetina en el contexto de las funciones de p53. Además, los fibroblastos de prepucio de humano (HFF), como células no transformadas, fueron empleados como control.

Quercetina (no. cat. Q-4951) y paclitaxel (no. cat. T7402) fueron comprados a Sigma-Aldrich.

6.1.1. Mantenimiento de las células

Todas las células fueron mantenidas en medio DMEM alto en glucosa, suplementadas con 10% de suero fetal bovino (SFB), en una atmósfera de CO₂ del 5% y una humedad relativa del 90%, a 37°C. El conteo celular se realizó previo a cada experimento por tinción de azul de tripano en cámara de Neubauer utilizando la fórmula: *Concentración celular = # células X 10000 X dilución = # células / mL*

6.2. Viabilidad celular por tetrazolio

Las Células HeLa, SiHa y HFF fueron sembradas en placas de 96 a una densidad de 4000 células por pozo y mantenidas en condiciones de cultivo durante la noche. Al día siguiente, las células fueron tratadas con quercetina disuelta en DMSO, en un rango de concentraciones de 0 a 200µM para células de cáncer cervicouterino y de 0 a 1000µM para HFF. Cada concentración de quercetina analizada se evaluó por triplicado. La concentración 0µM fue el control referido como DMSO, el cual ocupó un porcentaje de DMSO menor al 0.05%. A 48h del inicio del tratamiento con quercetina, se reemplazó el medio de cultivo a todas las células, incluyendo control y tratadas, por 100µL de medio de cultivo fresco más 20µL del reactivo, conteniendo un compuesto tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna; MTS] (Promega cat. G3581) e incubado por 2.5 horas. Esta sal de tetrazolio en células vivas es convertida a formazán. La cantidad

de formazán producidas por las células se midió por absorbancia a 450nm en lector de placa, y el valor de absorbancia es proporcional a la viabilidad celular. El porcentaje de viabilidad celular fue determinado, empleando la fórmula:

$(ABS_{Qc} / ABS_{Ctrl}) \times 100 = \% \text{ viabilidad}$; donde:

ABS_{Ctrl} = absorbancia promedio del triplicado en células control.

ABS_{Qc} = absorbancia de células tratadas con quercetina.

6.2.1. Determinación de la concentración inhibitoria 50

Con los datos de porcentaje de viabilidad celular, fue calculada la concentración inhibitoria (CI_{50}) para cada tipo celular en el programa GraphPad Prism6 usando un método de regresión no lineal, bajo la ecuación: Log de inhibidor (concentración logarítmica quercetina) vs respuesta (% viabilidad celular) -- curva variable.

6.3. Citometría de flujo

Se sembraron 3×10^5 células HeLa, SiHa o HFF por pozo en placas de 6-pozos y se incubaron toda la noche a condiciones de cultivo. Posteriormente, las células se expusieron a quercetina a la respectiva CI_{50} . Por otro lado, usamos como control positivo células tratadas con taxol 5nM, una molécula que arresta en mitosis. Las células no tratadas fueron el control negativo. Después de 48 horas, de tratamiento las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X, recuperadas por tripsina e inactivadas con una cantidad igual de medio completo. Se centrifugaron a 1000 rpm por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el botón celular con PBS 1X. Después de otra serie de centrifugación y lavados, las células se fijaron con etanol frío al 70% en PBS 1X y colocadas en hielo por 30 min. Después, se centrifugaron a 3000 rpm por 1 min y el etanol fue retirado. Las células se lavaron dos veces con PBS 1X conteniendo BSA 1% y se centrifugaron a 3000 rpm por 1 minuto para retirar solución. El botón celular fue incubado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNasa A e yoduro de propidio 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS 1X por 20 minutos. Posteriormente, se usaron las células control negativo para establecer los parámetros de adquisición en citómetro. Establecidos los parámetro, se adquirieron 1×10^4 eventos para cada muestra.

Después, con los datos de citometría, se determinó para cada muestra, el porcentaje de la población celular en cada fase del ciclo celular mediante el software FlowJo. El experimento se realizó por triplicado. La significancia estadística, se determinó por un análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA), seguido de una prueba de Dunnett. Los datos (media \pm desviación estándar) fueron graficados. $p < 0.05$.

6.4. Determinación del índice mitótico.

Se cultivaron 5×10^4 células HeLa o SiHa sobre cubreobjetos redondos en placas de 24 pozos. Al día siguiente, las células se trataron a idénticas condiciones que para el ensayo de citometría. Transcurridas 48 horas, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído 4% en PEM (PIPES 100 mM pH 6.9, EGTA 5mM, $MgCl_2$ 2mM) por 45 minutos a temperatura ambiente (TA), seguido de paraformaldehído 4% en buffer $NaHCO_3$ 50 mM por 15 minutos a TA. Después se retiró la solución y se realizaron dos lavados con PBS 1X, para proceder a permeabilizar las células con Tritón X-100 0.1% en PBS 1X, durante 10 minutos. Se retiró la solución de permeabilización y se lavaron las células dos veces con PBS 1X. Finalmente, los núcleos fueron teñidos con el fluoróforo DAPI (0.2 μ g/ml) que se une de manera específica al DNA, durante 15 minutos a 37°C y protegidos de la luz. Las muestras fueron observadas al microscopio de epifluorescencia NIKON y las imágenes de los núcleos teñidos con DAPI se adquirieron a través del software NIS-Elements de Nikon. El experimento se realizó por triplicado. Se analizaron al menos 200 núcleos por condición, provenientes de distintos campos ópticos, y en base a ello, se calculó el índice mitótico. La significancia estadística se obtuvo por la misma metodología mencionada en ciclo celular. $p < 0.05$.

6.5. Evaluación de rasgos celulares apoptóticos

Se colocaron 3×10^4 células HeLa, SiHa o HFF en cubreobjetos redondos en placas de 24 pozos y se incubaron hasta el siguiente día. Las células HeLa y SiHa se trataron con quercetina a la CI_{50} , mientras que las células HFF se trataron a 140 μ M, la concentración más alta empleada. Lo anterior, nos permitiría comparar la

sensibilidad entre células de cáncer cervicouterino con los cultivos primarios HFF no cancerosos.

Transcurridas 72 horas del tratamiento, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se co-tiñeron 10 μ L de naranja de acridina y bromuro de etidio (AO:EB, 5 μ g/mL:3 μ g/mL). El control negativo fueron células no expuestas a quercetina; el control apoptosis, células tratadas con H₂O₂ 1mM por 3 horas; control necrosis, células expuestas a un choque térmico (sumergidas en agua 90°C).

Una vez teñidas las muestras, las imágenes fueron inmediatamente adquiridas con los canales FITC y TRIPC mediante el software NIS-Elements. El experimento fue realizado por triplicado. Este método se basa en la tinción de núcleos, de los que se espera que en células sanas, cuya membrana celular está integra, se observen núcleos de color verde poco intenso por la tinción con AO, quien permea las membranas celulares. En cambio las células apoptóticas pueden poseer distintos patrones de tinción dependiendo de lo avanzado la apoptosis, por ejemplo, en la apoptosis temprana las células se tiñen principalmente de AO mostrando un verde intenso brillante o hasta un amarillo verdoso, pero en una etapa tardía, los núcleos llegan a observarse anaranjados por la co-tinción con EB, el cual consigue unirse al DNA una vez que la membrana está comprometida, como suele suceder en etapas tardías apoptóticas. En necrosis, donde las membranas celulares son desintegradas, permite la tinción de núcleos por EB y estos suelen observarse de un color naranja rojizo pero, a diferencia de la apoptosis en la que el núcleo sufre de condensación, en necrosis los núcleos permanecen relativamente intactos.

6.6. Ensayo de localización de p53

Las células HeLa y SiHa se cultivaron, se trataron con quercetina a la CI₅₀ (el tratamiento de quercetina duró 24 h), se fijaron y se permeabilizaron como en la sección 6.4. Después se agregó el anticuerpo primario anti-p53 (DO-1) a la dilución 1:250 en PBS 1X con SFB 4% y se incubó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Se agregó el anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo Alexa 488 a la dilución 1:1000 en PBS 1X con SFB 4% y se incubó a temperatura ambiente por 1.5 h, cubierto de la luz. Se retiró el anticuerpo secundario y se tiñeron los núcleos con DAPI

(0.2µg/ml) durante 10 minutos a TA, cubierto de la luz. Se realizaron 4 lavados con PBS 1X. Se añadió a cada muestra, una solución de montaje suficiente. Las muestras se protegieron de la luz. Las imágenes para observar la localización de p53 fueron adquiridas por microscopio confocal. La adquisición de p53/Alexa488 se hizo secuencialmente a DAPI para evitar cruzamiento entre ambas señales de fluorescencia. Se cuantificó la intensidad nuclear de p53 de los grupos control y tratado con quercetina, en ImageJ™ Software. A partir de los valores densitométricos de los núcleos de p53 se hizo el análisis estadístico t-test en GraphPad Prism6. $p < 0.05$.

6.7. Ensayo de actividad de caspasas

Se cultivaron 4×10^3 células HeLa o SiHa, en placas de 96 pozos. Al día siguiente, se trataron con quercetina a la CI_{50} o 5nM de taxol como control positivo de activador de caspasas 3/7. Después de 72 h de los tratamientos, se evaluó la actividad de caspasas 3/7 por el kit de fluorescencia caspase-GLO Assay de Promega. El ensayo consistió en agregar a cada pozo, 50µL de medio de cultivo y 50µL del reactivo de lisis celular y luminiscente. Después una hora incubación a TA y protegido de la luz, se transfirió el contenido de cada muestra a placas de 96 pozos de pared blanca. Se determinó la luminiscencia de cada muestra en lector de placas Gliomax de Promega. La significancia estadística se determinó en GraphPad mediante un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett. $p < 0.05$.

6.8. Western blot

Las células HeLa, SiHa o HFF fueron cultivadas a una densidad de 3×10^5 por pozo en placas de 6 pozos. Al día siguiente, fueron tratadas con quercetin a la respectiva CI_{50} e incubadas por adicionales 24 horas para obtener los extractos celulares totales con buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%) e inhibidores de proteasas. Los extractos proteicos se cuantificaron por el método BCA (ácido bicinonínico) en base a una curva de concentraciones conocidas de BSA (2, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25 µg/µL). Para realizar el western blot, se cargaron cantidades iguales de proteína de las muestras control y

tratadas con quercetina, en un gel separador de acrilamida al 12% y se separaron por electroforesis (1h/30mA). Después, las proteínas fueron transferidas durante 100 min a 250 mA a una membrana de PVDF preparada en buffer de transferencia con 20% de metanol. La membrana fue bloqueada con leche baja en grasa al 5% en TBS-T 0.1% durante 1 hora a TA y subsecuentemente lavada con TBS-T 0.1%, 3 veces por 5 minutos. Después, la membrana se incubó durante 18 horas aproximadamente con el correspondiente anticuerpo primario p53 (DO-1) dilución 1:1000, HPV18 E6 (G-7) dilución 1:200, HPV 16/18 E6 (C1P5) 1:100, Bax (2D2) dilución 1:500, Bcl-2 (C-2) dilución 1:500, de Santa Cruz Biotechnology, CA, USA o GAPDH (GA1R) dilución 1:1000 como control de carga de Thermo Fisher-Scientific, IL, USA. La membrana se lavó con TBST 0.1%, 3 veces por 5 minutos. Posteriormente se incubaron por 1.5 horas con el anticuerpo anti-ratón conjugado (sc-516102) de Santa Cruz Biotechnology, CA, USA. La membrana se lavó 3 veces y se reveló con sustrato quimioluminiscente supersignal west femto maximum sensitivity substrate (Thermo Fisher Scientific, cat. 34094). Las imágenes se adquirieron en fotodocumentador digital (Bio-Rad, Chemidoc XRS+ System). La intensidad de banda fue analizada por densitometría en imageJTM software. Los valores densitométricos fueron normalizados al correspondiente control de carga y comparados entre grupos control y tratamiento. La significancia estadística entre grupos, para cada proteína, se realizó por t-test en GraphPad Prism6. $p < 0.05$. La expresión de las proteínas p53 y E6, se evaluó a 24 h del tratamiento de quercetina a la CI_{50} . La expresión de las proteínas Bax y Bcl-2, se evaluó a 48 h del tratamiento de quercetina a la CI_{50} .

6.9. RT-PCR

Se preparó un cultivo de células HeLa y SiHa, a idénticas condiciones que para western blot y a 48 h de tratamiento con CI_{50} , se obtuvo el RNA total de las muestras control y tratada, por columna (Biobasic, cat. BS1361). El RNA total se cuantificó por nanodrop y se trató con DNasa I a 42°C por 1 hora. 200 ng de RNA libre de DNA, se analizaron en gel de agarosa al 1% para determinar la integridad y la pureza de RNA/DNA. Posteriormente, 50ng de RNA libre de DNA, de las muestras control y tratada, se sometieron a una reacción de RT-PCR usando el kit Verso 1-Step RT-

PCR Hot-Start Kit (Thermo Fisher Scientific, cat. #AB-1455) con oligonucleótidos específicos para los transcritos p21 y GAPDH, este último como gen de referencia. Las condiciones de reacción son descritas a continuación:

Etapas de retrotranscripción: 50°C por 1 hora

Inactivación de la RT polimerasa: 95°C por 15 min.

35 ciclos de amplificación de: 95°C por 30 s, 52.1-55°C por 30 s, 72°C por 1 min.

Extensión final: 72°C por 5 min.

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos para los transcritos p21 y GAPDH.

Oligonucleótidos	Secuencia 5'→3'	T.A.	Referencia GenBank
p21 sentido	TTAGCAGCGGAACAAGGAGT	52.1°C	NM_002046.6
p21 antisentido	AGAAACGGGAACCAGGACAC		
GAPDH sentido	CAACGACCACTTTGTCAAGC	55°C	NM_001291549
GAPDH antisentido	GGTGGTCCAGGGGTCTTACT		

T.A.= temperatura de alineamiento.

6.10. Análisis de acoplamiento molecular

A partir de la estructura de cristal de la proteína E6 VPH 16 (PDB ID: 4GIZ), se realizó un ensayo computacional de acoplamiento molecular. Inicialmente se adicionaron los hidrógenos a la estructura de la proteína mediante el servidor charmm-gui (www.charmm-gui.org). La energía de la estructura de E6 VPH 16 fue minimizada con 100 pasos de steepest descent para aliviar los enfrentamientos moleculares altamente desfavorables. Después, las estructuras tridimensionales de quercetina y de otros flavonoides usados como controles (Luteolina, C170 y CAF24), fueron construidas en MARVIN. Posteriormente se construyó una caja de tamaño 50 x 40 x 60Å usando tamaño de malla 1Å con el software Vina con AutoDock Tools y PyMOL. Adicionalmente, con AutoDock tolos se eliminaron todos los hidrógenos hidrofóbicos de la estructura E6 VPH 16 y de los flavonoides. 1000 dockings ciegos rígidos independientes fueron hechos en AutoDock Vina, en los cuales la estructura de la proteína fue rígida, pero no así la estructura de los flavonoides quienes tuvieron libertad de movimiento. El análisis de los dockings se realizó usando local unix scripts. Los mapas de las interacciones ligando-proteína se hicieron con maestro Schrödinger.

7. RESULTADOS

7.1. Citotoxicidad de quercetina en células de cáncer cervicouterino

Quercetina es un flavonoide que ha mostrado citotoxicidad en un amplio número de células, incluyendo HeLa (VPH 18), pero para nuestro conocimiento no existe ningún reporte de la acción quercetina en SiHa (VPH 16). A las 48 horas del tratamiento de quercetina se ensayó la viabilidad celular por MTS. Los resultados mostraron que las células de cáncer cervicouterino fueron alrededor de 7 veces más sensibles a la toxicidad de quercetina, en comparación a las células control, no cancerosas HFF (Figura 13), con CI_{50} para HeLa, SiHa y HFF de 125 μ M, 140 μ M y 915 μ M, respectivamente. Desde una perspectiva clínica, es una ventaja que la quercetina posea mayor toxicidad hacia las células derivadas de cáncer cervicouterino, en comparación a aquellas células no cancerosas como HFF.

Tabla 4. Viabilidad celular en células HeLa, SiHa y HFF.

Quercetina (μ M)	Viabilidad celular relativa al control (%) \pm DE		
	SiHa	HeLa	HFF
0	100 \pm .93	100 \pm 7.39	100 \pm 11.23
12.5	98.8 \pm .613	87.98 \pm 2.35	---
25	96.12 \pm 1.55	82.25 \pm 3.06	94.64 \pm 6.87
50	82.06 \pm 4.97	78.56 \pm 2.02	97.72 \pm 5.79
100	66.09 \pm 3.51	68.31 \pm 1.98	87.27 \pm 4.07
200	20.42 \pm 1.9	31.46 \pm 1.68	90.96 \pm 2.37
400	---	---	80.42 \pm 9.53
800	---	---	50.13 \pm 6.7
1000	---	---	48.29 \pm 3.28

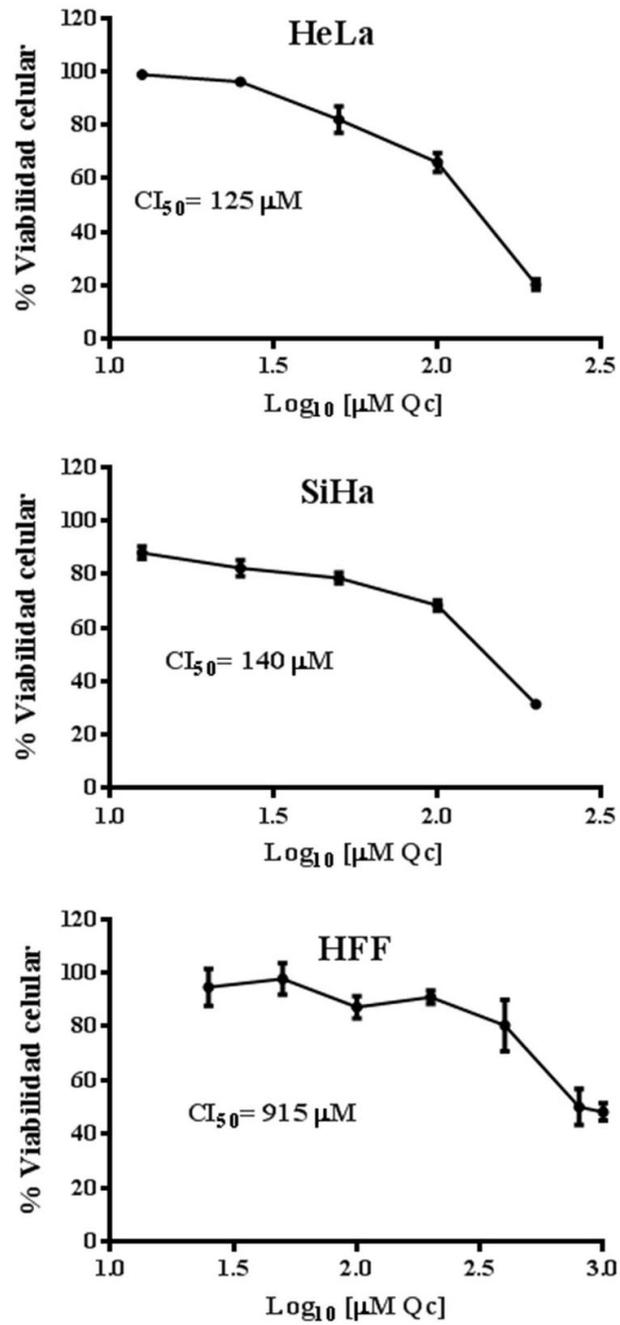


Figura 13. Ensayo de citotoxicidad de quercetina en células de cáncer cervicouterino. A 48h de tratamiento con concentraciones crecientes de quercetina (ver tabla 5), se determinó la viabilidad celular de HeLa, SiHa y HFF. Cada punto en las gráficas representa la media de una concentración de quercetina ensayada por triplicado \pm desviación estándar.

7.2. Quercetina aumenta la población G2/M en células de cáncer cervicouterino

Quercetina es una molécula con múltiples actividades celulares, incluyendo arresto celular. Para saber si la toxicidad de quercetina involucra arresto celular, se realizó un ensayo de ciclo celular por citometría. Los datos revelaron que quercetina a la CI_{50} incrementó significativamente la población en las fases G2/M del ciclo celular en HeLa (***) y SiHa (****) (Figura 14 y 15). En cultivos primarios HFF usados como control, quercetina 140 μ M (igual a CI_{50} para SiHa, usada para comparación por ser la concentración más alta empleada en células de cáncer cervicouterino) no modificó de manera significativa las fases del ciclo celular, mientras que a una alta concentración de 500 μ M, quercetina provocó un ligero incremento de la población G2/M (*). Como se esperaba para taxol, una molécula usada como control positivo de arresto en mitosis, específicamente en metafase, incrementó significativamente la población celular G2/M. A diferencia de taxol, quercetina es una molécula que no se le atribuye un único mecanismo de arresto celular, en cambio, se ha documentado actividad de arresto celular en fases como G1, S y G2/M, sobre diversos tipos celulares, lo cual toma sentido por las distintas actividades asociadas a esta molécula.

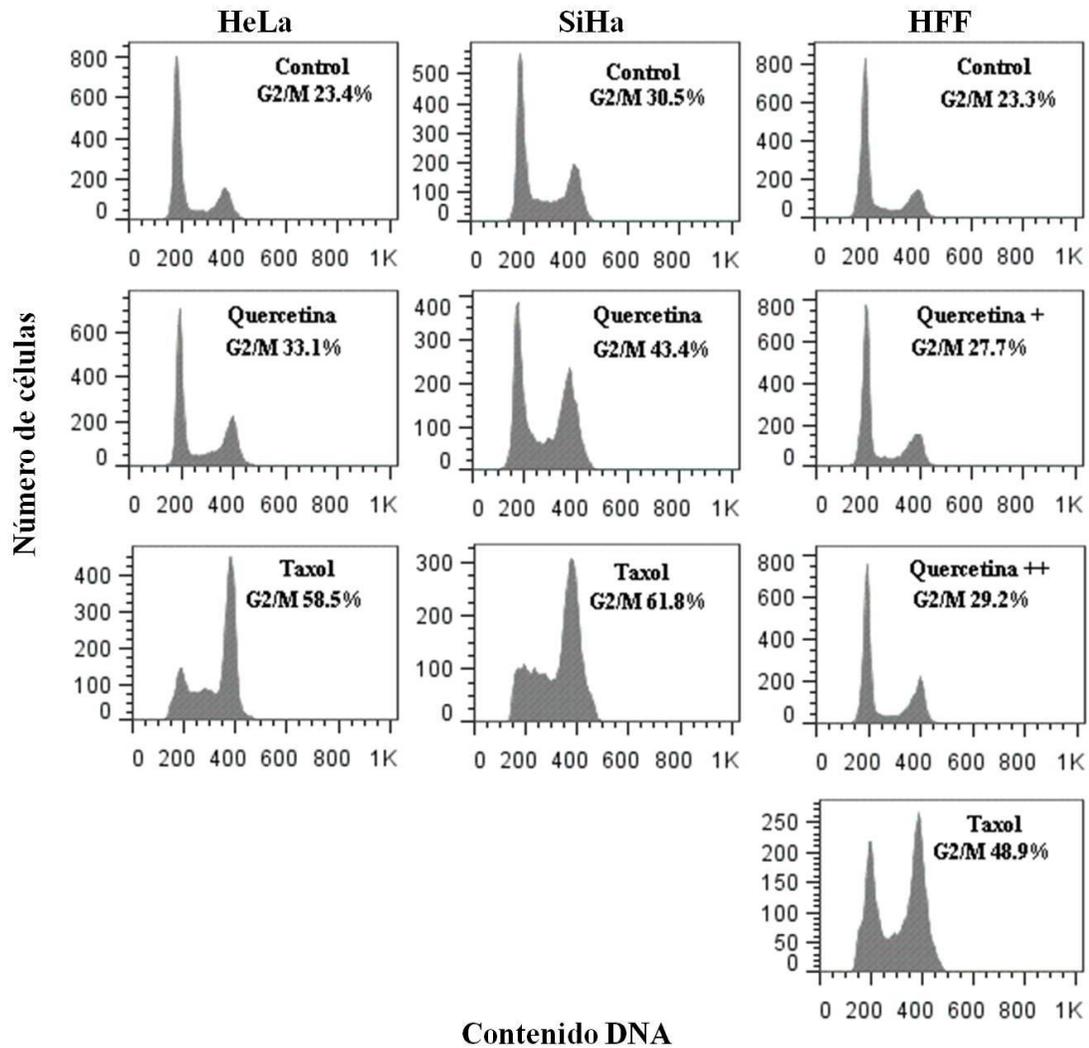


Figura 14. Ensayo del efecto de quercetina en el ciclo celular de células de cáncer cervicouterino.

A 48 horas del tratamiento con quercetina en células HeLa (125 μ M) y SiHa (140 μ M), o células HFF (140 μ M, quercetina +; 500 μ M, quercetina ++), se fijaron con etanol frío 70% y se marcaron con IP. Se determinó la distribución del ciclo celular por citometría de flujo. Las células no tratadas (control) fueron usadas para comparación y Taxol 5nM representa el control positivo de arresto G2/M. Los gráficos fueron creados en FlowJo software.

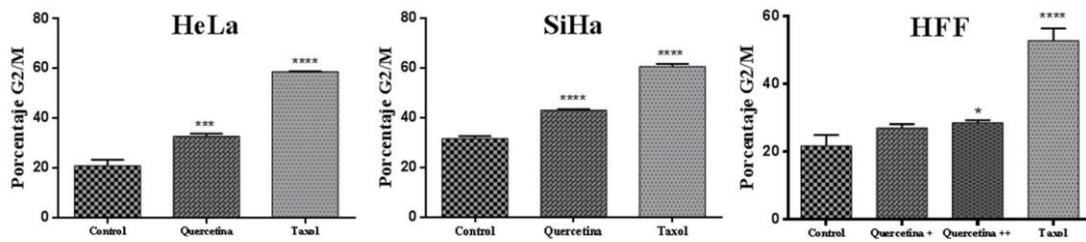


Figura 15. Análisis estadístico del ciclo celular.

El análisis estadístico se realizó a través de un ANOVA de una vía, seguido de una prueba de múltiples comparaciones de Dunnett, a partir de tres experimentos independientes.

7.3. Quercetina arresta células de cáncer cervicouterino en la fase G2 del ciclo celular

Para discriminar entre un arresto en las fases G2 o M inducido por quercetina en células HeLa y SiHa, se analizaron los núcleos teñidos con DAPI, antes y después del tratamiento con el flavonoide. Los resultados mostraron que quercetina no incrementa la cantidad de núcleos mitóticos, a diferencia de taxol que incrementó la cantidad de núcleos mitóticos significativamente (Figura 16). En cambio, quercetina presentó una tendencia a la baja del índice mitótico, con núcleos mayoritariamente en interfase (Figura 16). Estos resultados comprueban que el incremento de la población celular en las fases G2/M, observado por citometría, corresponde a un arresto en la fase G2 del ciclo celular.

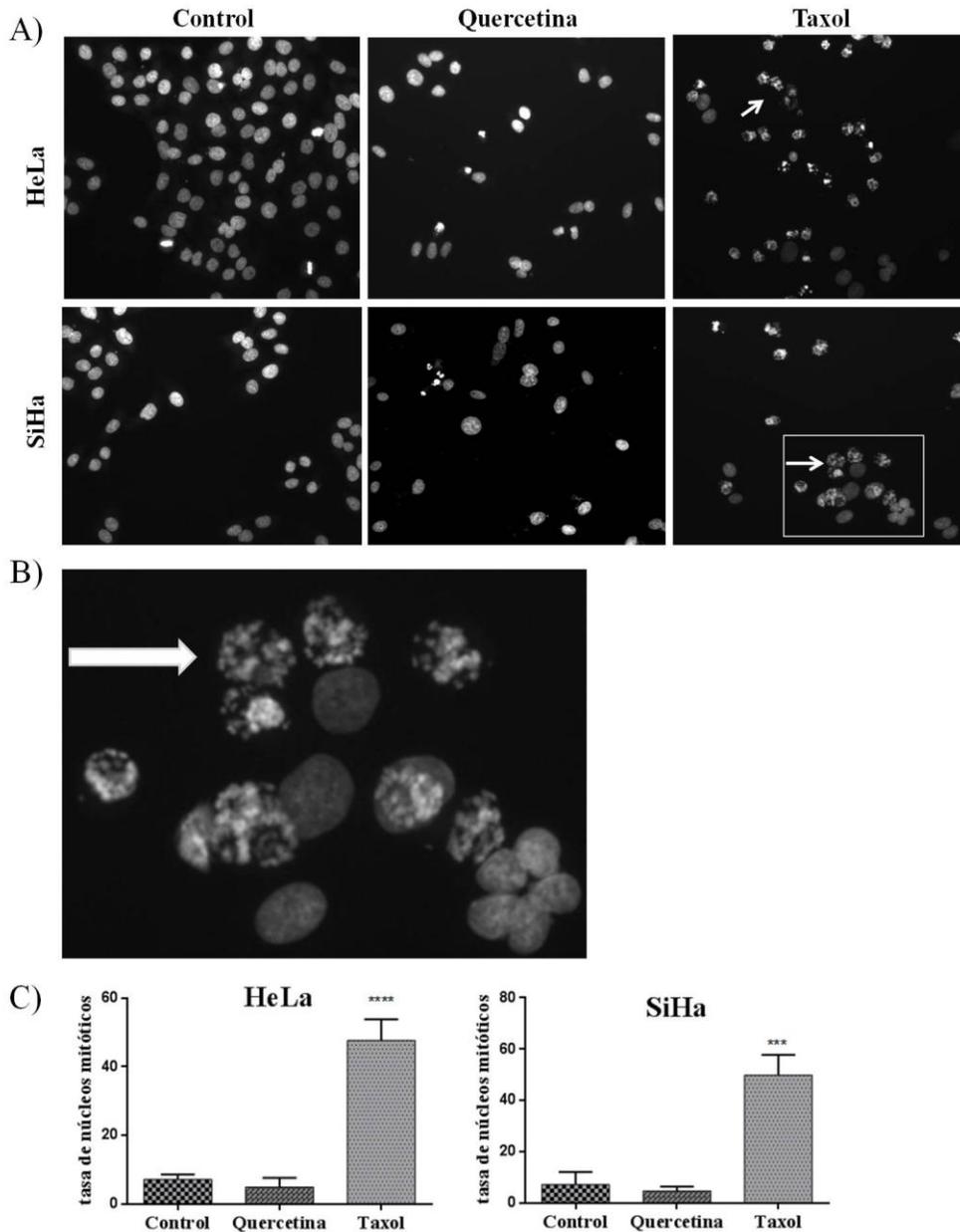


Figura 16. Ensayo del índice mitótico tras el tratamiento de quercetina en células HeLa y SiHa.

Imágenes de microscopía de epifluorescencia de núcleos de células HeLa y SiHa teñidos con DAPI a 48 horas del tratamiento de quercetina CI_{50} o taxol 5 nM (A). Análisis estadístico sobre las diferencias del índice mitótico respecto al grupo control negativo de células no tratadas (B). Ampliación de la imagen SiHa taxol (C). Flechas blancas en taxol indican núcleos mitóticos en metafase.

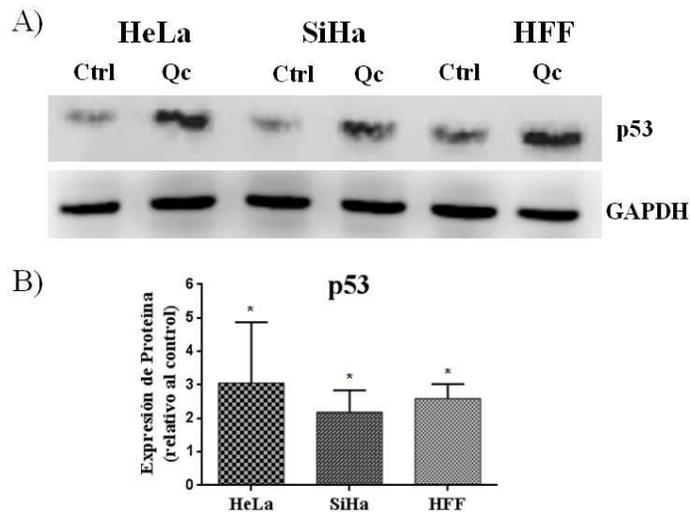


Figura 17. Estabilización de la proteína p53 por quercetina en células HeLa y SiHa.

A partir de extractos celulares de HeLa y SiHa no tratadas (ctrl) o tratadas durante 24 h con quercetina (Qc) a la CI_{50} o de células HFF a 140 μ M (Qc), se analizó por western blot la expresión de p53 (DO-1). GAPDH se usó como control de carga (A). La significancia estadística de la expresión de p53 se determinó por una t-test (B).

7.4. Quercetina incrementa la expresión de p53 y su localización nuclear

La fase G2 del ciclo celular es en gran medida regulada por las actividades transcripcionales de p53, para asegurar que las células con daño al DNA no transiten a mitosis y prevenir así, la ganancia de mutaciones. Para determinar si quercetina incrementa los niveles totales de p53 en células de cáncer cervicouterino, se realizó un western blot a partir de extractos celulares de HeLa, SiHa. Células HFF se usaron como control. Como se muestra en la figura 17, los niveles totales de p53 incrementaron significativamente en todos los tipos celulares ensayados. Aún cuando la estabilización de p53 es regulada diferencialmente en células HFF (vía HDM2), que en las de cáncer cervicouterino, HeLa y SiHa (Vía E6/E6AP). En todas estas células, p53 es encontrado ser silvestre, y por lo tanto, es posible que esta proteína pueda estar involucrada en el arresto en la fase G2 inducido por quercetina. Sin embargo, el aumento de p53 en células HFF, a esta condición (140 μ M) no parece ser determinante para inducir un arresto celular significativo, como se observó en el análisis de ciclo celular. Es bien conocido que el arresto de la fase G2 inducido por p53, requiere además de su estabilización, su traslocación nuclear, para llevar a cabo su función de regulación del ciclo celular.

Para saber si quercetina tuvo un efecto en la localización de p53 en células de cáncer cervicouterino, se realizaron inmunofluorescencias de esta proteína para identificar su localización. Identificamos que quercetina provocó un aumento significativo de la señal nuclear de p53 en células HeLa y SiHa. Lo que sugiere que quercetina promueve actividades nucleares de p53.

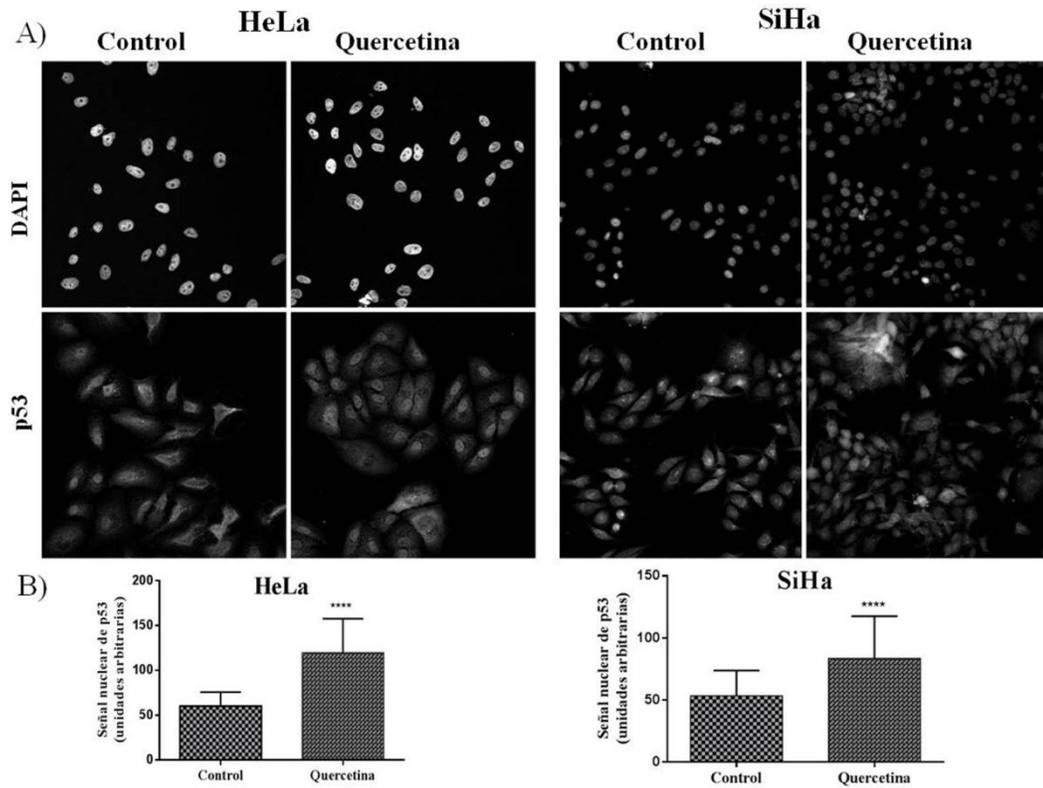


Figura 18. Análisis de la localización nuclear de p53 en células de cáncer cervicouterino.

Imágenes de inmunofluorescencia de p53 adquiridas en microscopio confocal se obtuvieron a partir de células HeLa o SiHa, control o tratadas con quercetina a CI_{50} , y teñidas con anticuerpo primario anti-p53 (DO-1) y anticuerpo secundario antiratón-Alexa 488. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (A). La señal nuclear de p53 se calculó por densitometría en ImageJ™ Software. La significancia estadística se determinó por t-test en GraphPad Prism 6.0. $p < 0.05$ (B).

7.5. Quercetina aumenta la expresión de blancos transcripcionales de p53

Una vez que p53 es activado, genes efectores de la fase G2 pueden ser transcripcionalmente activados o reprimidos para sostener una fase G2 prolongada, donde los daños en el DNA pueden ser reparados. p21 es un gen cuya transcripción es inducida por p53, cuando este último es activado por estímulos genotóxicos. Para investigar la expresión del transcrito p21 se analizó su nivel de transcrito. El resultado mostró que el transcrito p21 incrementó significativamente en ambas líneas celulares de cáncer cervicouterino, después de la exposición a quercetina (Figura 19). Este incremento de p21 correlaciona con el incremento nuclear de p53 inducido por quercetina, lo que sugiere la activación transcripcional de p53.

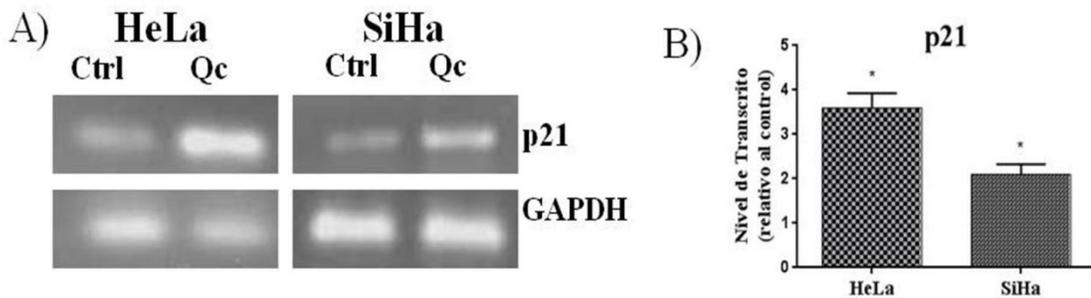


Figura 19. Análisis de la expresión de p21.

A partir de RNA total de células HeLa y SiHa tratadas durante 48 h con quercetina a la CI_{50} (Qc) o las mismas células no tratadas (ctrl), se analizó por RT-PCR la expresión de p21 (A). La significancia estadística de la expresión de p21 se determinó por una t-test. $p < 0.05$ (B).

Otros blancos de p53, son Bax y Bcl-2, el primero de ellos es transcripcionalmente inducido, mientras que la transcripción de Bcl-2 es reprimida por p53. Para conocer si la expresión de estos genes es modificada por quercetina, se ensayaron sus niveles de proteína. Los resultados reflejaron un incremento significativo de Bax, mientras que el nivel de Bcl-2 no se vio significativamente modificado (Figura 20A, B). Por un lado, el incremento de Bax, da mayor soporte a la noción de la activación transcripcional de p53 promovida por quercetina. Por otro lado, el aumento de Bax consecuentemente aumenta la relación Bax/Bcl-2, un evento inicial de la apoptosis mitocondrial que forma parte de la vía apoptótica de p53.

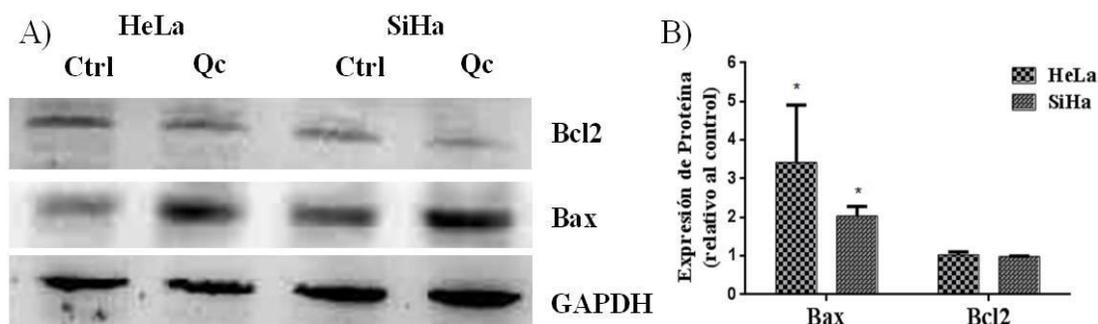


Figura 20. Análisis de la expresión de Bax y Bcl-2.

A partir de extractos celulares de HeLa y SiHa no tratadas (Ctrl) o tratadas durante 48 h con quercetina (Qc) a la CI_{50} , se analizó por western blot la expresión de Bax y Bcl-2. GAPDH se usó como control de carga (A). La significancia estadística de la expresión de Bax y Bcl-2 se determinó por una t-test. $p < 0.05$ (B).

7.6. Quercetina induce apoptosis en células de cáncer cervicouterino

Después de un prolongado arresto celular, la apoptosis puede tener lugar. Debido a la activación de p53, un conocido activador de apoptosis, además del incremento de la relación Bax/Bcl-2 inducida por quercetina, quisimos ensayar la inducción de apoptosis por quercetina en células HeLa y SiHa de cáncer cervicouterino. Se analizaron los rasgos morfológicos apoptóticos por microscopía de epifluorescencia mediante la tinción con AO/EB. Las células HFF fueron incluidas como control. Las imágenes de microscopía revelaron que quercetina provocó que los núcleos de las células HeLa y SiHa, se tiñeran de un color verde amarillento intenso (Figura 21), una característica morfológica asociada a apoptosis. Además puede observarse principalmente en SiHa la formación de cuerpos apoptóticos, tanto en control de apoptosis, como en el tratamiento con quercetina. Las células HFF no mostraron rasgos apoptóticos tras la exposición a una concentración de quercetina de 140 μ M, la más alta ensayado en células de cáncer cervicouterino. Por lo tanto, es de relevancia que quercetina tenga efectos citotóxicos selectivos hacia células de cáncer cervicouterino versus un tipo celular no canceroso, a pesar de que en todas las células se observó un incremento significativo de la proteína p53.

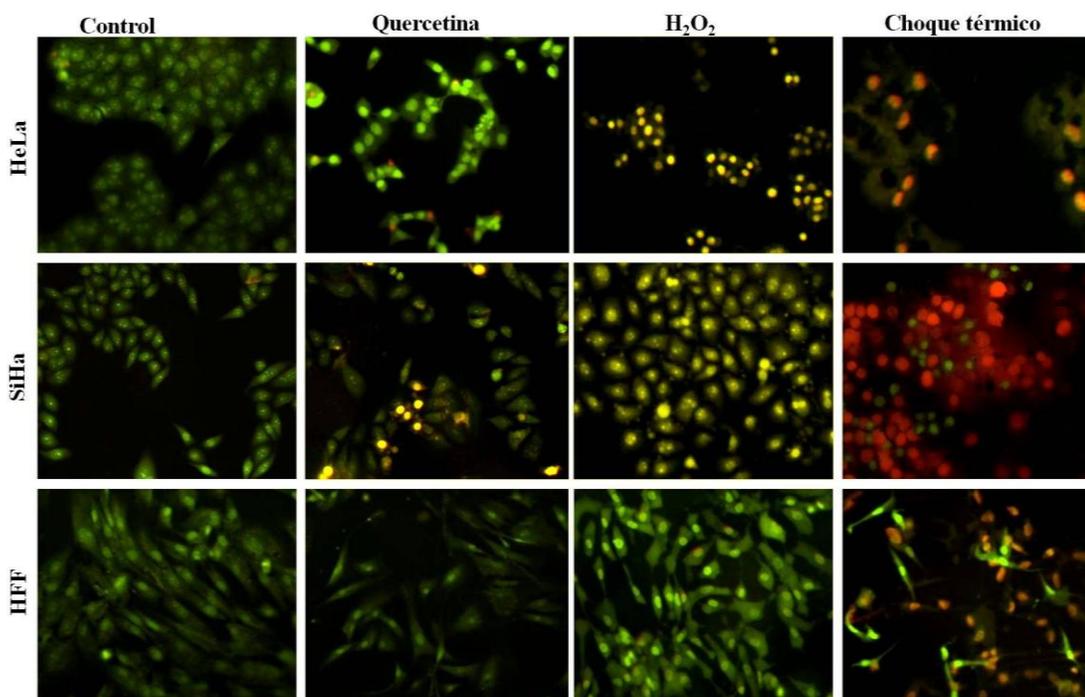


Figura 21. Ensayo de rasgos morfológicos apoptóticos en células de cáncer cervicouterino.

Células HeLa y SiHa, expuestas a quercetina (Qc) a la CI_{50} y células HFF a $140 \mu\text{M}$ de quercetina (Qc) por 72 horas, se tiñeron con AO/EB. Las imágenes se adquirieron por microscopía de epifluorescencia. Células control (no tratadas). H_2O_2 (1mM por 3h) se usó como control de apoptosis. Choque térmico (90°C por 20 s) se usó como control de necrosis.

7.7. Quercetina induce actividad de caspasas en células de cáncer cervicouterino

La actividad de caspasas es un proceso irreversible y un evento bioquímico muy característico de apoptosis. Con el fin de corroborar la inducción de apoptosis por quercetina, evaluamos en células de cáncer cervicouterino, la activación de caspasas3/7. Observamos que quercetina incrementó significativamente la actividad de caspasas en HeLa (*) y SiHa (****) (Figura 22). El conjunto de datos moleculares (aumento de la relación Bax/Bcl-2), celulares (microscopía epifluorescencia) y bioquímicos (actividad de caspasas), indican que quercetina induce apoptosis en estas células de cáncer cervicouterino.

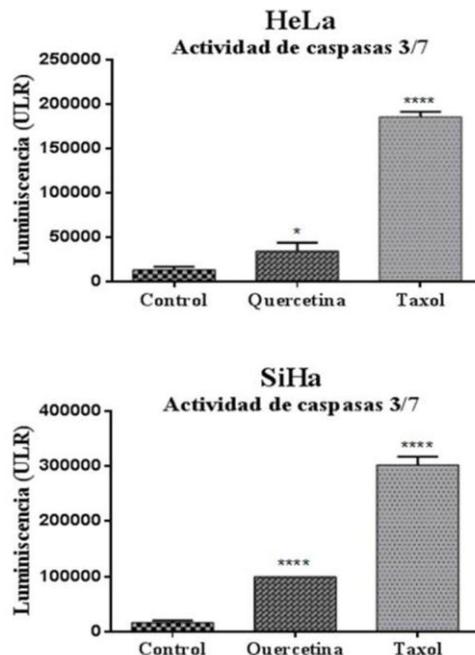


Figura 22. Evaluación de la actividad de caspasas en células de cáncer cervicouterino. Células HeLa y SiHa se trataron con quercetina a la CI_{50} o taxol 5nM (control de apoptosis) durante 72h. La actividad de caspasas fue ensayada por un kit luminiscente cuya luminiscencia es proporcional a la actividad de caspasas. La luminiscencia de los tratamientos fue comparada con las células control no tratadas. La significancia estadística fue calculada por ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett. $p < 0.05$.

7.8. La reactivación de p53 inducida por quercetina en células de cáncer cervicouterino es independiente de la expresión de E6 VPH

p53 es una proteína inestable, con una vida media relativamente corta. Normalmente su estabilidad es dependiente de la ubiquitina ligasa Hdm2 en [Hengstermann A. et al., 2001], pero en células que expresan E6 VPH de alto riesgo, como es el caso de HeLa y SiHa, el control se vuelve totalmente dependiente de E6 y de la ligasa celular E6AP [Huibregtse JM. et al., 1991]. Por lo tanto, la noción que la activación de p53 provocada por quercetina implique la disminución de la expresión de E6, toma sentido. Para analizar esta posibilidad se realizó un western blot de E6 después del tratamiento con quercetina a la CI_{50} . Los resultados mostraron que el nivel expresión de la proteína E6 se mantuvo constante en ambas líneas celulares, HeLa y SiHa, a pesar de la activación de p53 (Figura 23). Entonces, surge la posibilidad que la activación de p53 obedezca a una

inhibición de la actividad de E6 por quercetina, a través de una interacción directa molécula-proteína. Lo anterior toma sentido con los datos reportados por otros grupos de investigación [Cherry J. et al., 2013; Yuan C. et al., 2016].

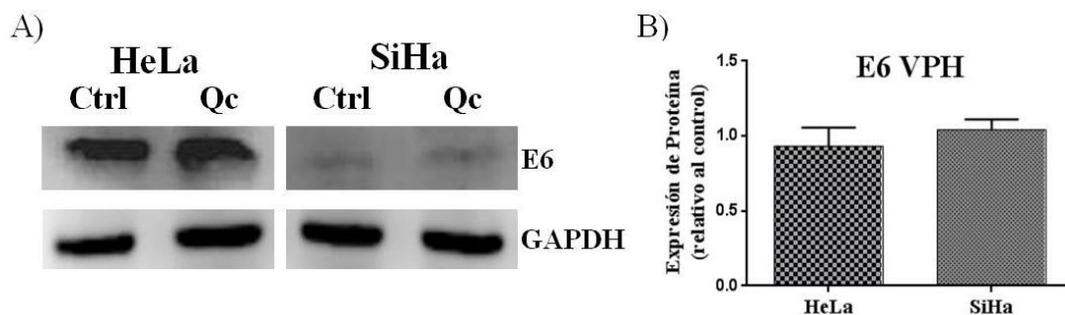


Figura 23. Análisis de la expresión de E6 VPH tras el tratamiento con quercetina en células de cáncer cervicouterino.

Western blot de E6 VPH a partir de extractos totales de células HeLa y SiHa, obtenidos a 24 horas del tratamiento de quercetina a la CI_{50} (A). GAPDH fue usado como control de carga. La significancia estadística para cada gen fue determinada por una prueba t-test (B).

7.9. Acoplamiento molecular predice la unión de quercetina a E6 VPH sobre el sitio de unión de E6AP

La estructura de la proteína E6 VPH-16 (PDB ID: 4GIZ) previamente resuelta por cristalografía [Zanier K. et al., 2013], fue sometida a 1000 acoplamientos moleculares (del inglés, molecular docking) independientes asistido por computadora para predecir la interacción con quercetina. Luteolina y otros compuestos sintéticos tipo flavonoide (compuesto 170 y CAF-24) que previamente mostraron interacción directa con E6 y su inhibición, se incluyeron como controles [Cherry J. et al., 2013]. Los resultados mostraron que quercetina y el resto de los compuestos se unieron en tres sitios distintos sobre E6, designados como: Sitio 1, Sitio 2 y Sitio 3 (ver Figura 23). Quercetina y el resto de los flavonoides se unieron al pocket hidrofóbico de E6 (Sitio 2, el sitio donde la ligasa E6AP hace contacto con E6 para formar el complejo E6/E6AP) con distintas conformaciones. Las energías con que cada una de las moléculas se unió en cada sitio de E6, se ilustran en la tabla 6. Quercetina se unió al sitio 2 con una energía de -7.08 ± 0.18 kcal/mol, solo por arriba de CAF-24, el control que mostró la energía de unión más baja de -7.98 ± 0.18 . Este resultado, fortalece la propuesta que quercetina se une a E6 para inhibir

su actividad de degradación de p53, posiblemente compitiendo con la ligasa E6AP por la unión a E6. Los otros 2 sitios donde quercetina contactó sobre la estructura de E6, se localizaron, uno hacia el amino terminal (sitio 1, Figura 23 B) y otro de ellos hacia el carboxilo terminal (sitio 3, Figura 23 D). Quercetina en el sitio 3, estableció contactos con residuos que no se conocen necesarios para la formación del complejo E6/E6AP/p53. Por otra parte, los contactos que quercetina predijo establecer con E6 en el sitio 1, resultan cruciales para la asociación de E6 con p53, lo que resultaría en la interrupción del complejo E6/E6AP/p53 y estabilización de p53. Los resultados en conjunto, sugieren una importante actividad de quercetina en la activación de p53, asociada a un arresto celular en G2 y la subsecuente apoptosis, posiblemente por la interrupción de la asociación de E6 con E6AP y consecuente con p53, previniendo la degradación de este último.

Tabla 5. Ilustración de los aminoácidos de E6 VPH con los que cada flavonoide estableció contacto y su energía promedio de 1000 acoplamientos moleculares ciegos en el sitio de unión a E6AP (sitio 2) de la proteína E6 VPH.

Ligando	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Energía (kcal/mol) en sitio 2
Quercetina	D4, P5, Q6, E7, R8, P9, R10, C51, I52, V53, Y54, R55, R131.	V31, Y32, F45, D49, L50, C51, I52, V53, R55, Y60, A61, V62, L67, Y70, S71, L100, R102, Q107, R131.	S82, Y84, R117, H118, K122, Q123, R124, H126, R135, C139, S140.	-7.08 ± -0.18
CAF24	P5, Q5, E7, R8, P9, R10, C51, I52, V53, Y54, R55.	R10, K11, V31, Y32, F45, D49, L50, C51, V53, R55, A61, V62, L67, Y70, S71, I73, S74, R77, H78, R102, Q107, I128, R131, T133.	K72, I73, E75, Y76, Y79, S82, R124, H126, R135	-7.99 ± -0.18
C170	*	P5, R8, P9, R10, K11, V31, Y32, F45, D49, L50, C51, I52, V53, Y54, R55, Y60, A61, V62, C66, L67, F69, Y70, S71, I73, S74, E75, R77, H78, L100, R102, C103, I104, Q107, I128, R129, R131, T133.	*	-6.8 ± -0.17
Luteolina	D4, P5, G6, Q7, R8, P9, R10, C51, I52, V53, Y54, R55, R131.	R10, K11, V31, Y32, F45, R48, D49, L50, C51, I52, V53, Y60, A61, V62, C66, L67, Y70, S71, S74, Q75, H78, L100, R102, G107, R131.	S82, Y84, R117, H118, K122, G123, R124, H126, R135, S140.	-6.82 ± -0.19

N.O.= No observado

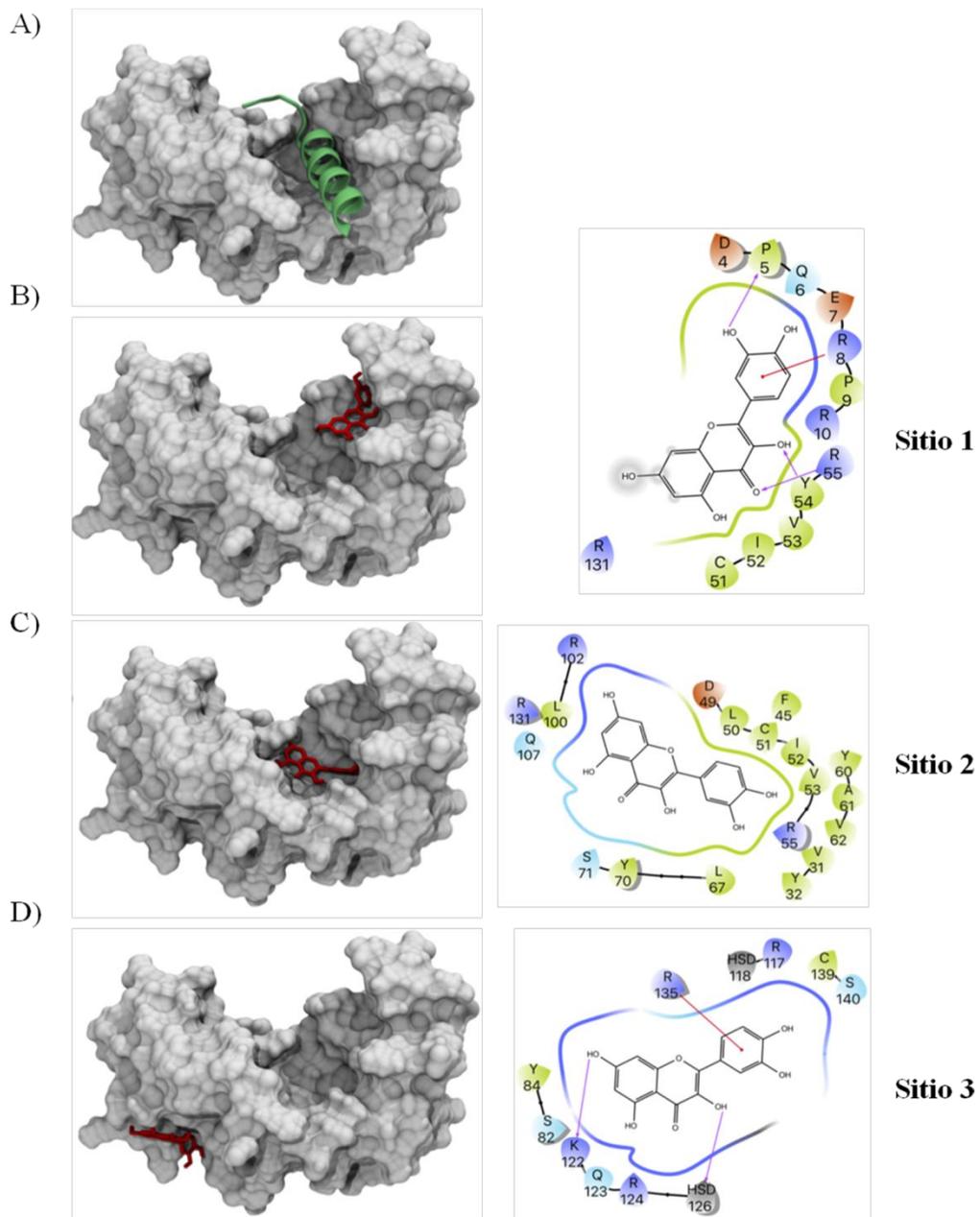


Figura 24. Imágenes seleccionadas de 1 docking de quercetina sobre E6 VPH-16.

E6 VPH 16 en complejo con la hélice α de E6AP conteniendo el motivo LxxLL de unión a E6 VPH 16 (A). Quercetina unida al sitio 1 (B), sitio 2 (C) y sitio 3 (D) de E6 VPH 16 y los correspondientes residuos de E6 VPH 16 con los que quercetina establece contactos a 5 angstroms de distancia.

8. DISCUSIÓN

La infección por VPH es la más común transmitida sexualmente en humanos. Los VPHs oncogénicos son los agentes etiológicos del cáncer cervicouterino [Walboomers J. et al., 1999]. A pesar de que existen vacunas efectivas contra la mayoría de los VPHs oncogénicos, además de esquemas de detección de cáncer cervicouterino basados en la identificación de VPH, citología y colposcopia de útero [Lee L. et al., 2017], el cáncer cervicouterino sigue siendo un problema de salud pública mundial. El cáncer cervicouterino, en mujeres es el cuarto más mortales [Torre LA. et al., 2015]. Aunado a lo anterior, la quimiorresistencia de este cáncer tiene un impacto en la sobrevivencia de las pacientes, de tal manera, que existe la necesidad de implementar quimiofármacos efectivos frente al cáncer cervicouterino.

En este estudio, investigamos en primer lugar la toxicidad del flavonoide quercetina sobre células de cáncer cervicouterino, HeLa y SiHa. Encontramos que quercetina presentó mayor toxicidad hacia las células HeLa y SiHa de cáncer cervicouterino, en comparación a las células control HFF, al grado de requerir concentraciones 7 veces mayores de quercetina en células HFF para lograr la citotoxicidad alcanzada en células de cáncer cervicouterino (Figura 13). Lo anterior indica un grado de selectividad citotóxica de quercetina en células de cáncer cervicouterino, lo que significa un primer paso en aspectos de seguridad farmacológica.

Quercetina es conocido por su capacidad de arresto celular en múltiples tipos celulares cancerosos, pero el tipo de arresto celular originado por quercetina no es idéntico en todos los tipos celulares cancerosos. Esto indica que, tanto el contexto de expresión génica en cada tipo celular, como la multifuncionalidad de quercetina, es decir, los múltiples blancos moleculares que posee, son determinantes en el tipo de arresto celular resultante. En células de cáncer de mama MDA-MB-231, quercetina indujo un arresto celular en las fases S y G2/M, a través de la inhibición de la vía de señalización JNK-Foxo3a y de la activación de la vía p53-p21 [Nguyen L. et al., 2017].

En primera instancia, encontramos que quercetina indujo arresto celular en la fase G2/M tanto en células de cáncer cervicouterino como en los cultivos primarios HFF.

Aunque para lograr este arresto celular en células HFF ($p < *$), el cual fue claramente menos prominente que en cervicouterino, se requirió emplear concentraciones de quercetina 4 veces más altas (500 μM) a las usadas en células de cáncer cervicouterino, HeLa y SiHa. Esto corroboró la sensibilidad de las células de cáncer cervicouterino hacia quercetina.

Este resultado coincide con lo reportado por Priyadarsini R. y colaboradores (2010), un estudio en el que las células HeLa fueron arrestadas en G2/M por quercetina **[Priyadarsini R. et al., 2010]**.

Debido a que el análisis del ciclo celular por citometría no permite discriminar entre arresto en G2 y arresto en M, delineamos mediante el cálculo del índice mitótico, que el arresto celular inducido por quercetina, ocurrió en la fase G2, ya que de haber ocurrido el arresto en la fase M, se esperaría un incremento significativo en el número de núcleos mitóticos tras el tratamiento con quercetina, un hecho que solo ocurrió en las células tratadas con taxol, el control positivo de arresto en fase M. En cambio, con quercetina, las células HeLa y SiHa mantuvieron núcleos principalmente en interfase, indicando que el arresto celular ocurrió en la fase G2. Para nuestro conocimiento, es la primera vez que se detalla este fenómeno de arresto celular ocasionado por quercetina en estas células de cáncer cervicouterino.

El arresto del ciclo celular en la fase G2, ocurre principalmente por daños al DNA ocasionados por genotóxicos o por errores durante la replicación del DNA. Si bien, quercetina, a concentraciones bajas es un potente agente antioxidante y como tal protege al DNA del estrés oxidativo, a concentraciones altas ($>40 \mu\text{M}$) actúa como prooxidante ocasionando daño a moléculas como el DNA, lo que deriva en un arresto celular **[Wätjen W. et al., 2005; Metodiewa D. et al., 1999]**. Cuando el daño al DNA ocurre, p53 puede ser activado por acción de proteínas cinasas que regulan su estabilización y traslocación a núcleo, donde p53 ejerce su actividad transcripcional, a través de la cual regula procesos celulares como el arresto celular en diversas fases del ciclo **[Loughery J. et al., 2014; Mesaeli N. et al., 2004]**. p53, a través de múltiples vías reprime la actividad del complejo Cdk1-ciclina B1 para ocasionar un arresto en G2, mientras que, paralelamente p53 puede regular otras funciones como la reparación de daño al DNA **[Senturk E. et al., 2013]**. En efecto,

los resultados de western blot indicaron un incremento significativo de los niveles de p53 por la acción de quercetina en todas las células ensayadas, incluyendo las células HFF, usadas como control (a la concentración de 140 μ M de quercetina por ser esta la concentración más alta empleada en células de cáncer cervicouterino). Lo anterior resulta interesante, ya que a esta concentración a la que quercetina produjo un incremento de la proteína p53 en células HFF, no se reflejó en un arresto celular en las mismas células. Mientras que en células HeLa y SiHa, la concentración de quercetina que produjo un incremento de los niveles de proteína p53, ocasionó un arresto en la fase G2 en ambas líneas celulares de cáncer cervicouterino. Esto puede suponer que los niveles de p53 logrados por quercetina en HFF no fueron suficientes para reflejarse en un arresto celular, o bien, que la vía p53 en HFF no es determinante como lo puede ser en HeLa y SiHa para inducir un arresto celular.

Es claro que la traslocación de p53 a núcleo es necesaria para activar la expresión de genes de respuesta a estrés para ejercer funciones, como el arresto del ciclo celular **[Middler G. et al., 1997; Reich N, y Levine A. 1984]**. Por lo tanto, el incremento nuclear de la señal de p53, junto con los niveles elevados del transcrito p21 y la proteína Bax, que observamos en HeLa y SiHa por el tratamiento con quercetina, son fuertes indicativos de la activación de p53. Estos dos genes, p21 y Bax, son dos blancos transcripcionales de p53, y su expresión es principalmente regulada a nivel de transcripción, misma que aumenta con la activación de p53, hasta alcanzar niveles de proteína suficientes para ejecutar funciones de arresto y apoptosis, para mantener una estabilidad genómica **[Miyashita T, and Reed J. 1995; Takahashi P. et al., 2011]**.

En efecto, el papel del factor transcripcional p53, en el arresto celular es mediado en gran medida por activación de la expresión de p21, el regulador negativo de los complejos Cdk-ciclinas que promueven progresión del ciclo celular **[Sullivan K. et al., 2018]**. Por lo tanto, el nivel del transcrito p21 inducido por quercetina en ambas líneas celulares de cáncer cervicouterino, HeLa y SiHa, sugieren un rol en el arresto celular en la fase G2, que observamos en estas mismas células. Este hallazgo

concuera con lo mostrado por Priyadarsini, en el que quercetina incrementó el transcrito p21 en células HeLa **[Priyadarsini R. et al., 2010]**.

Existen reportes que señalan que el arresto celular en la fase G2, puede acompañarse de la inducción de apoptosis **[Wang H. et al., 2016; Ouyang G. et al., 2009]**. p53 puede iniciar apoptosis a través de un mecanismo no transcripcional, que requiere su traslocación a mitocondria a tiempos tempranos, después del estímulo apoptótico. p53 mitocondrial activa la oligomerización de las proteínas proapoptóticas Bax o Bak por su asociación directa **[Chipuk J. et al., 2004; Leu J. et al., 2004]**, o asociándose a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL, para inhibirlas e impedir el secuestro de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak **[Mihara M. et al., 2003]**. Por otro lado, el incremento de la expresión de la proteína Bax inducida por quercetina, lo cual resultó en un aumento de la relación Bax/Bcl-2, es ampliamente reconocido ser un paso inicial de apoptosis mitocondrial, ya que aumentan los niveles de Bax libre, se promueve su homo-oligomerización sobre la membrana mitocondrial externa, lo que provoca la liberación de las proteínas proapoptóticas, como citocromo C, endonucleasa G **[Li L. et al., 2001]** y Smac/DIABLO **[Mass C. et al., 2010]**, y a través de ellas, la activación de caspasas, las enzimas ejecutoras de apoptosis. En efecto, nosotros observamos que quercetina promovió la activación de caspasas 3/7 en células HeLa y SiHa, lo que confirma junto con los rasgos celulares apoptóticos vistos en HeLa y SiHa, que este flavonoide fue capaz de inducir apoptosis en estas células de cáncer cervicouterino. Nosotros notamos que a tiempos posteriores (72 h postratamiento) del arresto celular en la fase G2 (48 h postratamiento), quercetina indujo rasgos apoptóticos en ambas líneas celulares de cáncer cervicouterino, HeLa y SiHa, pero no observamos este fenómeno en las células HFF después de la exposición a concentraciones iguales de quercetina (140 μ M). Mediante este ensayo de muerte celular por microscopía, lo que constata que quercetina tiene una selectividad citotóxica hacia las células de cáncer cervicouterino en comparación a las células HFF, lo cual es farmacológicamente deseado.

p53 es encontrado silvestre y funcional en todas las células empleadas en este trabajo, pero el modo de regulación de la estabilidad de la proteína p53, en células

HFF es distinto al de células HeLa y SiHa, ya que estas últimas expresan la proteína E6, la cual en complejo con la ligasa de ubiquitina E6AP reclutan a p53, para ser este último ubiquitinado por E6AP y posteriormente degradado por el proteasoma [Scheffner et al., 1990; Talis A. et al., 1998]. En cambio, en células HFF, la estabilidad de p53 está bajo control de la ligasa de ubiquitina celular Hdm2 [Hengstermann A. et al., 2001]. Sí el estímulo que provocó la estabilización de p53 en todas las células, hubiera sido el estrés oxidativo originado por quercetina, de quien se conoce que a concentraciones como las empleadas en este trabajo, es capaz de generar especies reactivas de oxígeno y ruptura del DNA [Wätjen et al., 2005; Awad H. et al., 2000], en células de cáncer cervicouterino sería adicionalmente requerido, la represión de la oncoproteína E6 para lograr la estabilización de p53. Sin embargo, cuando analizamos la expresión de la proteína E6, no observamos la disminución que esperábamos de la proteína E6. Estos resultados sugieren que, de existir un efecto inhibitorio de quercetina sobre la proteína E6, sería sobre a un nivel de la actividad de degradación de p53, más que a nivel de expresión de E6. Esta idea se soporta por el trabajo de Cherry y colaboradores (2013), en el que observaron que el flavonoide tipo flavona, luteolina, de estructura muy similar a quercetina (Figura 26), así como otros flavonoides sintetizados químicamente, se unieron a la proteína E6 e impidieron su asociación con un polipéptido de 70 aminoácidos de E6AP (E6AP-70aa) que incluye el motivo LxxLL necesario para la unión a E6, los cuales fueron probados para su capacidad de formación del complejo E6/E6AP-70aa. Además, estos mismos flavonoides fueron activos para impedir la asociación entre el complejo E6/E6AP, estabilizaron a p53 cuando este fue expuesto a E6 y E6AP en reticulocitos de conejo, pero este efecto no ocurrió en ausencia de flavonoides. Adicionalmente, el tratamiento con luteolina aumentó los niveles de la proteína p53 en sobre células de cáncer cervicouterino VPH positivas, pero también en otras células VPH negativas, [Cherry J. et al., 2013], muy parecido a que nosotros observamos en células HFF VPH negativas, donde quercetina incrementó p53, lo cual no es de sorprender, ya que quercetina y otros flavonoide han mostrado incrementar p53 en células VPH negativas.

Las observaciones de Cherry y colaboradores, al igual que las nuestras contrastan con otros estudios en los que flavonoides como luteolina, wogonina y EGCG, condujeron a la estabilización de p53 en células derivadas de cáncer cervicouterino VPH positivas, por la disminución del transcrito o de la proteína E6 [Ham S. et al., 2014; Kim M. et al., 2013; Qiao Y. et al., 2009].

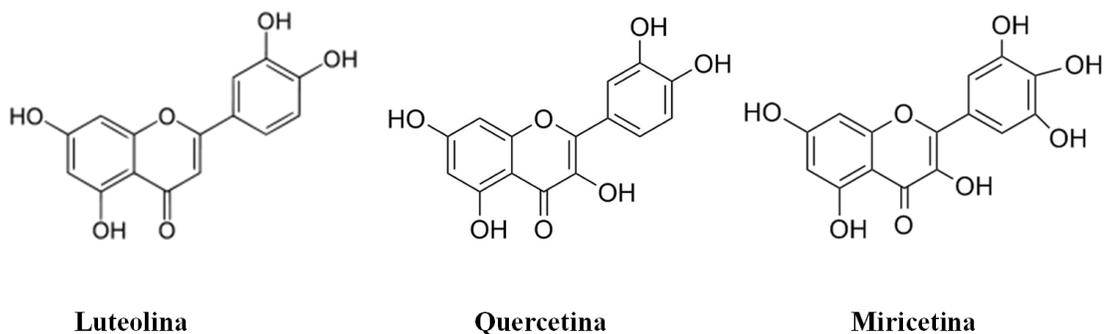


Figura 25. Ilustración comparativa de los flavonoides luteolina, quercetina y miricetina.

El flavonoide miricetina, el cual, al igual que quercetina pertenecen al grupo de los flavonoles, y quienes comparten alta similitud estructural (Figura 26), fue capaz de inhibir la unión *in vitro* de la proteína E6 con caspasa 8 y con E6AP. Además, miricetina a 200 μ M incrementó significativamente los niveles de p53 en células SiHa VPH 16, pero el incremento de p53 por miricetina en células C33A de cáncer cervicouterino VPH negativas, no fue significativo. Luego, la sensibilidad de células SiHa hacia doxorubicina y cisplatino incrementó con la exposición a miricetina. El hecho que los flavonoides incrementen la sensibilidad de células de cáncer cervicouterino hacia quimioterapéuticos como cisplatino, es relevante porque este tipo de cáncer tienden a ser relativamente resistentes a estos tratamientos quimioterapéuticos [Rein D. et al., 2001].

Debido a que no observamos cambios de expresión de la proteína E6 en células de cáncer cervicouterino, buscamos mediante un docking ciego, predecir la unión de quercetina con la proteína E6 VPH-16. Las predicciones de unión mostraron que quercetina se une a tres sitios de la proteína E6. Uno de los sitios, denominado por nosotros “sitio III”, localizado hacia el carboxilo terminal de la proteína E6, careció de relevancia porque las interacciones que quercetina predijo establecer con los

residuos de la proteína E6 no son relevantes para la degradación de p53, de acuerdo a lo que se dio a conocer por Martínez-Zapien D. y colaboradores (2016), quienes resolvieron la estructura de cristal del complejo E6/E6AP/p53, y dieron detalle sobre los residuos implicados en la formación del trímero de cada una de las proteínas que lo conforman **[Martínez-Zapien D. et al., 2016]**. Los otros dos sitios donde quercetina predijo unirse sobre la proteína E6, fueron de marcada relevancia en la formación del trímero y la degradación de p53. En el sitio I, quercetina contacta con los residuos Pro5, Gln6, Arg8 y Arg10 en E6, los cuales son encontrados mediar contactos cruciales para la asociación de E6 con p53 **[Martínez-Zapien D. et al., 2016]**. Mientras que el residuo Glu7 de E6 establece contacto directo con la Lys101 de p53, los residuos Pro5, Arg8 y Pro9 tienen un rol indirecto en la conformación de la región N-terminal de E6. En efecto, la relevancia de estos sitios en la unión y degradación de p53 fue demostrada por mutagénesis dirigida sobre los residuos Pro5, Glu7, Arg8 y Pro9, que al sustituir dichos residuos se impide el ensamblaje del complejo ternario E6/E6AP/p53, y conduce a la estabilización de p53 **[Mietz J. et al., 1992; Cooper B. et al., 2003]**. Por otro lado, la unión de quercetina sobre el sitio II de la proteína E6, el sitio correspondiente al bolsillo de unión a la ligasa E6AP, estableció contactos con el residuo Asp49 de E6 cuya sustitución a Ala49 interrumpe la asociación de la proteína E6 con E6AP, y por consecuencia, la formación del complejo ternario E6/E6AP/p53, y la degradación de p53 **[Zanier K. et al., 2013]**. En el mismo sitio II, quercetina contactó con el residuo Leu50. La sustitución de esta Leu50 por Ala50, disminuyó tanto la unión de la proteína E6 al péptido E6AP (E¹ L² T³ L⁴ Q⁵ E⁶ L⁷ L⁸ G⁹ E¹⁰ E¹¹ R¹²), como la degradación de p53 **[Zanier K. et al., 2013]**. También en el sitio II, quercetina contactó a la Arg102 quien resulta fundamental para mantener juntos a los dominios N-terminal y C-terminal de la proteína E6, y a su vez permitir la conformación para la unión con el péptido E6AP. La Arg131 con la que quercetina estableció contacto, provee contactos estructuralmente equivalentes a la Arg102, con el péptido E6AP **[Zanier K. et al., 2013]**. La sustitución de estas argininas conducen a una marcada disminución de la unión entre E6 y el péptido E6AP, así como a la estabilización de p53 **[Zanier K. et al., 2013]**. En resumen, la unión predictiva de quercetina a E6, supone la competición de unión de quercetina y E6AP por E6, lo que conduciría a la estabilización de la proteína p53.

Finalmente, este estudio contribuye a las bases de la acción de quercetina sobre el ciclo celular en células de cáncer cervicouterino, y propone que la activación de p53 por quercetina ocurre posiblemente por la inhibición de la actividad de la proteína E6. Dada la relevancia clínica de las actividades de p53, y la capacidad quercetina por promover estas actividades, subrayamos su importancia de su continuo estudio en este tipo de células cancerosas. Además, quercetina resulta una molécula importante por la selectividad tóxica mostrada hacia células HeLa y SiHa de cáncer cervicouterino con respecto a lo observado en células no tumorales HFF.

9. CONCLUSIONES

9.1. CONCLUSIÓN GENERAL.

Quercetina promueve arresto del ciclo celular en la fase G2 y apoptosis, acompañado de la activación de p53 en células de cáncer cervicouterino, posiblemente por la interrupción de la formación del complejo E6/E6AP.

9.2. CONCLUSIONES PARTICULARES.

1. Quercetina induce la activación de p53 en células HeLa y SiHa, independiente de la expresión de E6 VPH.
2. Quercetina predijo inhibir a E6 VPH por su unión en sitios cruciales para su actividad de degradación de p53.
3. Quercetina arresta el ciclo celular en la fase G2 por acompañados niveles elevados del transcrito p21, en células HeLa y SiHa.
4. Quercetina induce apoptosis en HeLa y SiHa, con niveles elevados del proapoptótico Bax, así como de la actividad de caspasas 3/7.
5. Las células de cáncer cervicouterino SiHa y HeLa son más sensibles a la toxicidad de quercetina con respecto a los cultivos primarios de fibroblastos (HFF), en un orden de 6 y 7 veces, respectivamente.

10. REFERENCIAS

- Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discovery Medicine* 9: 145-152. (2010).
- Ansari T, Brimer N, Vande Pol S. Peptide Interactions Stabilize and Restructure Human Papillomavirus Type 16 E6 To Interact with p53. *Journal of Virology*, 86 (20): 11386-11391. (2012).
- Awad H, Boersma M, Vervoort J, Rietjens I. Peroxidase-Catalyzed Formation of Quercetin Quinone Methide-Glutathione Adducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 378(2): 224-233. (2000).
- Batra P, Sharma A. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *Biotechnology*, 3:439–459. (2013).
- Blomberg I, Hoffmann I. Ectopic Expression of Cdc25A Accelerates the G1/S Transition and Leads to Premature Activation of Cyclin E- and Cyclin A-Dependent Kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 19(9): 6183–6194. (1999).
- Booher R., Holman P., Fattaey A. Human Myt1 Is a Cell Cycle-regulated Kinase That Inhibits Cdc2 but Not Cdk2 Activity. *JBC*. 272 (35): 2300-2306. (1997).
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown J, Sedivy J, Kinzler K, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to Sustain G2 Arrest After DNA Damage. *Science*, 282: 1497:1500. (1998).
- Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol* 61:1205–1215. (2001).
- Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Kroemer G. Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell Death and Differentiation*, 9: 1287-1293. (2002).
- Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient Cells. *Oncogene*, 16: 311-320. (1998).
- Chang D, Naihan Xu N, Luo K. Degradation of Cyclin B Is Required for the Onset of Anaphase in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (39): 37865–37873. (2003).

Cheng Q, Chen L, Li Z, Lane W, Chen J. ATM activates p53 by regulating MDM2 oligomerization and E3 processivity. *The EMBO Journal*, 28: 3857–3867. (2009).

Cherry J, Rietz A, Malinkevich A, Liu Y, Xie M, Bartolowits M, Davisson V, Baleja J, Androphy E. Structure Based Identification and Characterization of Flavonoids That Disrupt Human Papillomavirus-16 E6 Function. *PLoS ONE*, 8(12): e84506. (2013).

Chiang C, Dong G, Broker T, Chow L. Control of Human Papillomavirus Type 11 Origin of Replication by the E2 Family of Transcription Regulatory Proteins. *Journal of Virology*, 66(9): 5224-5231. (1992).

Chipuk J, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin N, Newmeyer D, Schuler M, Green D. Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Science*, 303: 1010-1014. (2004).

Chobot V. Simultaneous Detection of Pro- and Antioxidative Effects in the Variants of the Deoxyribose Degradation Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2088–2094. (2010).

Clair SS, Giono L, Varmeh-Ziaie S, Resnick-Silverman L, Liu W, Padi A, Dastidar J, DaCosta A, Mattia M, Manfredi J. DNA Damage-Induced Downregulation of Cdc25C Is Mediated by p53 via Two Independent Mechanisms: One Involves Direct Binding to the *cdc25C* Promoter. *Molecular Cell*, Vol. 16, 725–736: (2004).

Conway M, Meyers C. Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. *Journal of Dental Research*, 88(4): 307-317. (2009).

Cooper B, Schneider S, Bohl J, Jiang Y, Beudet A, Vande Pol S. Requirement of E6AP and the features of human papillomavirus E6 necessary to support degradation of p53. *Virology* 306: 87–99. (2003).

Dal-Ho H, Hirofumi T, Yamada K. Inhibition of environmental estrogen-induced proliferation of human breast carcinoma mcf-7 cells by favonoids. *In vitro cellular and developmental biology*, 37(5):275–82. (2001).

D’Andrea G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?. *Fitoterapia*, 106: 256–271. 82015).

David AVA, Arulmoli R, & Parasuraman S. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacognosy Review*, 10(20): 84–89. (2016).

Desaintes C, Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *The EMBO Journal*, 16 (3): 504–514. (1997).

Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, Zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Nat. Acad.* 80(12): 3812–3815. (1983).

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243:934–937. (1989).

Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicology and Pathology*, 35(4): 495–516. (2007).

Erster S, Mihara M, Kim R, Petrenko O, Moll U. In Vivo Mitochondrial p53 Translocation Triggers a Rapid First Wave of Cell Death in Response to DNA Damage That Can Precede p53 Target Gene Activation. *Journal of Biological Chemistry*. 24 (15): 6728-6741. (2004).

Garzetti G, Ciavattini A, Provinciali M, Di Stefano G, Lucarini G, Goteri G, Biagini G. Expression of p53 and apoptosis of tumor cells in locally advanced cervical carcinoma after cisplatin based neoadjuvant chemotherapy. *Anticancer Research*, 16(5B):3229–3234. (1996).

Gavet O, Pines J. Activation of cyclin B1–Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *Journal cell Biology*, 189 (2): 247-259. (2010).

Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *Journal of Virology*, 75: 1565–1570. (2001).

GLOBOCAN. CANCER FACT SHEETS: CERVICAL CANCER. 2012.

Gonzales G, Smaghe G, Grootaert C, Zotti M, Raes K, Camp J. Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: a sequential structure–activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity. *Drug Metabolism Review*, 47(2):175-190. (2015).

Gruca A, Krawczyk Z, Szeja W, Gryniewicz G, Rusin A. Synthetic Genistein Glycosides Inhibiting EGFR Phosphorylation Enhance the Effect of Radiation in HCT 116 Colon Cancer Cells. *Molecules*, 19(11), 18558-18573. (2014).

Guo Z, Deshpande R, Paull T. ATM activation in the presence of oxidative stress. *Cell Cycle*, 9(24): 4805–4811. (2010).

Ham S, Kim H, Kwon T, Bak Y, Lee D, Song Y, Park S, Park Y, Kim M, Kang J, Hong J, Yoon D. Luteolin induces intrinsic apoptosis via inhibition of E6/E7

oncogenes and activation of extrinsic and intrinsic signaling pathways in HPV-18-associated cells. *Oncology Reports*, 31: 2683-2691. (2014).

Hengstermann A, Linares L, Ciechanover A, Whitaker N, Scheffner M. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *PNAS*, 98(3): 1218–1223. (2001).

Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler K, Vogelstein B. *14-3-3 σ* Is a p53-Regulated Inhibitor of G2/M Progression. *Molecular Cell*, 1: 3–11. (1997).

Hinds P, Mitnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed S, Weinberg R. Regulation of Retinoblastoma Protein Functions by Ectopic Expression of Human Cyclins. *Cell*, 70: 993-1006. (1992).

Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, 15:1573–1581. (1997).

Hollman P, Buijsman M, van Gameren Y, Cnossen P, de Vries J, Katan M. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research*, 31: 569–573. (1999).

Hu Q, Hu L, Jin X, Tian R, Wang G. Meta-analysis of cisplatin-based chemotherapy combination with radiotherapy versus radiotherapy alone in the treatment of locally advanced cervical carcinoma. *International Journal of Clinical Experimental Medicine*, 9(1): 441-447. (2016).

Huang Y, Hwang J, Lee P, Ke F, Huang J, Huang C, Kandaswani C, Middleton Jr. E, Lee M. Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *British Journal of Pharmacology*, 128: 999-1010. (1999).

Huibregtse J, Scheffner M, Howley P. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *The EMBO Journal*, 10(13): 419-4135. (1991).

Jaisamrarn U, Castellsagué X, Garland S, Naud P, Palmroth J, Del Rosario-Raymundo M, Wheeler C, Salmerón J, Chow S, Apter D, Teixeira J, Skinner S, Hedrick J, Szarewski A, Romanowski B, Aoki F, Schwarz T, Poppe W, Bosch F, de Carvalho N, Gernar M, Peters K, Paavonen J, Bozonnat M, Descamps D, Struyf F,

Dubin G, Rosillon D, Baril L, HPV PATRICIA Study Group. Natural History of Progression of HPV Infection to Cervical Lesion or Clearance: Analysis of the Control Arm of the Large, Randomised PATRICIA Study. *PLOS ONE*, 8 (11): e79260. (2013).

Janicek M, Averette H. Cervical Cancer: Prevention, Diagnosis, and Therapeutics. *CA Cancer Journal of Clinicians*, 51: 92-114. (2001).

Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M. Papillomavirus DNA replication — From initiation to genomic instability. *Virology* 384: 360–368. (2009).

Kastan M, Zhan Q, El-Deiry W, Carrier F, Jacks T, Walsh W, Plunkett B, Vogelstein B, Fornace A, Jr. A Mammalian Cell Cycle Checkpoint Pathway Utilizing p53 and GADD45 Is Defective in Ataxia-Telangiectasia. *Cell*, 71: 587-597. (1992).

Kato J, Matsushime H, Hiebert S, Ewen M, Sherr C. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase, CDK4. *Genes Development*, 7: 331-342. (1993).

Katsuno Y, Suzuki A, Sugimura K, Okumura K, Zineldeen D, Shimada M, Niida H, Mizunoc T, Hanaoka F, Nakanishi M. Cyclin A–Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *PNAS*, 106(9): 3184-3189. (2009).

Kearns S, Lurz R, Orlova E, Okorokov A. Two p53 tetramers bind one consensus DNA response Element. *Nucleic Acids Research*, 44 (13): 6185–6199. (2016).

Kelly E, Anthony R, Dennis J. “Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships,” *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10): 572–584, (2002).

Kim G, Jang H. Protective Mechanism of Quercetin and Rutin Using Glutathione Metabolism on H₂O₂-induced Oxidative Stress in HepG2 Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171: 530–537. (2009).

Kim M, Bak Y, Park Y, Lee D, Kim J, Kang J, Song H, Oh S, Yoon D. Wogonin induces apoptosis by suppressing E6 and E7 expressions and activating intrinsic signaling pathways in HPV-16 cervical cancer cells. *Cell Biology Toxicology* 29:259–272. (2013).

Kousholt A, Menzel T, Sørensen C. Pathways for Genome Integrity in G2 Phase of the Cell Cycle. *Biomolecules*, 2(4): 579–607. (2012).

Krause K, Wasner M, Reinhard W, Haugwitz U, Dohna C, Mössner J, Engeland K. The tumor suppressor protein p53 can repress transcription of cyclin B. *Nucleic Acids Research*, 28(2): 4410-4418. (2000).

Kumar S, Pandey A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The scientific World Journal*, 2013 ID 162750. (2013).

Laster S, Wood J, Gooding L. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis, *Journal Immunology*, 141: 2629–2634. (1998).

Lee J, Kim G. Evaluation of Antioxidant and Inhibitory Activities for Different Subclasses Flavonoids on Enzymes for Rheumatoid Arthritis. *Journal of Food Science*, 75(7): 212-217. (2010).

Lee L, Garland S. Human papillomavirus vaccination: the population impact. *F1000 Research* 2017, 6:866. (2017).

Leman A, Noguchi E. The Replication Fork: Understanding the Eukaryotic Replication Machinery and the Challenges to Genome Duplication. *Genes*, 4: 1-32. (2013).

Leopoldini M, Russo N, Chiodo S, Toscano M. Iron Chelation by the Powerful Antioxidant Flavonoid Quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 6343-6351. (2006).

Leu J, Dumont P, Hafey M, Murphy M, George D. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak–Mcl1 complex. *Nature Cell Biology*, 6(5): 443-450. (2004).

Li L, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412: 95-99. (2001).

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4):479–489. (1997).

Li Y, Xiao S, Dan L, Xue M. P16^{INK4A} is required for cisplatin resistance in cervical carcinoma SiHa cells. *Oncology Letters* 9: 1104-1108. (2015).

Loughery J, Cox M, Smith L, Meek D. Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic Acids Research*, 42(12): 7666-7680. (2014).

Mandic R, Schamberger C, Müller J, Geyer M, Zhu L, Carey T, Grénman R, Dünne A, Werner J. Reduced Cisplatin Sensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines Correlates with Mutations Affecting the COOH-Terminal Nuclear Localization Signal of p53. *Clinical Cancer Research*, 11(19): 6845-6852. (2005).

Martinez-Zapien D, Xavier Ruiz F, Poirson J, Mitschler A, Ramirez J, Forster A, Cousido-Siah A, Masson M, Vande Pol S, Podjarny A, Travé G, Zanier K. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature*, 529: 541–545. (2016).

Mass C, Verbrugge I, de Vries E, Savich G, van de Kooij L, Tait L, Borst J. Smac/DIABLO release from mitochondria and XIAP inhibition are essential to limit clonogenicity of Type I tumor cells after TRAIL receptor stimulation. *Cell Death and Differentiation*, 17: 1613–1623. (2010).

Mesaeli N, Phillipson C. Impaired p53 Expression, Function, and Nuclear Localization in Calreticulin-deficient Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 15:1862-1870. (2004).

Metodiewa D, Jaiswal A, Cenas N, Dickançaité E, Segura-Aguilar J. Quercetin May Act As A Cytotoxic Prooxidant After Its Metabolic Activation To Semiquinone And Quinoidal Product. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 107–116. (1999).

McBride A. Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes. *Advances in Virus Research*, 72: 155-205. (2008).

McBride A, Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathog* 13(4): e1006211. (2017).

Middeler G, Zerf K, Jenovai S, Thulig A, Tschodrich-Rotter M, Kubitscheck U, Peters R. The tumor suppressor p53 is subject to both nuclear import and export, and both are fast, energy-dependent and lectin-inhibited. *Oncogene* 14(12): 1407–1417. (1997).

Mietz J, Unger T, Huibregtse J, Howley P. The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *The EMBO Journal*, 11(13): 5013-5020. (1992).

Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll U. p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria. *Molecular Cell*, 11: 577–590. (2003).

Mira L, Fernandez M, Santos M, Rocha R, Florêncio M, Jennings K. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical research*, 36(11):1199-208. (2002).

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang H, Lin H, Liebermann D, Hoffman B, Redd J. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 9(6):1799-805. (1994).

Miyashita T, Reed J. Tumor Suppressor p53 Is a Direct Transcriptional Activator of the Human bax Gene. *Cell*, 80: 293-299. (1995).

Mohar-Betancourt A, Reynoso-Noverón N, Armas-Texta D, Gutiérrez-Delgado C, Torres-Domínguez J. Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *American Society of Clinical Oncology*, 3(6): 740-748. (2017).

Nakano K, Vousden K. *PUMA*, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular Cell*, 7: 683-694. (2001).

Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E: Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicology Letter*, 102 (103):139–142. (1998).

Nguyen L, LeeY, Sharma A, Park J, Jagga S, Sharma G, Lee S, Nam J. uercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity. *Korean Journal of Physiology Pharmacology*, 21(2):205-213. (2017).

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science*, 288: 1053-1058. (2000).

Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevette D, Kuan CY, Rakic P. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *Journal of Neuroscience*, 21(13): 4752–4760. (2001).

Ouyang G, Yao L, Ruan K, Song G, Mao Y, Bao S. Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of human ovarian cancer cells via activation of DNA damage checkpoint pathways. *Cell Biology International*, 33(12):1237-1242. (2009).

Panche A, Diwan A, Chandra S. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, E47): 1-15. (2016).

Parker L., Walter S., Young P., Piwnia-Worms H. Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Weel by the *nim1/cdr1* kinase. *Nature*. 363: 736-738. (1993).

Peng CY, Graves P, Thoma R, Wu Z, Shaw A, Piwnica-Worms H. Mitotic and G₂ Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. *Science*, 227 (5331): 1501-1505. (1997).

Petignat P, Roy M. Diagnosis and management of cervical cancer. *British Medical Journal*, 335(7623): 765–768. (2007).

Priyadarsini R., Murugan R., Maitreyi S., Ramalingam K., Karunagaran D., Nagini S. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-κB inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 649: 84–91. (2010).

Qiao Y, Cao J, Xie L, Shi X. Cell Growth Inhibition and Gene Expression Regulation by (-)-Epigallocatechin-3-Gallate in Human Cervical Cancer Cells. *Archives of Pharmacal Research*, 32(9): 13009-1315. (2009).

Reich N, and Levine A. Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 308: 199–201. (1984).

Rein DT, Kurbacher CM. The role of chemotherapy in invasive cancer of the cervix uteri: current standards and future prospects. *Anticancer Drugs*, 12: 787–795. (2001).

Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young R, Dynlacht B. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G2/M checkpoints. *GENES & DEVELOPMENT* 16:245–256. (2002).

Richards R, Lowy D, Schiller J, Day P. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U. S. A*, 103:1522–1527. (2006).

Rohaly G, Chemnitz J, Dehde S, Nunez A, Heukesjoven J, Deppert W, Dornreiter I. A Novel Human p53 Isoform Is an Essential Element of the ATR-Intra-S Phase Checkpoint. *Cell*, 122: 21–32. (2005).

Rose P, Bundy B, Watkins E, Thigpen T, Deppe G, Maiman M, Clarke-Pearson D, Insalaco S. Concurrent Cisplatin-Based Radiotherapy And Chemotherapy For Locally Advanced Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 340: 1144-1153. (1999).

Roy A, Baliga M, Katiyar S. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor–negative human breast carcinoma cells via modulation in protein expression of p53 and Bax and caspase-3 activation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(1):81–90. (2005).

Sax J, Fei P, Murphy M, Bernhard E, Korsmeyer S, El-Deiry W. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nature Cell Biology*, 4(11): 842-849. (2002).

Scheffer K, Berditchevski F, Florin L. The Tetraspanin CD151 in Papillomavirus Infection. *Viruses*, 6(2), 893-908. (2014).

Scheffner M, Werness B, Huibregtse J, Levine A, Howley P. The E6 Oncoprotein Encoded by Human Papillomavirus Types 16 and 18 Promotes the Degradation of p53. *Cell*, 63: 1129-1136. (1990).

Schelhaas M, Shah B, Holzer M, Blattmann P, Kühling L, Day P, Schiller J, Helenius A. Entry of Human Papillomavirus Type 16 by Actin-Dependent, Clathrin- and Lipid Raft-Independent Endocytosis. *PLoS Pathogens*, 8(4): e1002657. (2012).

Schiller J, Day P, Kines R. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic Oncology*, 118: S12–S17. (2010).

Schmidt F, Knobbe C, Frank B, Wolburg H, Weller M. The topoisomerase II inhibitor, genistein, induces G2/M arrest and apoptosis in human malignant glioma cell lines. *Oncology Reports* 19: 1061-1066. (2008).

Schlecht N, Platt R, Duarte-Franco E, Costa M, Sobrinho J, Prado J, Ferenczy A, Rohan T, Villa L, Franco E. Human Papillomavirus Infection and Time to Progression and Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*, 95 (17): 1336-1343. (2003).

Senba M, Mori N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncology Reviews*, 6: e17. (2012).

Senturk E, Manfredi J. p53 and Cell Cycle Effects After DNA Damage. *Methods Molecular Biology*, 962: 49–61. (2013).

Seyfried T, Huysentruyt L. On the Origin of Cancer Metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 18(1-2): 43–73. (2013).

Shulzhenko N, Lyng H, Sanson G, Morgun A. Ménage a trois: an evolutionary interplay between human papillomavirus, a tumor, and a woman. *Trends in Microbiology*, 22 (6): 345-353. (2014).

Skinner S, Wheeler C, Romanowski B, Castellsagué X, Lazcano-Ponce E, Del Rosario-Raymundo M, Vallejos C, Minkina G, Da Silva D, McNeil S, Prilepskaya V, Gogotadze I, Money D, Garland S, Romanenko V, Harper D, Levin M, Chatterjee A, Geeraerts B, Struyf F, Dubin G, Bozonnet M, Rosillon D, Baril L, for the VIVIANE study group. Progression of HPV infection to detectable cervical lesions or clearance in adult women: Analysis of the control arm of the VIVIANE study. *International Journal of Cancer*, 138: 2428–2438. (2016).

So K, Kim M, Lee K, Lee I, Kim M, Lee Y, Hwang C, Jeong M, Kee M, Kang C, Cho C, Kim S, Hong S, Kim K, Lee W, Park J, Kim T. The Impact of High-Risk HPV Genotypes Other Than HPV 16/18 on the Natural Course of Abnormal Cervical Cytology: A Korean HPV Cohort Study. *Cancer Research Treatment*, 48(4): 1313-1320. (2016).

Spoden G, Kühling L, Cordes N, Frenzel B, Sapp M, Boller C, Florin L, Schelhaas M. Human Papillomavirus Types 16, 18, and 31 Share Similar Endocytic Requirements for Entry. *Journal of Virology*, 87 (13): 7765-7773. (2013).

Sullivan K, Galbraith M, Andrysyk Z, Espinosa J. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death and Differentiation*, 25: 133–143. (2018).

Takahashi P, Polson A, Reisman D. Elevated transcription of the p53 gene in early S-phase leads to a rapid DNA-damage response during S-phase of the cell cycle. *Apoptosis*, 16:950–958. (2011).

Talis A, Huibregtse J, Howley P. The Role of E6AP in the Regulation of p53 Protein Levels in Human Papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(11): 6430-6445. (1998).

Taylor W, Agarwal M, Agarwal A, Stacey D, Stark G. p53 inhibits entry into mitosis when DNA synthesis is blocked. *Oncogene*, 18: 283-295. (1999).

Tu B, Liu Z, Chen Z, Ouyang Y, Hu Y. Understanding the structure–activity relationship between quercetin and naringenin: in vitro. *Royal Society of Chemistry*, 5, 106171–106181. (2015).

Villiers E, Gissmann L, Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *Journal of Virology*, 40: 932–935. (1981).

Vink M, Bogaards J, van Kemenade F, de Melker H, Meijer C, Berkhof J. Clinical Progression of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia: Estimating the Time to Preclinical Cervical Cancer From Doubly Censored National Registry Data. *American Journal Epidemiology*, 178(7): 1161–1169. (2013).

Vue B, Zhang S, Chen QH. Flavonoids with therapeutic potential in prostate cancer. *Anticancer Agents Medicinal Chemistry*, 16(10): 1205–29. (2016).

Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of pathology*, 189(1):12-9. (1999).

Wang H, Zhang T, Sun W, Wang Z, Zuo D, Zhou Z, Li S, Xu J, Yin F, Hua Y, Cai Z. Eriarin induces G2/M-phase arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cell Death and Disease*, 7: e2247. (2016).

Wang X, Zhan Q, Coursen J, Khan M, Kontny H, Yu L, Hollander M, O’connor P, Fornace A, Jr., Harris C. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 3706–3711. (1999).

Wätjen W, Michels G, Steffan B, Niering P, Chovolou Y, Kampkötter A, Tran-Thi Q, Proksch P, Kahl R. Low Concentrations of Flavonoids Are Protective in Rat H4IIE Cells Whereas High Concentrations Cause DNA Damage and Apoptosis. *The Journal of Nutrition*, 135(3): 525-531. (2005).

Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary favone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Research*, 60(14):3823–31. (2000).

Werness B, Levin A, Howley P. Association of Human Papillomavirus Types 16 and 18 E6 Proteins with p53. *Science*. 248(4951): 76-79. (1990).

WHO cancer, 2018. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Revisado 30 junio 2018.

Williams R, Spencer J, RiceEvans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology Medicine* 36, 838–849. (2004).

Xiao J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9):1874-1905. (2017).

Yang B, Chen F, Hua Y, Huang S, Lin S, Wen L, Jiang Y. Prooxidant activities of quercetin, p-coumaric acid and their derivatives analysed by quantitative structure–activity relationship. *Food Chemistry*, 131: 508–512. (2012).

Yuan S, Akey C. Apoptosome structure, assembly and procaspase activation. *Structure*, 21(4): 501-515. (2013).

Yuan C, Filippova M, Krstenansky J, Duerksen-Hughes P. Flavonol and imidazole derivatives block HPV16 E6 activities and reactivate apoptotic pathways in HPV+ cells. *Cell Death and Disease*, 7, 2060. (2016).

Yun J, Chae H, Choy H, Chung J, Yoo H, Han M, Shin D. p53 Negatively Regulates *cdc2* Transcription via the CCAAT-binding NF-Y Transcription Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 274(42): 29677-29682. (1999).

Zanier K, Charbonnier S, Ould Sidi A, McEwen A, Ferrario M, Poussin-Courmontagne P, Cura V, Brimer N, Ould Babah K, Ansari T, Muller I, Stote R, Cavarelli J, Vande Pol S, Travé G. Structural Basis for Hijacking of Cellular LxxLL Motifs by Papillomavirus E6 Oncoproteins. *Science*, 339: 694-698. (2013).

Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol*, 40: 481–495. (2003).

Zhang H, Gavin M, Dahiya A, Postigo H, Ma D, Luo R, Harbour J, Dean D. Exit from G1 and S Phase of the Cell Cycle Is Regulated by Repressor Complexes Containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell*, 101: 79-89. (2000).

Zhang H, Hu J, Fu R, Liu X, Zhang Y, Li J, Liu L, Li Y, Deng Q, Luo Q, Ouyang Q, Gao N. Flavonoids inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy through downregulation of PI3K γ mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K/ULK signaling pathway in human breast cancer cells. *Scientific Reports*, 8: 11255. (2018).

Zhang R, Shen C, Zhao L, Wang J, McCrae M, Chen X, Lu F. Dysregulation of host cellular genes targeted by human papillomavirus (HPV) integration contributes to HPV-related cervical carcinogenesis. *International journal of cancer*, 138: 1163–1174. (2016).

Zi X, Grasso A, Kung H, Agarwal R. A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. *Cancer Research*, 58:1920–1929. (1998).