

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN**  
**COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO**

**Caracterización de la cascada de señalización que utiliza la oncoproteína E5 de HPV16, el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y Ras durante el proceso de transformación celular.**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN MEDICINA MOLECULAR**

**QUE PRESENTA**

**Dra. En Medicina Lisandra Gómez Mata**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl**

**Cuernavaca, Morelos, México enero del 2026**

## Comité Asesor

1. Tutor Principal: Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl CISEI-INSP
2. Tutor Personal: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz Fac. Medicina, UAEM
3. Vocal 1. Dr. Adolfo Pedroza Saavedra CISEI-INSP
4. Vocal 2. Dr. Luis Cañedo Dorantes Fac. Medicina, UAEM
5. Vocal 3. Dr. Juan José Acevedo Fernández Fac. Medicina, UAEM

## Comité Revisor

Presidente: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz  
Secretario: Dra. Delia Vanessa López Guerrero  
1er. Vocal: Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez  
2do. Vocal: Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl

## **Dedicatoria**

A quien deja atrás sus raíces con el corazón lleno de sueños y el miedo auestas, aprenden a llamar hogar a lo desconocido y hacen del conocimiento su mayor fortaleza.

## Agradecimientos

La culminación de esta tesis representa no solo un logro académico, sino también un recorrido personal marcado por retos, aprendizajes y profundas transformaciones. Llegar a México tras salir de Cuba implicó comenzar de nuevo, adaptarme a un contexto distinto y enfrentar momentos de incertidumbre que hoy forman parte esencial de mi crecimiento personal y profesional.

Quiero expresar un agradecimiento muy especial a **Melisa Gil Delgado**, quien desde el inicio de este camino fue mucho más que una amiga. Su compañía constante, apoyo incondicional y fortaleza hicieron que este proceso fuera más llevadero. En los momentos de duda e incertidumbre, fue mi mejor aliada, y hoy puedo decir con orgullo que es una verdadera hermana del alma.

A mi **esposo**, le agradezco profundamente por escucharme cada día, por su paciencia, comprensión y apoyo permanente. Su acompañamiento emocional fue fundamental para mantener la constancia y no rendirme en los momentos más difíciles.

A mi **mamá**, mi mayor inspiración, gracias por estar siempre presente a pesar de la distancia. Su amor, fortaleza y ejemplo han sido el motor que ha guiado mi camino. Es la mujer que me enseñó que el conocimiento es lo único que realmente nos pertenece, y ese aprendizaje ha marcado de manera definitiva mi vida personal y profesional.

Expreso mi sincero agradecimiento a mi tutora, la **Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl**, por su guía, dedicación y valiosos aportes académicos durante el desarrollo de esta investigación. Asimismo, agradezco al **grupo de trabajo del Laboratorio 5 del CISEI del Instituto Nacional de Salud Pública de México**, por el acompañamiento, el aprendizaje compartido y el apoyo brindado a lo largo de este proceso.

Extiendo también mi agradecimiento al **Comité Asesor**, por sus observaciones y recomendaciones, así como a todas las personas que, de manera directa o indirecta, colaboraron y contribuyeron a la realización de este proyecto de investigación.

A todos, gracias por formar parte de este logro

## Índice

Resumen.....	8
1. Antecedentes.....	9
1.1 Epidemiología del HPV asociado al cáncer cérvico uterino .....	9
1.2. Histología del epitelio cervical .....	9
1.3. Estructura del HPV .....	10
1.4. Estructura y Función de E5 .....	12
<b>Figura 1. Organización genómica típica de los genomas del HPV Alfa, Mu y Beta de alto riesgo.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 2: Actividad de las vioporinas:.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 3. Modelo de un canal iónico hexamérico generado por la proteína E5 del HPV16 in vitro. ....</b>	<b>14</b>
1.6. Vías de señalización del Receptor del Factor de crecimiento epidérmico (EGFR) .....	16
<b>Figura 4. Vía de señalización del EGFR.....</b>	<b>18</b>
1.7. RAS y la vía MAP-K.....	18
1.8. Factor de crecimiento epidérmico y E5.....	19
1.9. MYC y su actividad en presencia de HPV .....	20
<b>Figura 5: Sustratos de calpaína en supervivencia celular y apoptosis. ....</b>	<b>21</b>
2. Justificación .....	23
3. Pregunta de investigación: .....	23
4. Objetivo General:.....	23
Objetivos Específicos.....	23
5.Hipótesis Alternativa:.....	24
6. Metodología. ....	25
6.1. Líneas celulares .....	25
<b>Tabla 1.    Líneas celulares que expresan las oncoproteínas HPV16 E5 y Ha-Ras.    25</b>	
6.2. Condiciones de cultivo celular. ....	26
6.3. Curva de Proliferación .....	26
6.4. Agar Suave .....	26
6.5. Cuantificación de proteínas. ....	27
6.6. Electroforesis de proteínas de lisados celulares.....	28
6.7. Western blot: .....	28
<b>Tabla 2. Panel de anticuerpos utilizados para la caracterización molecular. .29</b>	
6.8. Análisis Estadístico .....	29
7. Resultados.....	30

7.1. Grado de transformación celular de las líneas que expresan la oncoproteína E5 de HPV16.....	30
7.1.1 Caracterización morfológica de las líneas celulares que expresan E5 de HPV16.....	30
<b>Figura 6. Microfotografías de las líneas celulares que expresan E5 de HPV16.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 7: Microfotografía de la línea WTE53(E5+Ras). .....</b>	<b>31</b>
7.1.2 Cinética de proliferación de líneas celulares que expresan Ras y/o E5 de HPV16.....	31
<b>Figura 8: Tiempo de Doblaje (TD) de las líneas que expresan E5 y control. ....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 9: Densidad de Saturación (DS) de las líneas que expresan E5 y control.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 10. Curvas de proliferación de las líneas celulares que expresan E5 y control. ....</b>	<b>34</b>
7.1.3 Determinación de grado de transformación por medio de crecimiento independiente de anclaje. ....	34
<b>Figura 11: Microfotografías de la formación de colonias en agar de las líneas celulares que expresan E5 de HPV16.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 12: Número de colonias en agar suave en líneas que expresan E5 y control.....</b>	<b>36</b>
7.2. Modulación del proceso de proliferación celular por E5 de HPV16 .....	36
7.2.1 Regulación de la proliferación celular por E5 de HPV16 en la cascada MAP-K... 36	
<b>Figura13. Comparación de la expresión de la proteína p-EGFR/EGFR.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 14. Niveles de expresión de la proteína GRB2 en líneas celulares que expresan E5 y RAS. ....</b>	<b>38</b>
<b>Figura15. Detección de la proteína RAS en líneas celulares que expresan E5.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura16. Expresión de la proteína RAF en líneas celulares que expresan E5.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura17. Comparación de la expresión de la proteína p-MEK/MEK.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura18. Comparación de la expresión de la proteína p-ERK/ERK. ....</b>	<b>42</b>
<b>Figura19. Comparación de la expresión del factor transcripcional c-MYC.....</b>	<b>43</b>
7.2.2 Influencia de E5 de HPV16 en la cascada PI3K/AKT y en otras proteínas que intervienen en el ciclo celular (p21, p27 y CALPAINA-2) .....	43
<b>Figura20. Comparación de la expresión de la proteína PI3K. ....</b>	<b>44</b>
<b>Figura21. Comparación de la expresión de la proteína p-AKT/AKT.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura22. Comparación de la expresión de la proteína FOXO3A.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura23. Comparación de la expresión de la proteína p21.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 24. Comparación de la expresión de la proteína p-p27.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura25. Comparación de la expresión de la proteína CALPAINA-2.....</b>	<b>48</b>
8. Discusión .....	49
8.1 Grado de transformación celular de las líneas que expresan la oncoproteína E5 de HPV16.....	49
8.2 Modulación del proceso de proliferación celular por E5 de HPV16. ....	50

8.2.1 Regulación de la cascada de MAPKs por E5 de HPV16. ....	50
8.2.2 Influencia de E5 de HPV16 en la cascada PI3K/AKT y en proteínas inhibitorias del ciclo celular (p21 y p27).....	52
8.2.3 Influencia de E5 de HPV16 en el comportamiento de la CALPAINA-2 .....	54
9. Conclusiones .....	55
9.1 E5 de HPV16 como modulador negativo de la proliferación celular .....	55
9.2 Modulación del receptor EGFR y su impacto en la cascada MAPK.....	55
9.3 E5 de HPV16 en la cascada PI3K/AKT .....	55
9.4 E5 de HPV16 y el comportamiento de la CALPAINA-2.....	55
10. Limitaciones y Perspectivas del Estudio .....	57
11. Bibliografía .....	58

## Resumen

La proteína E5 de Papiloma Virus Humano (HPV) tipo 16 es una molécula hidrofóbica con potencial oncogénico, pero de la cual aún se desconoce el mecanismo molecular a través del cual modula el entorno celular para llevar a cabo el proceso de transformación. La transformación celular mediada por E5 depende parcialmente del estímulo mitogénico generado por el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR). E5 utiliza el camino de señalización del EGFR para transducir señales al núcleo y la proteína Ras es una pieza importante en este camino. Nuestro estudio arrojó como resultados que la proteína E5 de HPV16 reduce la capacidad de transformación celular mediante un complejo entramado de interacciones moleculares. Estas interacciones afectan vías de señalización clave, como MAPK y PI3K-AKT, así como reguladores del ciclo celular (p21 y p27) y la cisteína proteasa dependiente del calcio Calpaína-2, contribuyendo a evitar la muerte celular. E5 no debe entenderse como un oncogén transformante clásico, sino como un modulador contextual de la señalización oncogénica dependiente de EGFR capaz de potenciar o amortiguar el fenotipo transformado según el estado basal de la célula.

## 1. Antecedentes

### 1.1 Epidemiología del HPV asociado al cáncer cérvico uterino

El cáncer cérvico uterino (CaCU) ocupa el cuarto lugar en incidencia y mortalidad a nivel mundial, con 662,301 mujeres diagnosticadas y 348,874 muertes atribuidas a esta patología en el 2022. En regiones con un Índice de Desarrollo Humano (IDH) bajo como el continente africano ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad. En México ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad, con 10,348 casos y 4,909 muertes en el 2022 del total de la población femenina reportado por el Observatorio Mundial del Cáncer <sup>(1)</sup>.

El virus del papiloma humano (HPV) se ha demostrado estar estrechamente asociado con el desarrollo del CaCU en un 99.7%, también se describen otros cofactores importantes con el desarrollo de la enfermedad como son la inmunosupresión, el tabaquismo, la multiparidad y el uso de anticonceptivos orales, entre otros <sup>(2)</sup>. En México a pesar de que existe un Programa de Detección Oportuna existe una tendencia ascendente del CaCU en mujeres menores de 40 años, lo cual puede deberse a variaciones en los aspectos organizativos de las políticas de detección temprana de la enfermedad <sup>(3)</sup>.

### 1.2. Histología del epitelio cervical

El cuello uterino tiene forma cilíndrica se conecta a la vagina a través del canal endocervical el cual está revestido por epitelio escamoso estratificado en el exocérvix y epitelio columnar en el endocérvix, la zona de transición se denomina unión escamocolumnar. El HPV parece invadir el epitelio a través de microtraumatismos, luego infecta células indiferenciadas que se dividen activamente en la capa basal en la unión escamosocolumnar, ya que estas son las únicas células replicativas <sup>(4)</sup>. Las lesiones premalignas ocurren en esta zona y están estrechamente relacionadas con el HPV de alto riesgo. Las neoplasias intraepitelial cervical (NIC) o displasia de las células escamosas en el epitelio cervical son cambios premalignos que pueden progresar a carcinoma in situ y carcinoma invasor si no se trata de forma temprana <sup>(5)</sup>.

Los NIC se clasifican según la gravedad, el NIC1 o de bajo grado denota displasia leve abarcando el tercio inferior del epitelio, NIC2 o displasia moderada afecta dos tercios del epitelio, NIC3 o displasia grave cuando afecta más de dos tercios del epitelio. Las células epiteliales están bien organizadas en el cuello uterino normal, sin embargo, en los NIC y el cáncer, las células infectadas con el HPV se vuelven displásicas <sup>(5)</sup>.

La unión escamo columnar es el área que se cree que tiene mayor riesgo de transformación neoplásica. Los tumores que surgen en el exocérnix suelen ser carcinomas de células escamosas y representan el 75% de los carcinomas cervicales invasivos, por el contrario, los que surgen en el endocérnix tienen más probabilidad de ser adenocarcinomas. Los carcinomas adenoescamosos, neuroendocrinos, papilares serosos y de células claras del cuello uterino son subtipos histológicos menos comunes <sup>(6)</sup>.

### 1.3. Estructura del HPV

Los papilomavirus pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, se han descrito más de 200 genotipos de Virus de Papiloma Humano (HPV) que se organizan en 5 géneros:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\eta$  <sup>(7)</sup>. Se clasifican según el tejido que infectan en cutáneos y mucosos, los de alto riesgo se asocian con infecciones de la mucosa (HPV 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70) y los de bajo riesgo con lesiones cutáneas (HPV 6, 11, 42, 43 y 44). Los de bajo riesgo causan lesiones benignas que a menudo forman verrugas y rara vez se encuentran en lesiones malignas; por el contrario, los de alto riesgo se asocian con lesiones como el CaCU <sup>(5)</sup>.

Los HPV no presentan envoltura y cuentan con una cápside icosaédrica, tienen un genoma de 8000 pares de bases con DNA circular de doble cadena <sup>(7)</sup>. El genoma del HPV está organizado en tres secciones funcionales, la región temprana (E), la región tardía (L) y una región reguladora ascendente (URR). Las regiones temprana y tardía constan de nueve marcos de lectura abierta (ORF, open reading frame), seis en la región temprana, dos en la región tardía y en la URR se encuentra el origen de la replicación del DNA (ori), así como los sitios de unión del factor de transcripción necesarios para la regulación de la transcripción dependiente de la RNA polimerasa II. Estas regiones se

encuentran separadas por sitios de poliadenilación temprana (PAE) y tardía (PAL) respectivamente. El genoma del HPV contiene dos promotores principales p97 y p670, donde p97 en HPV16 es responsable de la expresión de los genes tempranos (aguas arriba del ORF de E6) y p670 es responsable de la expresión tardía (dentro del ORF de E7) <sup>(8)</sup>.

El ciclo de vida del HPV está estrechamente ligado a la diferenciación del epitelio. Para que se establezca una infección, los viriones deben acceder a la lámina basal del epitelio estratificado a través de microlesiones e ingresar a las células en la unión escamoso-columnar. La unión primaria de los viriones implica la unión de la proteína de la cápside L1 a los proteoglicanos de sulfato de heparan (HSPG) en la membrana basal o en la superficie de los queratinocitos basales. Esto induce cambios conformacionales en la estructura de la cápside, lo que resulta en la exposición de la proteína L2 de la cápside y la unión a receptores secundarios. Luego de la endocitosis, ocurre el desmontaje de la cápside que se produce en el endosoma tardío, seguido del tráfico del genoma viral, en complejo con L1 y L2, hacia la red trans-Golgi (TGN). El tráfico nuclear posterior depende de manera crítica de la ruptura de la envoltura nuclear durante la mitosis y requiere la unión de los genomas virales a los cromosomas mitóticos del huésped a través de L2.

Después de la entrada al núcleo, se cree que el genoma se amplifica rápidamente alrededor de 50 a 100 copias por célula. Como el HPV no codifica una polimerasa, esto se logra mediante la captación de la maquinaria de replicación del DNA del huésped, un proceso mediado por las proteínas virales E1 y E2. Luego, el número de copias episomales se mantiene en las células basales, donde la expresión de las proteínas virales E6 y E7 sigue siendo mínima debido a la represión mediada por E2 del promotor temprano p97/p105, lo que ayuda a evitar la respuesta inmune.

A medida que la célula basal infectada se divide, una célula hija permanece en la capa basal y actúa como reservorio episomal, mientras que la otra comienza a migrar hacia arriba a través de las capas epiteliales. Aquí, la expresión de las oncoproteínas virales E5, E6 y E7 retrasa la diferenciación terminal y previene la salida del ciclo celular con el fin de proporcionar un entorno adecuado para una mayor amplificación del genoma, que se produce mediante la extensión de la fase G2 del ciclo celular. Como las oncoproteínas

no poseen ninguna actividad enzimática intrínseca, esto debe lograrse interactuando y modulando la actividad de los factores celulares del huésped<sup>(8)</sup>.

Con la integración del DNA viral al celular, la expresión de E6 y E7 cae bajo el control de promotores celulares y se vuelve dependiente del ciclo celular a medida que se pierde el gen E2. En consecuencia, el gen E5 se pierde en su mayor parte en este proceso, pero en algunos casos se ha encontrado que E5 se expresa en lesiones cervicales de alto grado y cánceres generados por HPV, muy probablemente debido a la presencia de una forma episomal del virus o virus concatamérico. La integración del genoma viral no es parte del ciclo de vida viral normal, ya que provoca la pérdida de genes necesarios para completar la síntesis de partículas virales. Una vez que se integra el genoma del HPV, la infección se vuelve abortiva y no se generan ni liberan más viriones<sup>(4)</sup>.

#### 1.4. Estructura y Función de E5

La proteína E5 de HPV16 es una proteína de 83 aminoácidos con un peso aproximado de 10 kDa; tiene tres regiones hidrofóbicas que le permiten el anclaje a membranas<sup>(7)(9)</sup>. E5 es expresada por un subconjunto de tipos de HPV como son los de alto riesgo 16, 18 y 31. Las proteínas E5 de HPV16 y 18 contienen tres estructuras de hélice  $\alpha$  que funcionan como dominios transmembranales (TMD). El E5 se localiza principalmente en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, y también se observa una pequeña proporción en la región perinuclear y la membrana plasmática. Se ha demostrado que HPV16-E5 se oligomeriza tanto *in vitro* como en las células; sin embargo, esto no se ha podido observar en células infectadas por HPV<sup>(8)</sup>. La proteína E5 del HPV16 se considera una oncoproteína debido a su capacidad para inducir un crecimiento independiente del anclaje en fibroblastos murinos y queratinocitos humanos<sup>(10)</sup>. El gen que codifica para E5 se encuentra ubicado en el extremo 3' de la región temprana del genoma viral expresado a partir de un mRNA empalmado. La proteína contiene tres regiones: el dominio N-terminal, el dominio central y el dominio C-terminal<sup>(11)</sup>.

La organización genómica de los HPV de alto riesgo son Alfa, Mu y Beta. Aunque todos comparten una organización genética común, el tamaño y la

posición de los ORF principales pueden variar, y los tipos Beta de HPV carecen de un ORF E5 (Fig.1) <sup>(12)</sup>.

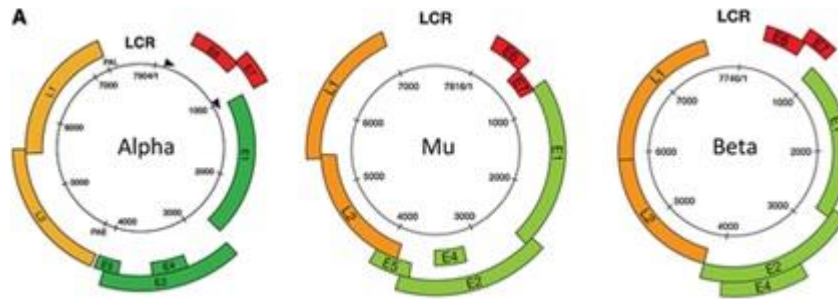
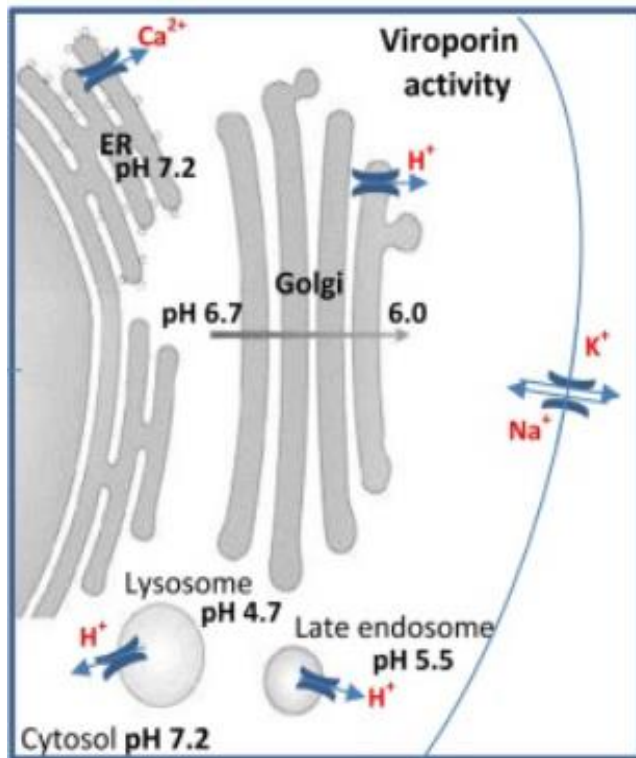


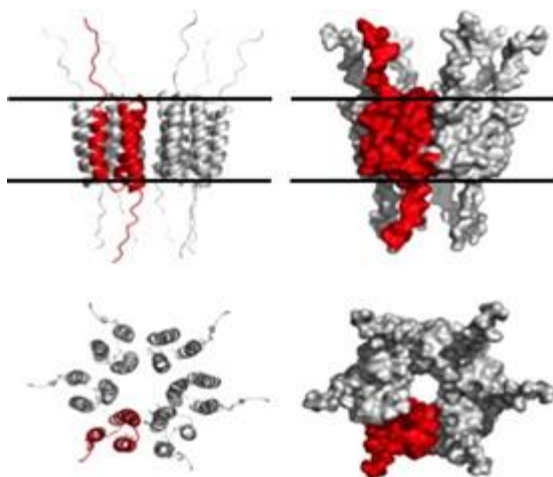
Figura 1. Organización genómica típica de los genomas del HPV Alfa, Mu y Beta de alto riesgo. Las posiciones de los promotores principales están marcadas con flechas en el mapa del genoma Alfa del HPV de alto riesgo (Tomado de Doorbar J, et.al.2015<sup>(12)</sup>).

E5 comparte características similares a un grupo de proteínas virales de membrana denominadas vioporinas, las cuales crean un poro hidrofílico formado por las caras hidrofílicas de las hélices anfipáticas y los residuos hidrofóbicos que interactúan con la bicapa de fosfolípidos <sup>(10)</sup>. Dentro de las funciones que se le atribuyen a las vioporinas están la formación de la curvatura negativa de la membrana necesaria para la liberación de partículas virales, la formación de canales de H<sup>+</sup> dependientes del pH y la alteración de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup>. Algunas de las vioporinas y proteínas de membrana con función de canal en virus de DNA son agnoproteína del poliomavirus JC, la proteína viral 4 del virus de simio 40 (SV40) y E5 del virus del papiloma humano tipo 16 (Fig.2) <sup>(13)</sup>.



**Figura 2: Actividad de las vioporinas:** La actividad de la vioporina puede actuar aumentando las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico o reduciendo el pH citosólico debido a la actividad de los canales iónicos en los compartimentos ácidos como el trans Golgi, lisosomas y endosomas tardíos (Tomado de Breitinger U, et.al.2022 <sup>(13)</sup>).

El modelado molecular predice que E5 es una proteína transmembranal de tres pasos, parece autoasociarse mediante interacciones no covalentes entre sus dominios transmembranales y posiblemente también mediante enlaces disulfuro (Fig. 3) <sup>(9)</sup>.



**Figura 3. Modelo de un canal iónico hexamérico generado por la proteína E5 del HPV16 in vitro.** Las ilustraciones superiores muestran una vista lateral del canal hexamérico en la representación de cinta (izquierda) o de relleno de espacio (derecha). En rojo se muestra un monómero 16E5 con tres segmentos que atraviesan la membrana. La posición supuesta de la superficie de la membrana se muestra mediante líneas horizontales (Tomado de DiMaio D, et.al.2012 <sup>(9)</sup>).

Dentro de las funciones que se le atribuyen a la oncoproteína E5 se encuentran:

- Reduce los niveles de proteínas MHC1, modulando la maquinaria de regulación de MAPK y los niveles de caveolina1 asociados con la unión, el transporte y la apoptosis de los mecanismos celulares <sup>(11)</sup>.

- Suprime la expresión de las proteínas p21 importante supresor de tumores y de p27 tanto en fibroblastos como en queratinocitos, y coopera con E6 y E7 para iniciar la progresión del CC <sup>(9)(11)</sup>.

- Se une a BAP31 (proteína 31 asociada al receptor de células B) que actúa como un modulador del transporte de membrana y modula las funciones del receptor EGFR y el pH endosomal sin afectar la glicosilación <sup>(10)(11)</sup>.

- Inhibe la apoptosis celular y esto se logra inhibiendo el ligando Fas (FasL), así como el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) <sup>(11)</sup>.

- Participa en la regulación negativa de FasL mediada por TRAIL y modula la expresión del complejo de señalización inductor de muerte (DISC), que proporciona inmortalidad a las células derivadas de cáncer cervical y su mortalidad se reduce mediante la escisión de la procaspasa 3, 8 y PARP <sup>(11)</sup>.

- El receptor del factor de crecimiento de queratinocitos (KGFR/FGFR2b), está alterado en su señalización y tráfico endocítico en queratinocitos indiferenciados que expresan HPV16-E5, el cual induce una modulación negativa del KGFR/FGFR2b, una variante de transcripción de empalme del Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR2), que desempeña un papel clave en el equilibrio entre el crecimiento y la diferenciación epitelial. KGFR se distribuye principalmente en las células suprabasales y su expresión está regulada positivamente durante la diferenciación de los queratinocitos <sup>(14)</sup>.

- Otra función de E5 para desencadenar la inflamación es mediante COX2. Se encuentra mediado por moléculas de señalización de EGFR (MAP-K, PI3K/Akt). También se ha demostrado que la expresión de E5 conduce a la

activación de NF-KB y a la posterior expresión de la COX2 por una vía independiente de las utilizadas por las oncoproteína E6, E7 <sup>(15)</sup>.

E5 afecta múltiples mecanismos, pero en particular el mecanismo molecular por el cual HPV16 y 18 afecta la señalización de EGFR y con ello el proceso de transformación, es algo que aún no está totalmente descrito <sup>(9)(16)</sup>.

### 1.6. Vías de señalización del Receptor del Factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

El EGFR, también denominado HER1 y ErbB, es un miembro más de la familia de receptores ErbB que también está integrada por ErbB2 (Neu, HER2), al ErbB3 (HER3) y al ErbB4 (HER4), estrechamente relacionados desde el punto de vista funcional y estructural. El EGFR interviene en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células. EGFR posee la capacidad de formar heterodímeros con otros miembros de la familia ErbB, incrementar notablemente los niveles de complejidad en el proceso de activación del receptor y la especificidad de los ligandos. La variedad de ligandos, unido a la posibilidad de formar combinaciones de homodímeros y heterodímeros en la familia de ErbB, a su vez acoplados a diversas vías de señalización intracelular, determinan un elevado grado de complejidad en el denominado sistema EGF/EGFR (Fig. 4). La vía de las MAP cinasas, Ras/Raf/ERK es la mejor caracterizada, varias evidencias experimentales sugieren que muchos de los efectos biológicos observados luego de la activación por ligandos del EGFR, pudieran estar asociados a la activación de la vía Ras/Raf/ERK, fundamentalmente relacionado con la proliferación celular <sup>(17)</sup>.

Otra vía de señalización intracelular del EGFR activado es la asociada a fosfatidil inositol 3-kinasa (PI3K), la cual parece estar relacionada con los niveles de proteína kinasa B (PKB o Akt) y con la supervivencia de las células tumorales <sup>(18)</sup>. El receptor específico, activado por el ligando extracelular, activa PI3K que cataliza la fosforilación de PIP2 en la posición 3 del anillo de inositol para generar PIP3, que recluta dos proteínas quinasas a la membrana plasmática a través de sus dominios de interacción de homología de pleckstrina

(dominios PH): AKT y PDK1 (proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinositida). Una vez reclutado en la membrana celular, el AKT es fosforilado por mTORC2 (complejo mTOR 2) en Ser473, cambiando la conformación del AKT y permitiendo su fosforilación en Thr308 por PDK1. La AKT activada fosforila proteínas diana de la membrana celular, luego pierde su conexión con la membrana celular y fosforila otras proteínas diana en el citosol y el núcleo celular. La fosforilación de proteínas diana da como resultado la estimulación de la supervivencia, el crecimiento y la proliferación celular <sup>(19)</sup>.

Otras vías de señalización asociadas al proceso de activación del EGFR son: la vía de las proteínas STAT y la vía de la fosfolipasa C-g (PLC-g), las cuales se han asociado, sobre todo, a la resistencia a apoptosis, la migración celular, así como a la proliferación celular y a la transformación, respectivamente <sup>(20)</sup>. La fosfolipasa C (PLC) específica de fosfoinosítido hidroliza PIP2 para producir inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) que, a su vez, pueden activar objetivos posteriores implicados en la proliferación y diferenciación celular, como la proteína quinasa C (PKC) y vías de señalización dependientes del calcio <sup>(21)</sup>.

En la vía de señalización JAK/STAT la interacción de las citocinas o de los factores de crecimiento con sus receptores induce la dimerización/oligodimerización de estos receptores. Esta interacción da como resultado la yuxtaposición de JAK, causando su autofosforilación o transfosforilación por otras JAK u otras familias de tirosinas quinasa. Las JAK activadas fosforilan las colas citoplasmáticas del receptor en los residuos de tirosinas, creando sitios que permiten la unión de otras moléculas de señalización que contienen un dominio SH2 como las proteínas STAT. Las STAT fosforiladas forman homodímeros o heterodímeros que se traslocan hasta el núcleo y activan la transcripción génica. La vía JAK/STAT está regulada negativamente por los supresores de la señalización de citosinas (SOCS), así como por la proteína inhibidora de STAT activada (PIAS) y la proteína tirosina fosfatasa (PTP) <sup>(22)</sup>.

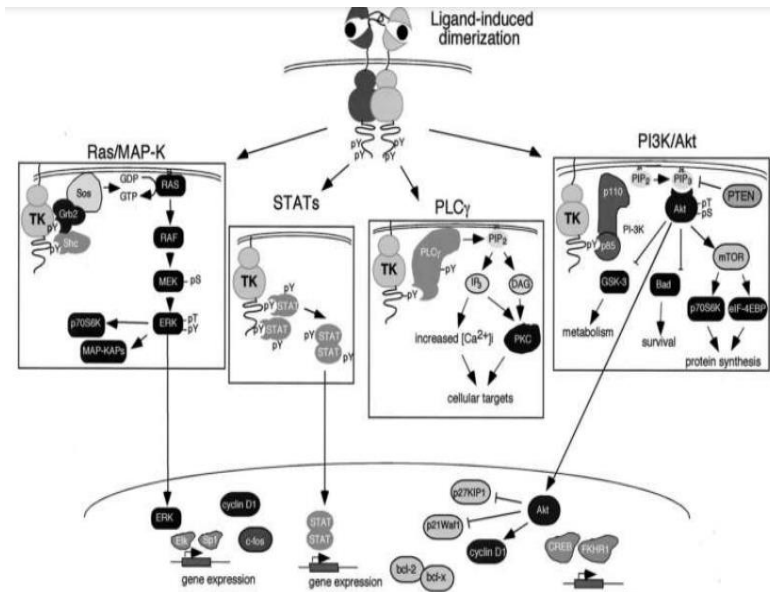


Figura 4. Vía de señalización del EGFR. La vía de señalización inicia con la unión del ligando al receptor, posteriormente el receptor puede formar un homodímero o un heterodímero, esto provoca múltiples fosforilaciones, las cuales reclutan diferentes proteínas que iniciarán cascadas de señalización de vías como las MAPK, STATs, PLC $\gamma$  y PI3K (Tomado de Zacatenco U, et.al.2015 (7)).

### 1.7. RAS y la vía MAP-K

Los miembros de la familia Ras son pequeñas proteínas G. Son proteínas asociadas a lípidos de membrana plasmática (farnesilación) mediante su extremo C-terminal. Estas proteínas funcionan como un “switch” en dos conformaciones: una activa cuando está unida a GTP (Ras-GTP) y otra inactiva cuando GTP es hidrolizado a GDP (Ras-GDP). La transición de forma inactiva a activa es controlada por el “Factor Intercambiador de Nucleótidos de Guanosina” (GEFs). Ras es activado mediante el reclutamiento de pequeñas proteínas adaptadoras citosólicas como Grb-2. Esta proteína adaptadora tiene un dominio SH2 y dos dominios SH3; mediante su dominio SH2 puede unirse directamente con el receptor tirosin-fosforilado o mediante substratos intermediarios como SHP-2. De manera constitutiva, Grb2 se asocia con Sos (factor intercambiador de nucleótidos guanina-Ras) mediante sus dominios SH3 y convierte Ras-GDP inactivo a Ras-GTP activo (23).

La actividad de Ras es regulada por enzimas que promueven la hidrólisis de GTP (proteínas activadoras de GTPasas o GAPs) y por enzimas que están involucradas en el intercambio de GDP por GTP, como el Factor

Intercambiador de Guanosina (GEF); el balance entre GAPs y GEF en la célula determina la actividad de la célula. Una vez activada Ras es iniciada una cascada de señalización mediante la fosforilación de residuos de serina y treonina en diferentes proteínas como Raf-1. Aunque no se ha podido dilucidar muy bien el mecanismo por el cual Raf-1 es activada, se ha sugerido que la defosforilación del residuo de Ser-259 es esencial para su activación. Raf-1 al ser activada es traslocada a la membrana plasmática y puede fosforilar quinasas específicas Mek1y Mek2. Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), Erk 1 y Erk 2 son serina/treonina quinasas que son activadas por fosforilación por Mek. Esta cascada de señalización serina/treonina culmina con la fosforilación de Erk, la cual se trasloca a núcleo e induce a la transcripción de genes <sup>(23)</sup>.

#### 1.8. Factor de crecimiento epidérmico y E5

Los estudios para descifrar los mecanismos por los cuales E5 causa transformación celular se iniciaron con la proteína BPV1 E5 y luego sobre E5 y EGFR de alto riesgo. Primeramente, se observó en los fibroblastos que sobre expresan EGFR, en donde HPV E5 pudo inducir un crecimiento independiente del anclaje. Luego se observó que E5 de HPV16 podía inducir un crecimiento independiente del anclaje con estimulación de EGFR en los queratinocitos. También se observó que dichas células mostraron un mayor reciclaje a la superficie celular, un mayor grado de fosforilación y retraso en la degradación de EGFR en presencia de HPV16-E5<sup>(24)</sup>. Independientemente de los avances en el estudio de la modulación de E5 en la vía de señalización de EGFR aún se desconoce gran parte del mecanismo molecular por el cual E5 induce la transformación celular.

La activación de la señalización de EGFR por E5 inicia una cascada diversa que conduce a la activación de varios proto-oncogenes. Se ha observado que las células que expresan HPV16-E5 tienen mayor actividad de la proteína quinasa activada por mitógeno y una mayor respuesta al EGF. El aumento de EGFR induce una mayor transformación por HPV E5 en células NIH-3T3. La activación de la vía de señalización MAPK es un evento clave en la proliferación celular mediada por E5, lo cual involucra la proteína E5 con la

cascada de fosforilación intracelular. Se inicia la cascada con unión de ligandos a receptores de factor de crecimiento, como EGFR, que activan el oncogén RAS, el cual a su vez recluta al oncogén RAF que conduce a la activación de MEK (MAP-ERK). MEK causa la fosforilación de ERK1/2, que a su vez viaja hacia el núcleo y activa sus proteínas blanco como c-Fos, c-Myc, Ets1, Ets2, Elk-1, c-Jun, entre otros <sup>(24)</sup>.

### 1.9. MYC y su actividad en presencia de HPV

La familia de genes *MYC* está compuesta por *C-MYC*, *N-MYC* y *L-MYC*. *MYC* codifica a Myc (también conocido como c-Myc), el cual es un factor de transcripción que interviene en la progresión del ciclo celular, el crecimiento y división celular, apoptosis y la angiogénesis <sup>(25)</sup>.

El mRNA de *MYC* genera polipéptidos Myc, incluido uno que se inicia en un CUG río arriba del codón de inicio AUG canónico y otro que comienza en un AUG interno. La proteína Myc traducida del AUG canónico contiene un dominio regulador transcripcional N-terminal seguido de una señal de localización nuclear (NLS) en los aminoácidos 320-328 y una región C-terminal con un dominio básico de unión al DNA unido a una cremallera de hélice-bucle-hélice-leucina (HLH-Zip) motivo de dimerización. Myc se dimeriza con Max para unirse al DNA y mediar en muchas de sus funciones <sup>(26)</sup>.

La proteína Myc contiene varios dominios, dentro del dominio amino terminal hay varias regiones conservadas, conocidas como cajas MYC (MBI, II, III y IV). MBI y MBII están ubicados dentro del dominio de transactivación (TAD), un dominio de 143 aminoácidos que se requiere para la actividad transcripcional y de transformación celular de Myc. Se ha demostrado que MBIII y MBIV son importantes para la represión transcripcional y para la actividad proapoptótica de Myc. El mRNA de *MYC* es inherentemente inestable, con una vida media de aproximadamente 30 minutos, y la traducción del mRNA de *MYC* está estrechamente regulada y responde a las vías de señalización del crecimiento celular. Finalmente, la proteína Myc se degrada rápidamente después de su síntesis (vida media de aproximadamente 20 minutos en células no transformadas). Uno de los mecanismos más

destacados para garantizar una regulación adecuada de los niveles de Myc implica la degradación por parte del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) (27).

Myc también puede ser degradada en el citosol por la calpaína (Fig.5). La escisión dependiente de calpaína depende del calcio y se ha demostrado que la escisión por calpaínas funciona para inactivar la actividad transcripcional de Myc eliminando el extremo carboxilo. Al igual que la escisión de otras proteínas mediada por calpaínas, las calpaínas provocan una escisión parcial de Myc en lugar de una degradación completa. La escisión de Myc con calpaína genera "Myc-nick", un segmento N-terminal de 298 aminoácidos (27). La fosforilación de la calpaína puede resultar en activación o inhibición dependiendo de la quinasa, la fosforilación de la calpaína-2 mediada por ERK y PKC se ha observado que aumenta su actividad, hay estudios que sugieren la activación de calpaína mediada por EGF. El aumento de la actividad de las calpaínas 1 y 2 contribuyen a la migración, invasión y metástasis de las células tumorales al alterar la dinámica de adhesión focal y promover la remodelación del citoesqueleto (28).

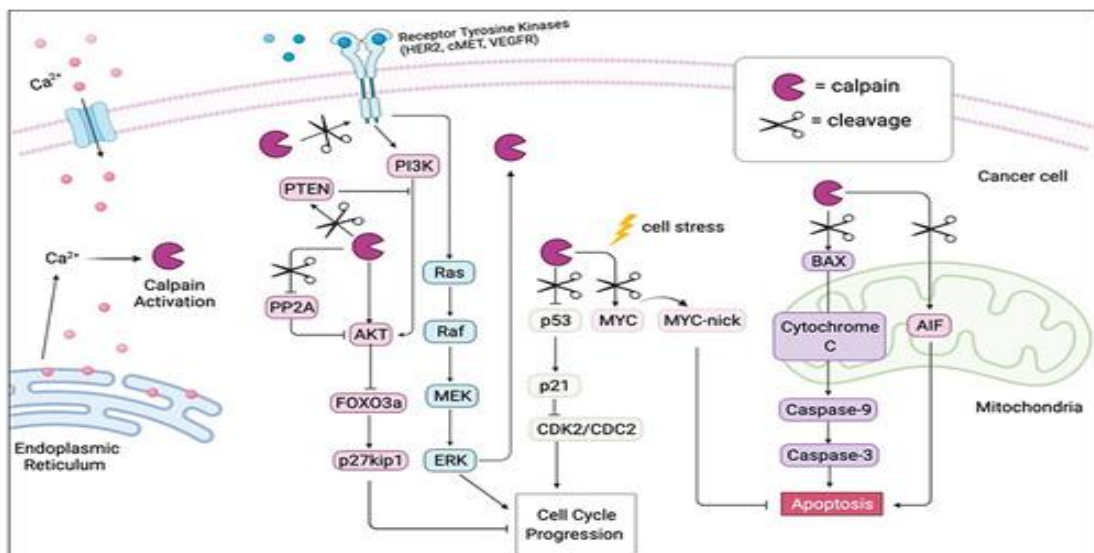


Figura 5: Sustratos de calpaína en supervivencia celular y apoptosis. La calpaína se activa por aumento de las concentraciones de calcio intracelular a través del influjo de Ca<sup>2+</sup> o la liberación de las reservas intracelulares. La calpaína está implicada en muchas vías de señalización asociadas a la muerte y supervivencia celular, incluidas la PI3K-AKT, ERK, p53, MYC, caspasa, vía AIF (Tomado de Shapovalov I, et.al.2022 (28)).

La ruta más importante para la degradación de Myc es a través del UPS. La degradación mediada por ubiquitina es un proceso altamente específico dependiente de ATP. Las proteínas son el objetivo de la degradación por parte del proteosoma en un proceso de dos pasos en el que primero las moléculas de ubiquitina se agregan covalentemente a la proteína objetivo y segundo el proteosoma 26S degrada las proteínas poliubiquitinadas. Los estudios han demostrado que Myc es un objetivo directo para la ubiquitinación mediada por Fbw7 y que SCF<sup>Fbw7</sup> desencadena la degradación proteosomal de Myc. La regulación de la estabilidad de c-Myc por Fbw7 depende de la fosforilación de Myc. Myc se estabiliza mediante la fosforilación de la serina 62 (pS62) por ERK. La enzima desubiquitinante Usp28 se opone a la ubiquitinación de Myc mediada por Fbw7 $\alpha$  estabilizando a Myc y evitando su degradación<sup>(27)</sup>. Usp28 regula la estabilidad de varias oncoproteínas involucradas en la proliferación, la progresión del ciclo celular y la oncogénesis, como c-MYC, c-JUN, NOTCH1 o CCNE en carcinoma de células escamosas (SCC)<sup>(29)</sup>.

El gen *c-MYC* se encuentra en la región cromosómica más comúnmente afectada por la integración del genoma del HPV (8q24), y se encontró que la sobre expresión de c-Myc se correlaciona con la amplificación del HPV<sup>(4)</sup>. c-Myc es un oncogén que parece activarse en el carcinoma escamoso de cérvix uterino, ya en displasias de alto grado. Es posible que c-MYC induzca mayor proliferación y en consecuencia mayor expresión de Ki-67 y ciclina D1<sup>(30)</sup>.

El mecanismo para la regulación positiva de Myc aún no se conoce completamente, pero los datos respaldan un papel relevante para la vía de señalización Ras/Raf/Mek/Erk, y siendo esta cascada de señalización modulada por HPV16-E5, es posible que E5 tenga algún efecto sobre Myc, durante el proceso de transformación celular asociado a esta oncoproteína<sup>(25)</sup>.

## 2. Justificación

E5 del HPV16 se considera una oncoproteína debido a su capacidad para inducir un crecimiento independiente del anclaje en fibroblastos murinos y queratinocitos humanos. Es una proteína de 83 aminoácidos con tres dominios transmembranales que se organizan por pentámeros y forman un poro por lo que se incluye en el grupo de las viroporinas. Dentro de las funciones de E5, se ha descrito su capacidad para modular el pH endosomal y estimular el reciclaje de EGFR. Se ha observado que las células que expresan HPV16-E5 incrementan la actividad de la proteína cinasa activada por mitógeno y una mayor respuesta al EGF. La vía de señalización EGFR y MAPK también se ha visto involucrada en la modulación positiva de factores de transcripción como c-Myc en presencia de HPV16-E5. A pesar de los esfuerzos por dilucidar el mecanismo molecular por el cual E5 modula la cascada de señalización de las MAPK cinasas aún se desconoce qué elementos de la cascada río abajo de Ras están siendo modulados por E5, por lo que en el presente estudio nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

### 3. Pregunta de investigación:

¿Qué elementos de la cascada de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y Ras son modulados por E5 de HPV 16 durante el proceso de transformación celular?

### 4. Objetivo General:

Identificar los elementos de la cascada de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) río abajo de la proteína Ras, modulados por E5 de HPV16 durante el proceso de transformación celular.

#### Objetivos Específicos

- 4.1 Determinar si la expresión de E5/EGFR/Ras transforman líneas celulares de ratón.
- 4.2 Evaluar la cascada de señalización de EGFR en presencia de E5 y +Ras en líneas celulares de ratón.

4.3 Determinar el mecanismo molecular a través del cual E5 modula la cascada de señalización EGFR y Ras

#### 5.Hipótesis Alterna:

5.1 Si E5 modula la cascada de señalización de EGFR y E5 reduce la actividad transformante de Ras entonces el complejo Ras+RAF+SRC se verá afectado en su activación.

5.2 Si E5 modula la cascada de señalización de EGFR, y MYC es activado durante esta cascada entonces E5 modula positivamente a MYC

#### Hipótesis Nula:

5.3 Si E5 modula la cascada de señalización de EGFR y E5 reduce la actividad transformante de Ras entonces el complejo Ras+RAF+SRC no se verá afectado en su activación.

5.4 Si E5 modula la cascada de señalización de EGFR y MYC es activado durante esta cascada entonces E5 no modula positivamente a MYC

## 6. Metodología.

### 6.1. Líneas celulares

Se llevaron a cabo los experimentos con las líneas celulares correspondiente a un **pool celular**, derivadas de fibroblastos de ratón. La línea 3T3 es el control negativo, EGN+Ras (EWT2bis) es el control positivo, EGNE5 y EGNE5+Ras (WTE53) son las líneas de interés a estudiar. Los fibroblastos de ratón NIH 3T3 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). La línea celular EGFR fue donada por el Dr. Lowy (Lab. Cellular Oncology. NCI, NIH, Bethesda, MD, EE.UU). Las líneas EGN+Ras (EWT2bis), EGNE5 y EGNE5+Ras (WTE53) se obtuvieron como resultado del trabajo de tesis del Dr. Adolfo Pedroza Saavedra del programa de posgrado “Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México”.

**Tabla 1. Líneas celulares que expresan las oncoproteínas HPV16 E5 y Ha-Ras.**

<b>Líneas Celulares</b>	<b>Plásmido transfectado</b>	<b>Características</b>
<b>3T3</b>	Ninguno (línea parental)	Fibroblastos de ratón de la línea NIH-3T3
<b>EWT2bis (+Ras)</b>	pBabe-Ras	Línea celular EGFR transfectada con la oncoproteína Ha-Ras activa (G12V y A59T).
<b>EGNE5 (E5)</b>	pCDNA-E5	Línea EGFR transfectada con HPV16-E5
<b>WTE53 (E5+Ras)</b>	pCDNA-E5/pBabe-Ras	Línea celular EGFR transfectada con la oncoproteína HPV16-E5 y Ha-Ras activa (G12V y A59T).

## 6.2. Condiciones de cultivo celular.

Para el cultivo celular se utilizaron las líneas celulares 3T3, EWT2bis (+Ras), EGNE5(E5) y WTE53(E5+Ras). Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (penicilina-estreptomina); se incubaron a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. Los experimentos se llevaron a cabo con cultivos celulares con aproximadamente un 80-90% de confluencia. Estas condiciones aseguran que los resultados sean reproducibles en todo momento.

## 6.3. Curva de Proliferación

Las curvas de crecimiento celular se realizaron sembrando cada línea celular en 10 cajas de Petri de 35 mm por duplicado a una concentración de  $5 \times 10^4$  células/caja. En los tiempos 1, 2, 4, 6 y 8 días se tomaron dos cajas por cada línea celular y se tripsinizaron (lavar 3 veces con PBS, agregar 0.5 ml de tripsina 0.25%, incubar 5 min a 37°C y agregar 0.5 ml de DMEM completo). Posteriormente se transfirieron las células a tubos eppendorf de 1.5 ml, se tomaron alícuotas de 25µl de suspensión de células + 25µl de azul tripano, se realizó el conteo por duplicado en la cámara de Neubauer y se obtuvieron las concentraciones celulares en cada tiempo (concentración celular= #células  $\times 10^4 \times$  dilución = #células/ml  $\times 10^4$ ). Los datos obtenidos se graficaron como tiempo (días) vs. no. células, con lo que se generaron las curvas de crecimiento, a partir de aquí se calcularon los tiempos de duplicado y la densidad de saturación para cada línea celular.

## 6.4. Agar Suave

En el ensayo de Agar Suave se cultivó cada línea celular por duplicado en una placa de 6 pozos con 1.5 ml de agar base al 1% y 1.5 ml de agar suave al 0.35%. En cada placa de 6 pozos se sembraron por duplicado las diluciones celulares de  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^2$  para cada línea celular. Se prepararon previamente los reactivos: Agar a dos concentraciones: 2% y al 0.7% en agua MiliQ y DMEM 2X. Se fundió la primera capa con DMEM 2X suplementado (37°C) + SFB + Agar 2% (42°C) y se dejó gelificar por 30 a 60 min. Para fundir

la segunda capa de agar se requirió tripsinizar las células de la línea correspondiente, realizar conteo celular y tomar un volumen con 150,000 células. El volumen de células se transfirió a un tubo de 15 ml y se centrifugó 2 min a 2000 rpm, posteriormente se resuspendió en 450  $\mu$ l de SFB en el primer tubo para luego hacer las diluciones seriadas y obtener las concentraciones de  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^2$  de células por pozos. Para cada dilución se preparó un tubo de 15 ml con DMEM 2X suplementado (37°C) + Agar 0.7% + SFB con las células, se mezcló suavemente y se colocó 1.5 ml de la mezcla en cada pozo (2x), esto se repitió para cada dilución. El Agar se dejó gelificar por 30 a 60 min a temperatura ambiente y luego se incubó a 37°C en una cámara húmeda por 19 días, y alimentando las células cada tercer día con 100  $\mu$ L de DMEM suplementado. Para realizar la cuantificación de las colonias, se tiñeron con cristal de violeta 0.0025% en metanol 20%, se incubó por 30 min a temperatura ambiente y se retiró la tinción; se tomaron fotografías bajo el microscopio y se contaron las colonias formadas en cada caja de 6 pozos por cada línea celular por duplicado.

#### 6.5. Cuantificación de proteínas.

Para la cuantificación de proteínas, primeramente se realiza el lisado celular para lo cual se expande el cultivo a cajas Petri p100, luego se retira el medio de cultivo y se lava 3 veces con PBS frío (solución de buffer de fosfatos) (KCl 2.7mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5mM, NaCl 150mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.1mM, pH 7.4), y se lisan con RIPA buffer (buffer para ensayos de radio inmunoprecipitación) (PBS 2x, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, EGTA 0.1mM pH8.0, Ortovanadato Na 200 $\mu$ M, NaF 100mM, NP40 0.5%, Desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%) mezclado con coctel de inhibidores de proteasas (Mini complete de Roche®), por 10 min en hielo. Los lisados celulares se transfieren a tubos eppendorf y se centrifugan por 10 min a 14,000 rpm a 4°C para separar el desecho celular. El sobrenadante se traspassa a un tubo nuevo.

Posteriormente, para determinar la concentración de proteína de los lisados se utiliza el kit de BCA (Pierce), en donde duplicados de los lisados celulares (5 y 10  $\mu$ L) se colocan en placas de 96 pozos con buffer de lisis y reactivo BCA (Sulfato cúprico al 4% más ácido bicinconínico en proporción 1:50) a temperatura ambiente por 20-30 min. La reacción de proteínas se lee en el

lector de placas de ELISA (OD 570 nm), y las concentraciones se calculan a través de extrapolar los valores obtenidos con una curva de calibración de albúmina bovina sérica.

#### 6.6. Electroforesis de proteínas de lisados celulares.

La separación de proteínas se llevó a cabo por medio de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5 %. En el gel, se cargan cuarenta microgramos de lisados celulares preparados (dil 1:5) con buffer de carga para condiciones reducidas Laemmli 5X (SDS 2%, Glicerol 8.6%, Tris HCl 1M pH 6.8 100mM, azul de bromofenol 0.01%) adicionado con DTT 64.83 mM, para obtener una concentración final 1X. Las muestras se hierven por 5 min, se enfrían rápidamente en hielo y se centrifugan a 14,000 rpm por 30 seg.

Las muestras se cargaron en el gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 12.5%) y se corrieron por 16 h a 70V. Pasado este tiempo, se extrajo el gel de la cámara de electroforesis y se procedió a realizar la transferencia de las proteínas a la membrana Protran para después llevar a cabo el Western blot, de acuerdo con lo descrito en la siguiente sección.

#### 6.7. Western blot:

Se realizó la técnica de Western blot (WB), la cual permite identificar una proteína en particular dentro de una mezcla. Una vez que las proteínas se separan por medio de una electroforesis desnaturizante o nativa en un gel de poliacrilamida de acuerdo con su peso molecular, se llevó a cabo la transferencia de proteínas del gel a una membrana Protran con buffer de transferencia (Tris-HCL 24mM, glicina 190mM, etanol 20%) en la cámara de transferencia (BioRad) durante 5 h a 200 V, con sistema de enfriamiento.

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó por 30 min a temperatura ambiente (TA) con TBS-T (TBS, 0.05% Tween 20) +BSA 5% +Az. sodio 0.02%. Luego se realizaron lavados con TBS-T para retirar el exceso y se incubaron con los anticuerpos específicos de las proteínas de interés (Tabla 2); para detectar su presencia, su abundancia y su estado de activación a través de fosforilación. Los anticuerpos se diluyeron en TBS-T 0.05 %+ BSA 1 %+ Az. sodio 0.02% y se incubaron por 16 h a 4°C con agitación continua. Posteriormente, se adicionó un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa

de rábano (HRP) diluido en TBS-T 0.05%+ BSA 1% con agitación suave por 1 h a TA. Finalmente, el sistema fue revelado por quimioluminiscencia y las imágenes capturadas en el equipo Odyssey (Licor) <sup>(31)</sup>.

**Tabla 2. Panel de anticuerpos utilizados para la caracterización molecular.**

ANTICUERPO	PESO MOLECULAR	MARCA	# CATÁLOGO	DILUCIÓN	APLICACIÓN
EGFR	170 kDa	ZIMED	-	1: 1000	Western blot
p-EGFR	170 kDa	CELL SIGNALING	#9789	1: 1000	Western blot
GRB2	25kDa	SANTA CRUZ	SC-225	1: 1000	Western blot
RAS	21kDa	LAB-5	-	1: 400	Western blot
RAF	75 kDa	CELL SGNALING	12552S	1: 1000	Western blot
MEK1/2	45 kDa	CELL SGNALING	4694S	1: 1000	Western blot
p-MEK1/2	45 kDa	CELL SGNALING	9154S	1: 1000	Western blot
ERK1/2	45 kDa	CELL SGNALING	4696S	1: 1000	Western blot
p-ERK1/2	45 kDa	CELL SGNALING	4370S	1: 1000	Western blot
Myc	63 kDa	LAB-5	-	1: 1000	Western blot
Myc-nick	50 KDa	LAB-5	-	1: 1000	Western blot
PI3K	80kDa	CELL SGNALING	4257S	1: 1000	Western blot
AKT	60 kDa	SANTA CRUZ	SC-5298	1: 1000	Western blot
P-AKT	60 kDa	SANTA CRUZ	SC-7985	1: 1000	Western blot
FoxO3a	75 kDa	ABCAM	EPR-1950	1: 500	Western blot
P21	20 kDa	LAB-5	-	1: 500	Western blot
p-P27	30 kDa	ABCAM	AB-75908	1: 1000	Western blot
Caplaina2	75kDa	ABCAM	AB39165	1: 1000	Western blot

## 6.8. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante estadística descriptiva, con el objetivo de discernir las tendencias generales en el comportamiento de las proteínas evaluadas a través de las líneas celulares 3T3 (control negativo), EWT2bis (+Ras), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) y para asegurar la representatividad de estos hallazgos en futuros experimentos. Para tal fin, se elaboraron gráficas de barras que representan la media y el error estándar (SE) de los valores normalizados, lo que permite una clara visualización comparativa de los grupos experimentales.

Considerando que los experimentos fueron realizados por duplicado y la distribución de los datos, se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para realizar las comparaciones entre las medias de las cuatro líneas celulares en estudio. Se evaluó con un nivel de significancia del 5% ( $p < 0.05$ ) y se empleó el software STATA (versión 14).

## 7. Resultados.

### 7.1. Grado de transformación celular de las líneas que expresan la oncoproteína E5 de HPV16.

#### 7.1.1 Caracterización morfológica de las líneas celulares que expresan E5 de HPV16.

La morfología de cada línea celular se observó a través del microscopio invertido y mediante la toma de microfotografías en sus respectivos frascos de cultivo (T25) a un 60 a 70% de confluencia. La línea 3T3 (control negativo) son células fusiformes con prolongaciones citoplasmáticas que pueden ser relativamente cortas y anchas o bien largas y delgadas con múltiples ramificaciones. Por su parte, las líneas EWT2bis (+Ras), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) mostraron ser células más grandes, desorganizadas y vacuolares, que forman focos de transformación, características muy diferentes a las 3T3 (Fig.6); destacan las WTE53 (E5+Ras) con un aparente mayor tamaño con respecto al resto de las líneas celulares (Fig. 7).

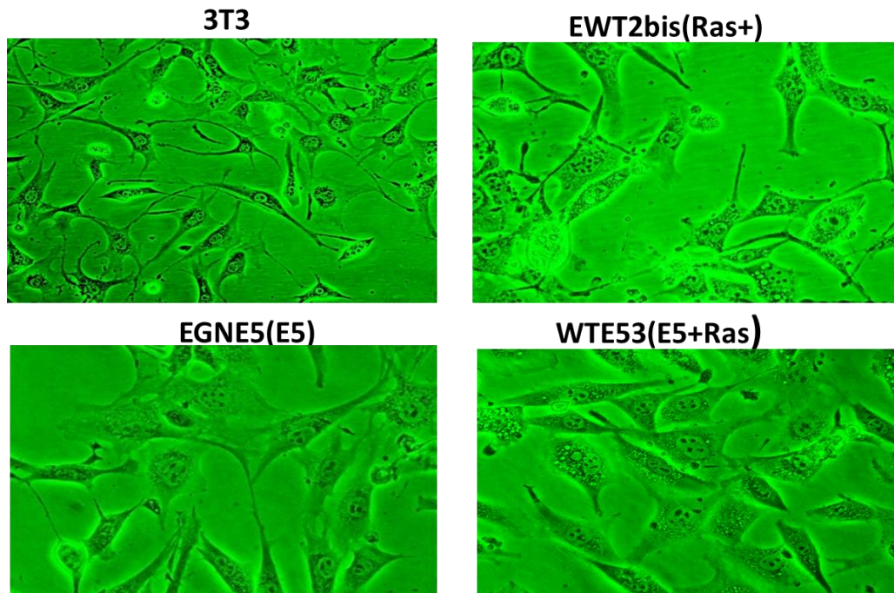
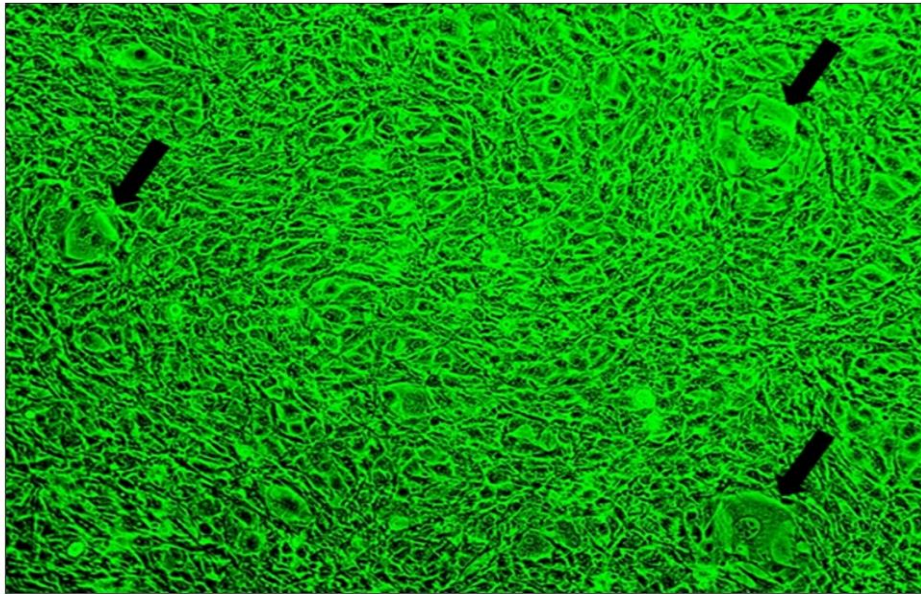


Figura 6. Microfotografías de las líneas celulares que expresan E5 de HPV16. Microfotografías tomadas bajo microscopio invertido Nikon ECLIPSE TS100 a 20X. Se observan las características morfológicas de las líneas celulares 3T3, EWT2bis, EGNE5 y WTE53.



**Figura 7: Microfotografía de la línea WTE53(E5+Ras).** Microfotografía tomada bajo el Microscopio invertido Nikon ECLIPSE TS100 a 20X. Se observan focos de transformación de la línea celular WTE53.

### 7.1.2 Cinética de proliferación de líneas celulares que expresan Ras y/o E5 de HPV16.

Evaluamos la cinética de proliferación en líneas celulares que expresan Ras y/o E5 de HPV16 mediante una curva de crecimiento. En cada línea celular se calculó el Tiempo de Doblaje (TD) en la fase exponencial de la curva y se obtuvo la Densidad de Saturación (SD).

Se evaluó el TD por duplicado en cada experimento, para ello, se cuantificó el número total de células en la cámara de Neubauer en los tiempos 1, 2, 4, 6 y 8 días. Los datos obtenidos se graficaron en una curva de dispersión y se calculó el TD en la fase exponencial de las curvas teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$N_f = N_0 * e^{rt}$$

$N_f$ - población final

$$2 = e^{rt}$$

$N_0$ - población inicial

$$\ln 2 = rt$$

$r$ - tasa de crecimiento

$$0.6931 = rt$$

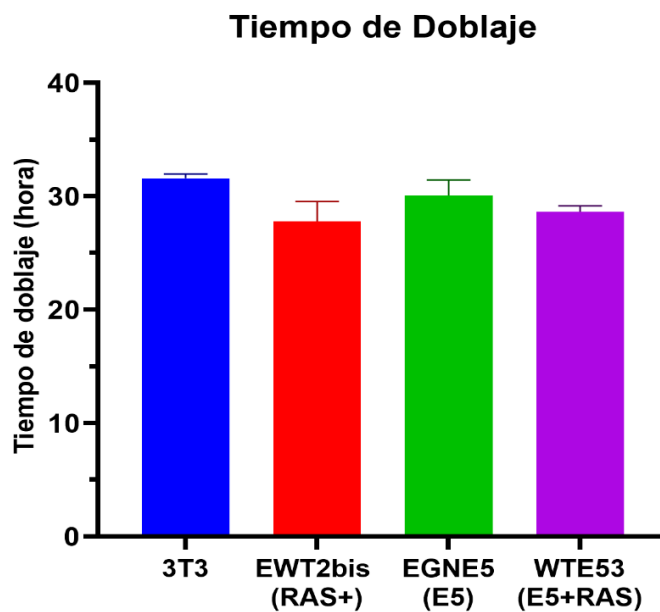
$t$ - tiempo

$$t = 0.6931/r$$

TD- Tiempo de duplicación

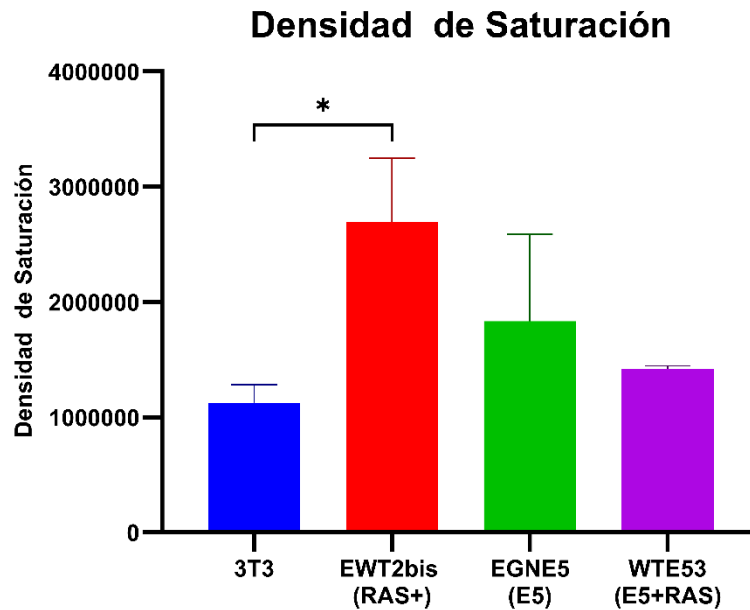
$$\mathbf{TD = 0.6931/r}$$

Se observó que la media del TD para las 3T3 (control negativo) fue de 31.58 h, y para el control positivo EWT2bis (+Ras) fue de 27.7 h. Interesante fue observar que en las líneas que expresan E5, el TD fue de 31.0 h para la línea EGNE5 (E5) y de 38.6 h para la línea WTE53 (E5+Ras). La línea transformada con +Ras (EWT2bis) tuvo el menor TD con 12% menos que el control negativo (3T3), lo cual corresponde a un mayor ritmo de proliferación; mientras que la línea WTE53 (Ras+E5) solo disminuyó respecto al control positivo un 9% del TD. La línea EGNE5 que solo expresa E5 su TD es similar a la del control negativo 3T3 (Fig. 8).



**Figura 8: Tiempo de Doblaje (TD) de las líneas que expresan E5 y control.** El TD se calculó en la fase exponencial de la curva de crecimiento celular. Los valores se presentan como media  $\pm$  SE, \*p < 0.05, #: p < 0.1 marginalmente significativo. n=2

Posteriormente se obtuvo la Densidad de Saturación, la cual corresponde al número de células/ml obtenidos en el día 8 de cada línea celular. Se observó que el control negativo (3T3) obtuvo el menor número de células al octavo día del experimento con una media de 1,124,925 cel/ml y el control positivo EWT2bis(+Ras) obtuvo 2,693,250 cel/ml, siendo la línea celular de mayor grado de proliferación con una diferencia significativa respecto al control negativo. En las líneas que expresan E5 se observó una disminución de la densidad de saturación respecto al control positivo, EGNE5(E5) disminuyó 31% y WTE53(E5+Ras) un 47%, observándose una tendencia a la disminución en la DS en presencia del oncogén E5 (Fig. 9).



**Figura 9: Densidad de Saturación (DS) de las líneas que expresan E5 y control.** La DS corresponde al número de cel/ml obtenido al día 8 en cada línea celular. Los valores se presentan como media  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , #:  $p < 0.1$  marginalmente significativo.  $n=2$

De acuerdo con los datos obtenidos a partir de las curvas de proliferación, la línea 3T3 (control negativo) es la de menor ritmo de crecimiento, lo cual corresponde con una línea celular inmortalizada no transformada, mientras que la línea EWT2bis (+Ras) es la de mayor ritmo de proliferación (control positivo). De interés fue observar las líneas que expresan E5, en la línea celular WTE53 (E5+Ras), que expresa ambos oncogenes, no se ve aumentado el ritmo de crecimiento respecto al control positivo, el cual solo expresa el oncogén +Ras (EWT2bis). La cinética de proliferación de WTE53 (E5+Ras) respecto a EGNE5 (E5) se comportó de forma muy similar, estos resultados sugieren un posible papel modulador de E5 (Fig.10).

## Curva de Proliferación

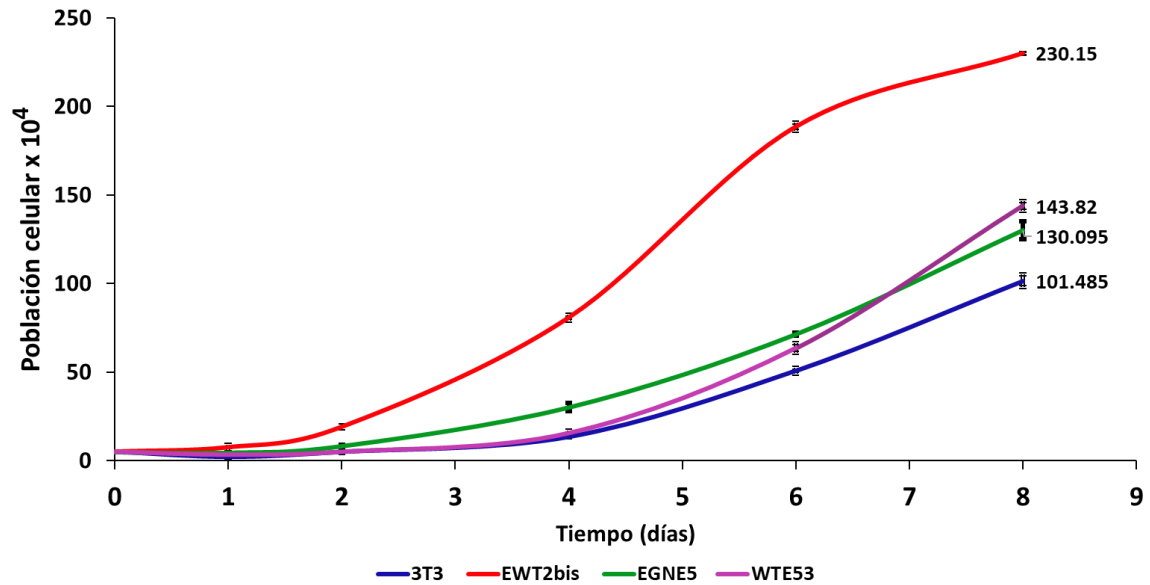
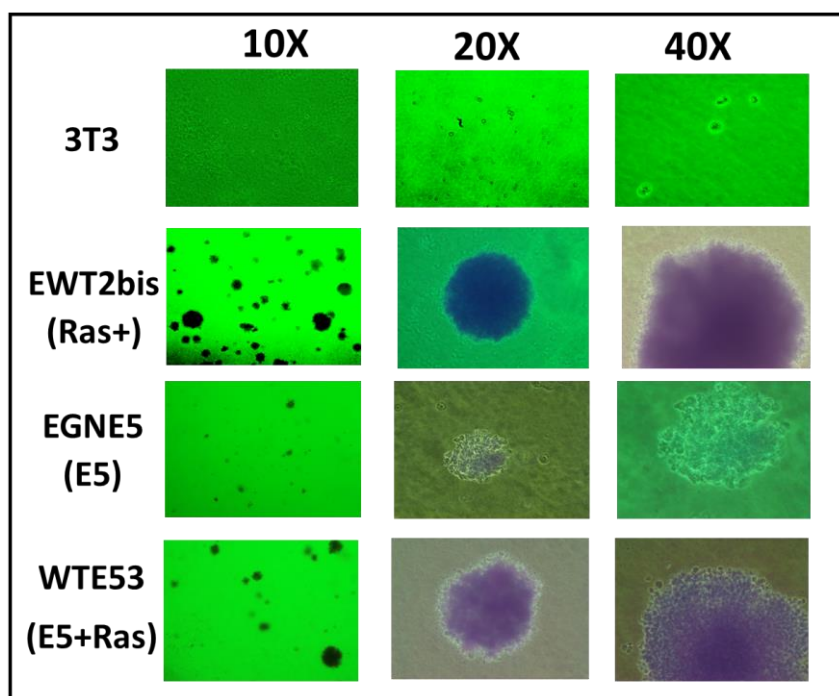


Figura 10. Curvas de proliferación de las líneas celulares que expresan E5 y control. Las líneas celulares EGNE5, WTE53 y controles 3T3 y EWT2bis se sembraron a una dilución de  $5 \times 10^4$  cel/caja p35 por duplicado y se contaron a los tiempos 1, 2, 4, 6 y 8 días por duplicado cada punto. Las curvas fueron realizadas con al menos 2 repeticiones. La densidad de saturación por cada línea celular está marcada al final de cada curva. Los valores se presentan como media  $\pm$  SE. n=2

### 7.1.3 Determinación de grado de transformación por medio de crecimiento independiente de anclaje.

Se evaluó el grado de transformación celular por medio del ensayo de agar suave, en las líneas que expresan E5 (EGNE5 y WTE53 (E5+Ras)) utilizando las líneas 3T3 (no transformada) y la línea EWT2bis (transformada) como controles negativo y positivo, respectivamente. El ensayo se realizó por duplicado para cada línea; se tomaron los valores del ensayo representativo. Se incubó por 19 días a  $37^{\circ}$  C en una cámara húmeda, se tiñeron con cristal de violeta, para finalmente cuantificar el número de colonias y tomar microfotografías, lo que nos permitió calcular el grado de crecimiento independiente del anclaje (Fig. 11).



**Figura 11: Microfotografías de la formación de colonias en agar de las líneas celulares que expresan E5 de HPV16.** Las líneas celulares EGNE5 y WTE53 que expresan E5 de HPV16 y las células control 3T3 y EWT2bis fueron sembradas a una dilución de  $5 \times 10^4$  cel/caja p35 y se dejaron en incubación por 19 días a  $37^\circ \text{C}$  con humedad y en atmósfera de  $5\% \text{CO}_2$ . Las colonias fueron teñidas con  $0.0025\%$  de cristal violeta para su observación y conteo bajo el microscopio (con tinción). Las microfotografías fueron tomadas bajo el microscopio invertido Nikon ECLIPSE TS100 a una magnificación de 10X, 20X y 40X respectivamente. n=2

Al realizar el conteo de colonias en agar suave, el control positivo EWT2bis (+Ras) generó el mayor número de colonias con 2,800 en la concentración de  $5 \times 10^4$  cel/ml. En cambio, las células EGNE5 (E5) formaron solo 678 colonias y las WTE53 (E5+Ras) formaron un total de 1,400 colonias, disminuyendo el número de colonias en un 79% y 35%, respectivamente, comparado con el control positivo EWT2bis (+Ras). Al comparar las células que expresan E5, observamos que las células EGNE5(E5) son las menos transformadas y las WTE53 (E5+Ras) a pesar de expresar dos oncogenes, mantuvieron un grado de transformación inferior a las EWT2bis(+Ras), las cuales solo expresan el oncogén +Ras. Las células 3T3 no formaron colonias en ninguno de los ensayos, ni en las diferentes diluciones en las que fueron sembradas ( $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^2$ ) (Fig.12).

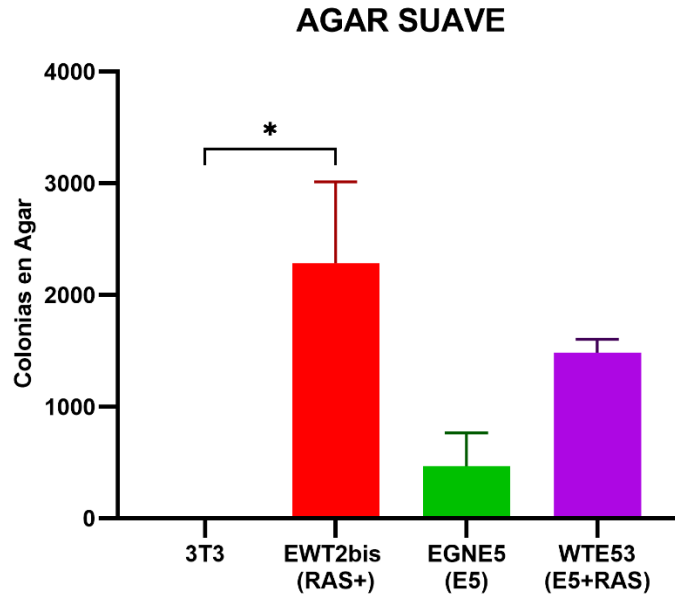


Figura 12: Número de colonias en agar suave en líneas que expresan E5 y control. Se realizó el conteo de colonias en agar suave en la dilución  $5 \times 10^4$ . Los valores se presentan como media  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , #:  $p < 0.1$  marginalmente significativo.  $n=2$

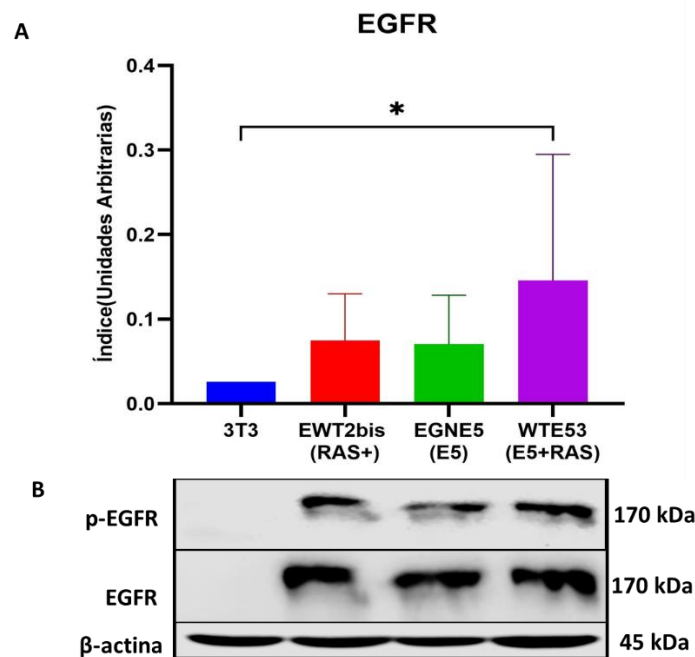
## 7.2. Modulación del proceso de proliferación celular por E5 de HPV16

### 7.2.1 Regulación de la proliferación celular por E5 de HPV16 en la cascada MAP-K

Evaluamos el comportamiento de las proteínas involucradas en la vía de señalización MAP-K en cuatro líneas celulares: 3T3 (control negativo), EWT2bis(+RAS), EGNE5(+E5) y WTE53(E5+Ras), mediante Western blot. Los experimentos se realizaron por duplicado y los datos obtenidos por quimioluminiscencia fueron analizados en el equipo Odyssey (LI-COR). Los datos fueron normalizados respecto a las bandas correspondientes de beta-actina en cada membrana. Posteriormente, se realizó un análisis descriptivo mediante gráficos de barras y un análisis estadístico para evaluar diferencias significativas entre grupos.

Iniciando el análisis en la cascada de señalización, se evaluó el receptor de EGF fosforilado en la Tyr (1068) y su forma total, calculándose el índice de fosforilación. El valor más alto se obtuvo en la línea celular que co-expresa Ras y E5 (WTE53 = 0.14) con diferencia estadísticamente significativa respecto al

control negativo 3T3. En contraste, las líneas celulares EWT2bis(+Ras) y EGNE5(E5) mostraron índices de fosforilación similares, de 0.074 y 0.07, respectivamente. Estos hallazgos sugieren un efecto sinérgico de ambas oncoproteínas, debido a que la línea WTE53(E5+Ras) presenta aproximadamente el doble del índice de fosforilación que las líneas que expresan de forma individual E5 o +Ras (Fig.13).

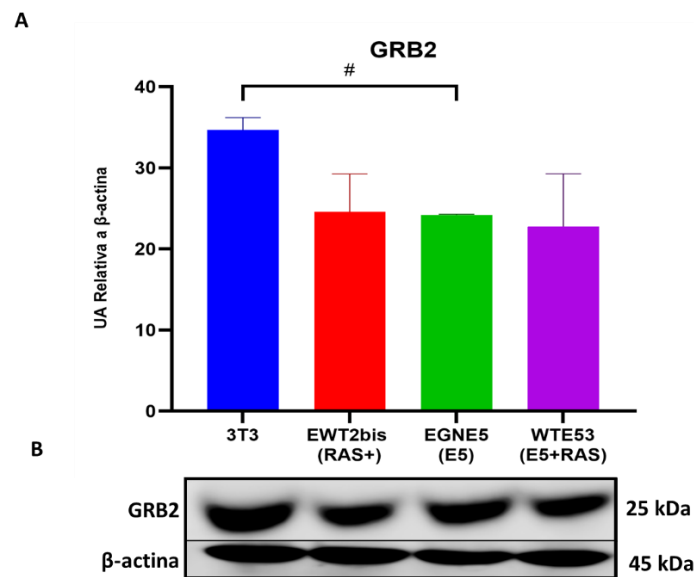


**Figura13. Comparación de la expresión de la proteína p-EGFR/EGFR.**

A) Las líneas celulares de fibroblastos de ratón: 3T3 (control), EWT2bis (Ras<sup>+</sup>), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) fueron analizadas por Western blot la presencia del receptor de EGF total y fosforilado en su estado estacionario: Actina fue utilizada para normalizar el sistema. B) La intensidad de las bandas del Western blot de EGFR y pEGFR fue obtenida en píxeles a partir del análisis en el equipo Odyssey. El índice de estimulación del EGFR fue calculado por medio de dividir la intensidad de la banda fosforilada vs. la banda del EGFR total. La gráfica de barras muestra el promedio de dos experimentos. Los valores se presentan como media  $\pm$  SE, \*p < 0.05. n=2

La siguiente proteína de la cascada a analizar en las diferentes líneas celulares fue GRB2, que es un adaptador clave en la transducción de señales en la cascada MAP-K. Al analizar las bandas de GRB2 del Western blot se observó que los niveles de esta proteína fueron similares en las líneas EWT2bis(+Ras), EGNE5(E5) y WTE53 (E5+Ras) con 24.5, 24.1 y 22.7 UA respectivamente, siendo estos valores menores que lo observado en la línea control 3T3 (34.5). Se observaron diferencias marginalmente significativas entre la línea control

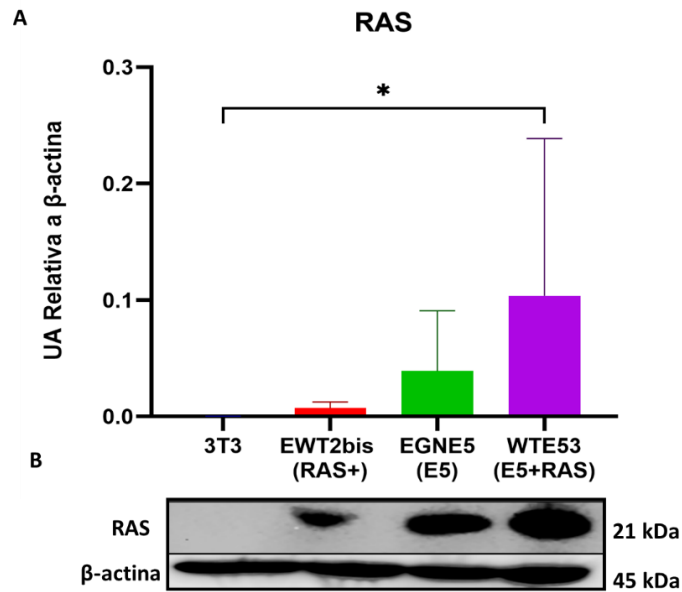
negativa 3T3 y EGNE5 (E5), lo cual sugiere que la presencia del oncogén E5 está modulando la expresión de la proteína adaptadora (Fig.14).



**Figura 14. Niveles de expresión de la proteína GRB2 en líneas celulares que expresan E5 y RAS.**

A) Se evaluó la expresión de la proteína GRB2 por Western blot en su estado estacionario en cuatro líneas celulares de fibroblastos de ratón: 3T3 (control), EWT2bis (Ras<sup>+</sup>), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras). Beta-actina fue utilizada para normalizar el sistema. B) La gráfica de barras muestra la señal relativa de GRB2, normalizada contra  $\beta$ -actina, a partir de experimentos realizados por duplicado. Los valores se presentan como media  $\pm$  SE. \* $p < 0.05$ . n=2

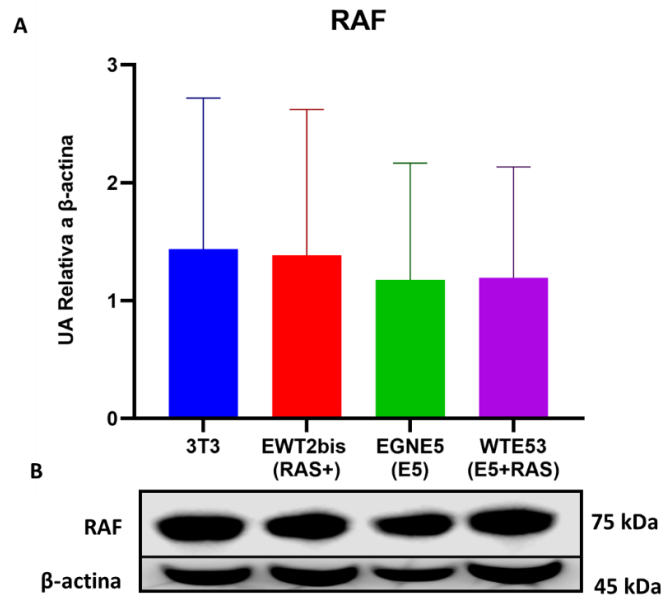
La siguiente proteína a analizar fue la proteína Ras, que es una GTPasa clave en la activación de la cascada de señalización de la vía MAP-K. Evaluamos la expresión de Ras total (endógeno + Ras (G12V y A59T)). Observamos escasa expresión de Ras en la línea 3T3 (control negativo) y una tendencia de mayor expresión de Ras en las líneas celulares que presentan mutaciones de Ras (G12V y A59T) llegando a observar estadística significativa entre las 3T3 y las WTE53 (E5+Ras). Respecto a EGNE5(E5) se observó una tendencia similar a EWT2bis(+RAS) a pesar de no contar con mutaciones de Ras, lo que sugiere un efecto estabilizador de E5 sobre RAS (Fig.15).



**Figura15. Detección de la proteína RAS en líneas celulares que expresan E5.**

A) La expresión de la proteína RAS fue analizada en cuatro líneas celulares de fibroblastos de ratón: 3T3 (control), EWT2bis (Ras<sup>+</sup>), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) por Western blot. Beta-actina fue utilizada para normalizar el sistema. B) La gráfica de barras muestra la señal relativa de RAS, normalizada contra  $\beta$ -actina, a partir de experimentos realizados por duplicado. Los valores se presentan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . n=2

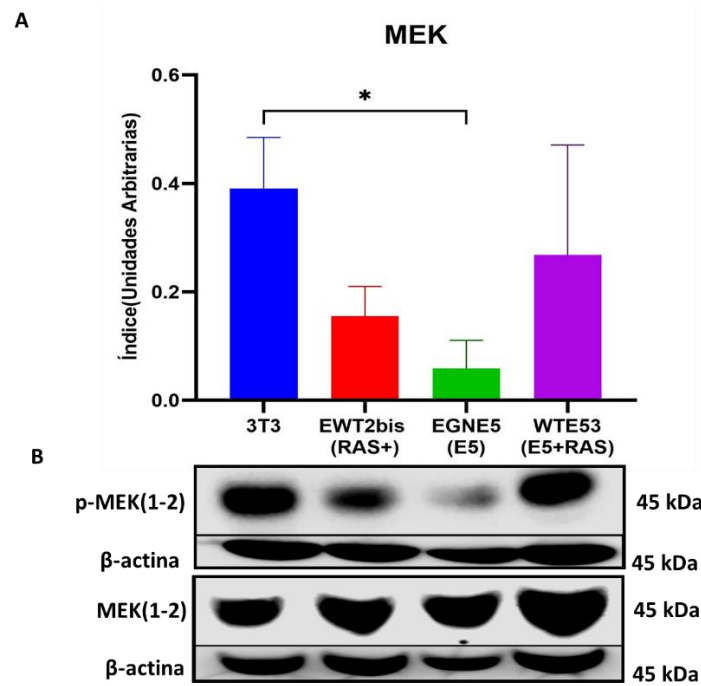
La siguiente proteína de la cascada de señalización es RAF, una cinasa de tipo serina/treonina que actúa como puente entre la activación de Ras y el resto de la cascada de señalización MAP-K. Evaluamos la expresión RAF total y observamos una tendencia a disminuir en las líneas que expresan el oncogén E5; EGNE5(E5) y WTE53(E5+Ras) con 1.17 y 1.19 UA, respectivamente, con respecto a las líneas control 3T3 y EWT2bis con valores de 1.43 y 1.38 UA, respectivamente (Fig.16).



**Figura16. Expresión de la proteína RAF en líneas celulares que expresan E5.**

A) La expresión de la proteína RAF se analizó en cuatro líneas celulares de fibroblastos de ratón: 3T3 (control), EWT2bis (Ras<sup>+</sup>), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) en su estado estable por Western blot. B) La gráfica de barras muestra la señal relativa de RAF, normalizada contra  $\beta$ -actina, a partir de experimentos realizados por duplicado. Los valores se presentan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . n=2

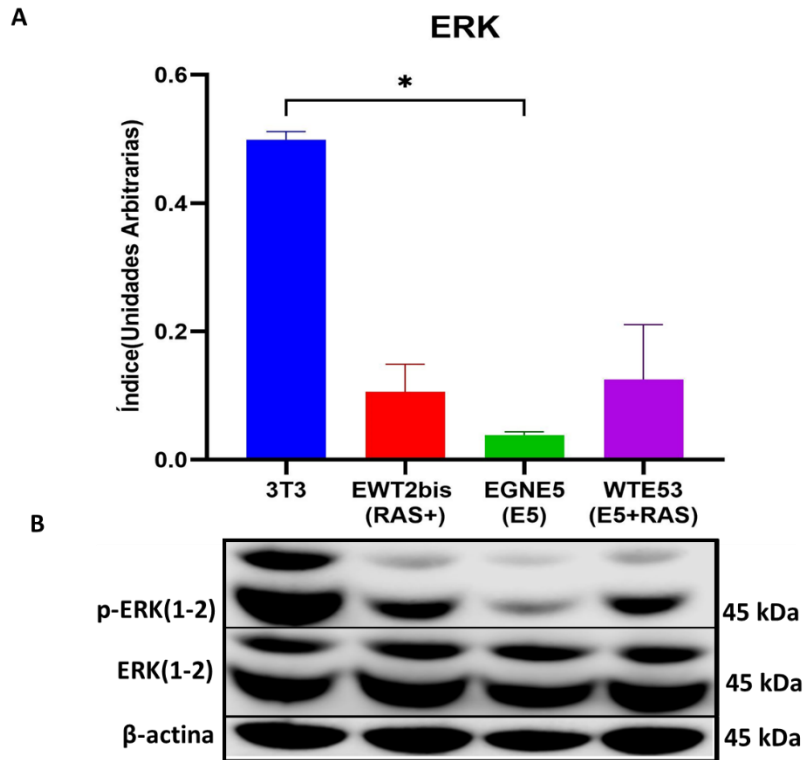
La siguiente proteína en la cascada es MEK, la cual es fosforilada y activada por RAF; luego MEK fosforila y activa a ERK, por lo que su activación es esencial para el paso de transducción de señales al núcleo para estimular el ciclo celular. Al analizar los resultados del Western blot para MEK se observó que el índice de fosforilación tuvo la mayor disminución en las células que expresan RAS y E5 por separado (0.15 y 0.058 UA, respectivamente), siendo las diferencias entre el control negativo 3T3 y EGNE5 (E5) estadísticamente significativas, sin embargo, este índice se recuperó o no disminuyó en gran proporción en las células que expresan RAS+E5 (0.26 UA), esto con respecto a las células control 3T3 (0.39 UA) (Fig. 17).



**Figura17. Comparación de la expresión de la proteína p-MEK/MEK**

A) La expresión de la proteína p-MEK/MEK en cuatro líneas celulares de fibroblastos de ratón: 3T3 (control), EWT2bis (Ras<sup>+</sup>), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) fue evaluada por Western blot. B) La gráfica de barras muestra el índice de activación (Unidades Arbitrarias) de MEK, normalizado contra β-actina, a partir de experimentos realizados por duplicado. Los valores se presentan como media ± SEM. \*p < 0.05. n=2

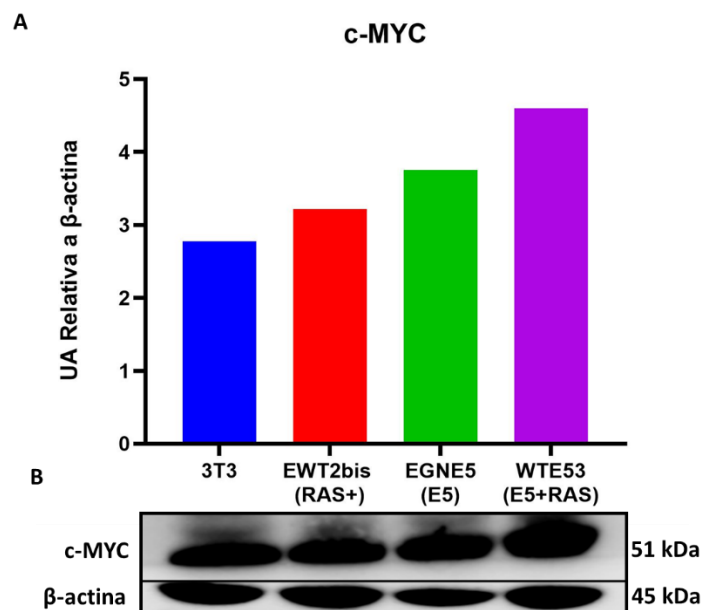
La proteína ERK es la última cinasa de la cascada MAP-K. Una vez activada, se transloca al núcleo, donde fosforila diversos factores de transcripción. En nuestro ensayo, las células no transformadas (3T3) presentaron un índice de fosforilación de 0.49 UA. En contraste, las líneas celulares EWT2bis(+Ras), WTE53 (E5+Ras) y EGNE5(E5) mostraron una marcada disminución en este índice, con valores de 0.10, 0.03 y 0.12 UA, respectivamente. Esta reducción fue particularmente notable en la línea EGNE5 (E5), la cual presentó una disminución estadísticamente significativamente respecto al control negativo (3T3) (Fig.18).



**Figura18. Comparación de la expresión de la proteína p-ERK/ERK.**

A) La expresión de la proteína p-ERK/ERK en cuatro líneas celulares de fibroblastos de ratón: 3T3 (control), EWT2bis (Ras<sup>+</sup>), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) fue evaluada por Western blot. B) La gráfica de barras muestra el índice de activación (Unidades Arbitrarias) de ERK, normalizado contra β-actina, a partir de experimentos realizados por duplicado. Los valores se presentan como media ± SEM. \*p < 0.05. n=2

Por otra parte, la proteína MYC se encuentra estrechamente relacionada con la vía MAP-K, actuando como uno de los efectores transcripcionales claves que son fosforilados por ERK en residuos específicos (Ser 62) aumentando su estabilidad y capacidad transcripcional. ERK puede activar otros factores transcripcionales que inducen la expresión de c-MYC. En el ensayo de Western blot con las líneas celulares en estado estable se obtuvo un aumento de la expresión c-MYC en las líneas celulares oncogénicas: EWT2bis(+Ras), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) respecto a la línea control 3T3. El aumento de la expresión de c-Myc en las líneas que expresan E5 y/o Ras resulta interesante dado que hasta este punto se observaba una modulación a la baja de la vía MAP-K en estas líneas celulares (Fig.19).

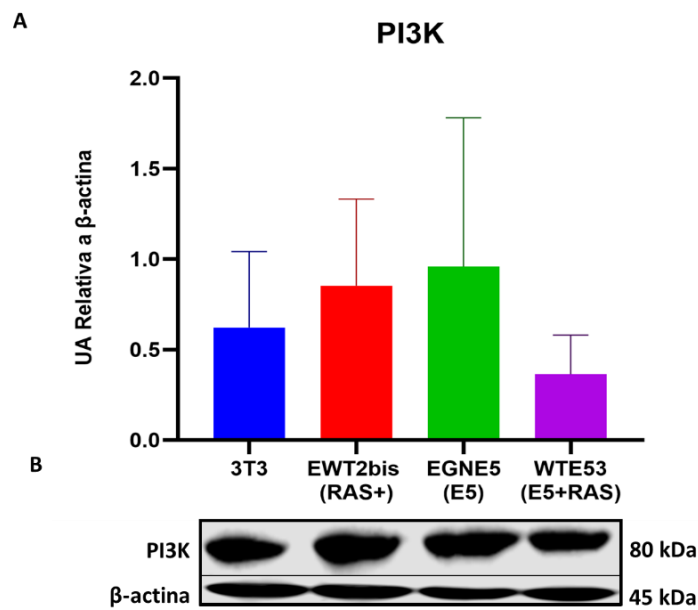


**Figura19. Comparación de la expresión del factor transcripcional c-MYC.**

A) La expresión de la proteína c-MYC se analizó en cuatro líneas celulares de fibroblastos de ratón: 3T3 (control), EWT2bis (Ras<sup>+</sup>), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) en su estado estable por Western blot. B) La gráfica de barras muestra la señal relativa de c-MYC, normalizada contra  $\beta$ -actina, a partir de experimentos realizados por duplicado. Los valores se presentan como media  $\pm$  SEM. \*p < 0.05. n=1

### 7.2.2 Influencia de E5 de HPV16 en la cascada PI3K/AKT y en otras proteínas que intervienen en el ciclo celular (p21, p27 y CALPAINA-2)

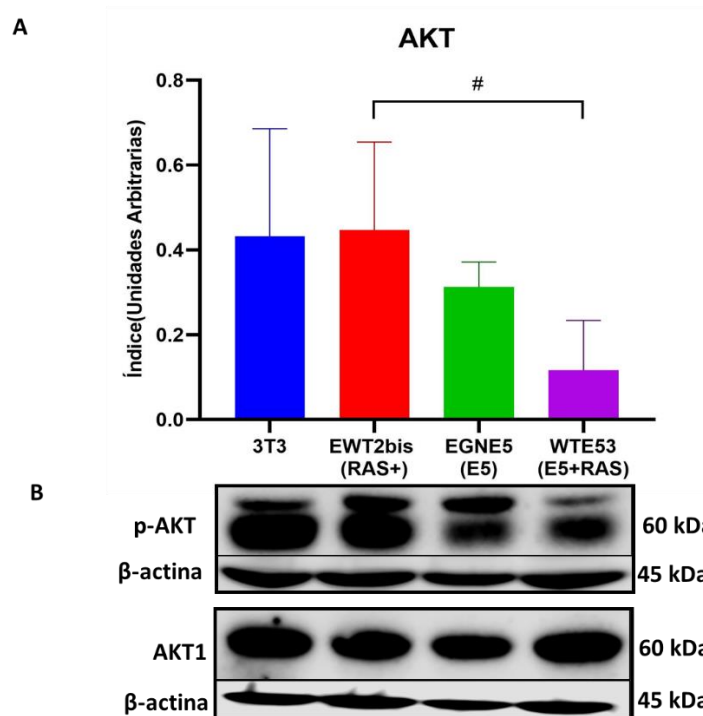
La proteína PI3K desempeña un papel fundamental al activar AKT de forma indirecta a través de la producción de PIP3, desencadenando funciones como la supervivencia celular, proliferación, metabolismo y diferenciación celular. En el ensayo realizado se observó un aumento relativo de la expresión de PI3K en las líneas EWT2bis (+Ras) y EGNE5 (E5) respecto al control negativo con valores de 0.8 y 0.9 UA respectivamente; inesperadamente en la línea celular WTE53 (E5+Ras) se observó una disminución de la expresión de PI3K con 0.3 UA respecto al resto de las líneas celulares (Fig.20).



**Figura20. Comparación de la expresión de la proteína PI3K.**

A) La expresión de la proteína PI3K se analizó en cuatro líneas celulares de fibroblastos de ratón: 3T3 (control), EWT2bis (Ras<sup>+</sup>), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) en su estado estable por Western blot. B) La gráfica de barras muestra la señal relativa de PI3K, normalizada contra  $\beta$ -actina, a partir de experimentos realizados por duplicado. Los valores se presentan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ .  $n=2$

La proteína AKT es fosforilada por PDK1 en el residuo Thr308, activándola parcialmente y luego es fosforilada por MTORC2 en el residuo Ser473 completando su activación. En el ensayo evaluamos la expresión total de AKT y su fosforilación en el residuo Ser473 y obtuvimos un índice de fosforilación disminuido en las líneas celulares que expresan el oncogén E5 (EGNE5 y WTE53) respecto a las líneas controles :3T3 (control), EWT2bis (+Ras); con 31.2% y 11.6% índice de fosforilación respectivamente, siendo más marcada la disminución en la línea que expresa ambos oncogenes: WTE53 (E5+Ras) dado que presenta una diferencia marginalmente significativa respecto al control positivo EWT2bis(+Ras) (Fig.21).

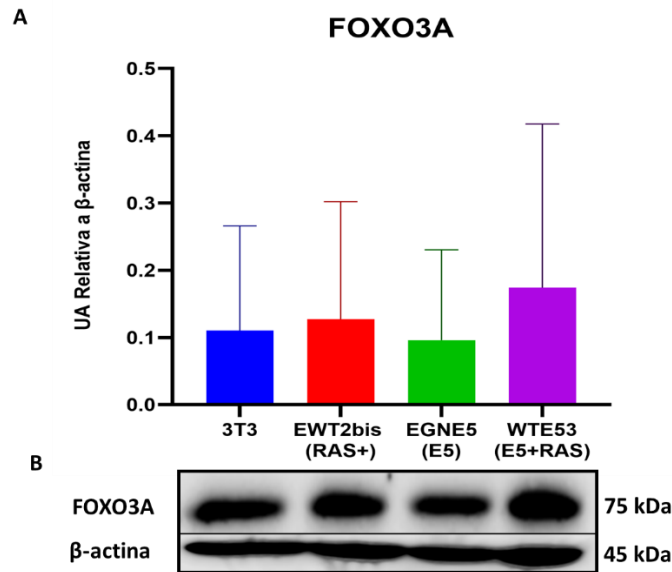


**Figura21. Comparación de la expresión de la proteína p-AKT/AKT.**

A) La expresión de la proteína p-AKT/AKT en cuatro líneas celulares de fibroblastos de ratón: 3T3 (control), EWT2bis (Ras<sup>+</sup>), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) fue evaluada por Western blot. B) La gráfica de barras muestra el índice de activación (Unidades Arbitrarias) de AKT, normalizada contra  $\beta$ -actina, a partir de experimentos realizados por duplicado. Los valores se presentan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . n=2

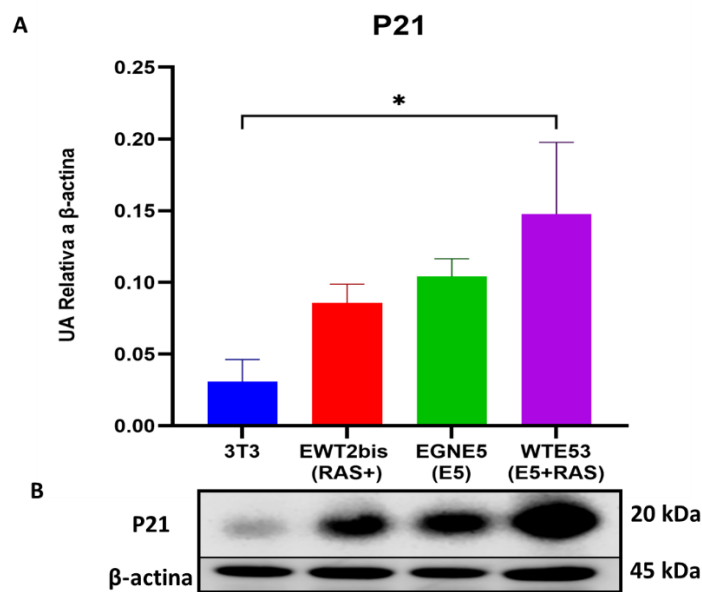
FOXO es un factor transcripcional que al ser fosforilado por AKT en residuos específicos (**Thr24**, **Ser256**, y **Ser319** en FOXO3) causa el secuestro de FOXO en el citoplasma. En condiciones de estrés celular o ausencia de señal de proliferación, AKT no se activa, lo que permite que FOXO3A se transloque al núcleo y se transcriban genes inhibidores del ciclo celular como p21 y p27.

En el ensayo realizado se observa una mayor expresión de FOXO3A en la línea celular WTE53 (E5+Ras), lo cual corresponde con su bajo índice de fosforilación en AKT (Fig. 22). Posteriormente evaluamos la expresión de p21 el cual es un gen regulador del ciclo celular inducido por FOXO3A y observamos un aumento escalonado en las líneas EWT2bis (+Ras), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) lo cual se corresponde con el índice de fosforilación observado en AKT y de expresión de FOXO3A (Fig. 23).



**Figura22. Comparación de la expresión de la proteína FOXO3A.**

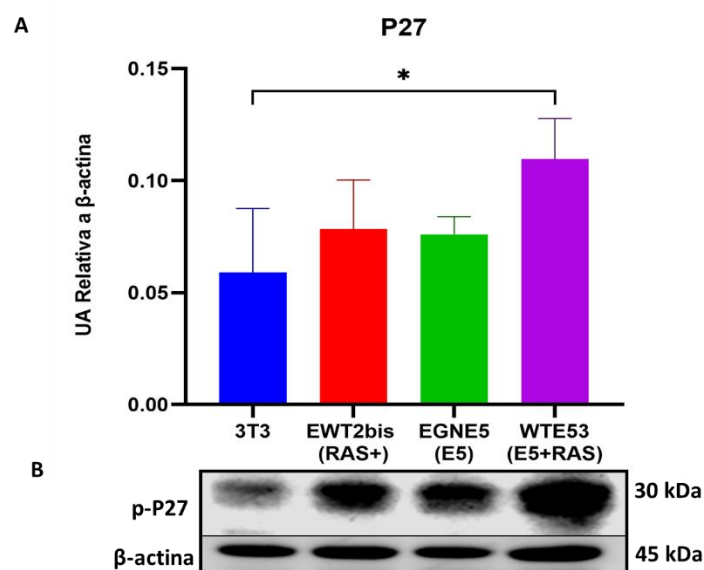
A) La expresión de la proteína FOXO3A se analizó en cuatro líneas celulares de fibroblastos de ratón: 3T3 (control), EWT2bis (Ras<sup>+</sup>), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) en su estado estable por Western blot. B) La gráfica de barras muestra la señal relativa de FOXO3A, normalizada contra β-actina, a partir de experimentos realizados por duplicado. Los valores se presentan como media ± SEM. \*p < 0.05. n=2



**Figura23. Comparación de la expresión de la proteína p21.**

A) La expresión de la proteína P21 se analizó en cuatro líneas celulares de fibroblastos de ratón: 3T3 (control), EWT2bis (Ras<sup>+</sup>), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) en su estado estable por Western blot. B) La gráfica de barras muestra la señal relativa de P21, normalizada contra β-actina, a partir de experimentos realizados por duplicado. Los valores se presentan como media ± SEM. \*p < 0.05. n=2

La proteína p27 es un inhibidor de quinasas dependiente de ciclina (CDK), la fosforilación de p27 en la tirosina 187 marca a la proteína para su degradación proteosomal, lo que favorece la proliferación celular descontrolada. En nuestro ensayo, se evaluó la expresión de p27 fosforilado en Tyr187 [p27(p-T187)], observándose un aumento en las líneas celulares que expresan los oncogenes E5 y/o RAS: EWT2bis (+Ras), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) respecto a la línea no oncogénica 3T3 (control negativo). Notablemente, la línea WTE53 (E5+Ras) mostró aproximadamente el doble de expresión de p27(p-T187) respecto a las 3T3 (control negativo) con valores estadísticamente significativos, lo que sugiere una mayor degradación proteosomal de p27. Estos resultados respaldan la implicación de esta vía en la proliferación y transformación celular observadas en nuestros cultivos de Agar Suave (Fig. 24).

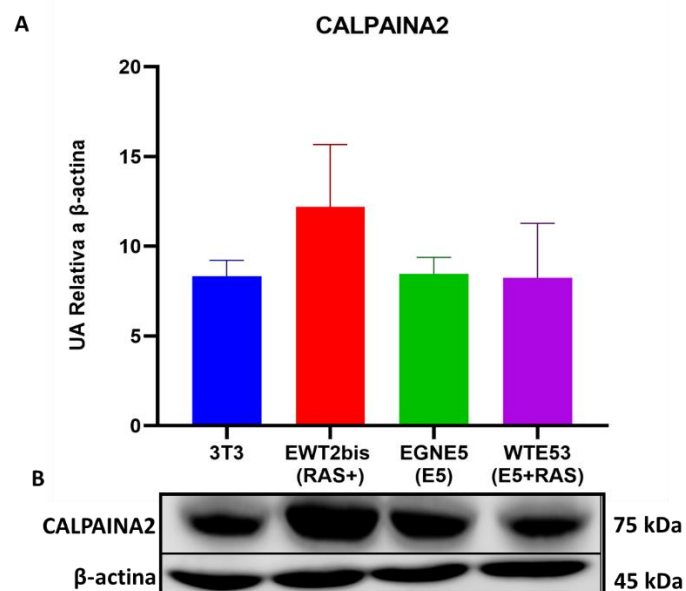


**Figura 24. Comparación de la expresión de la proteína p-p27.**

A) La expresión de la proteína P27 se analizó en cuatro líneas celulares de fibroblastos de ratón: 3T3 (control), EWT2bis (Ras<sup>+</sup>), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) en su estado estable por Western blot. B) La gráfica de barras muestra la señal relativa de P27, normalizada contra  $\beta$ -actina, a partir de experimentos realizados por duplicado. Los valores se presentan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . n=2

Finalmente, la proteína CALPAINA2, también conocida como CAPN2 es una proteasa heterodímera que pertenece a la familia de las calpaínas, que requiere iones de calcio para su activación. La CALPAINA2 se integra en

importantes cascadas de señalización como las vías ERK y PI3K/AKT; en nuestros ensayos observamos un aumento de su expresión en la línea celular EWT2bis (+RAS), en cambio, las líneas celulares que expresan el oncogén E5: EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) se comportaron de forma similar a las 3T3 (control negativo) (Fig. 25).



**Figura25. Comparación de la expresión de la proteína CALPAINA-2.**

A) La expresión de la proteína CALPAINA-2 se analizó en cuatro líneas celulares de fibroblastos de ratón: 3T3 (control), EWT2bis (Ras<sup>+</sup>), EGNE5 (E5) y WTE53 (E5+Ras) en su estado estable por Western blot. B) La gráfica de barras muestra la señal relativa de CALPAINA-2, normalizada contra  $\beta$ -actina, a partir de experimentos realizados por duplicado. Los valores se presentan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . n=2

## 8. Discusión

### 8.1 Grado de transformación celular de las líneas que expresan la oncoproteína E5 de HPV16.

Dentro de las funciones de la oncoproteína E5 de HPV 16 se ha observado que permite el reciclaje del EGFR, de ahí su estrecho vínculo con la cascada de señalización MAPK <sup>(24)</sup>. En este estudio identificamos los elementos de la cascada de señalización de EGFR/RAS/MAPK que están siendo modulados por la proteína E5. Inicialmente evaluamos si la expresión de los 3 genes E5/EGFR/RAS por separado y/o juntos inducen transformación en líneas celulares de ratón. Confirmamos la actividad transformante del control positivo de células que expresan +RAS/EGFR (EWT2bis) observado a través del reducido TD, la mayor Densidad de Saturación y un alto número de colonias en agar, lo cual corresponde con la sobre expresión del EGFR y las mutaciones activadoras (G12V y A59T) en RAS, estas últimas asociadas con actividad mitogénica y potencial transformante [Voice et al.,1999]. <sup>(32)</sup>

Sin embargo, células que expresan E5+Ras (WTE53) mostraron una disminución en la proliferación y una reducción del 35% en su poder transformante, en comparación con el control positivo (EWT2bis). En el caso de las células que expresan E5 (EGNE5), estas se comportaron similar a las 3T3 (control negativo), es decir, células que expresan solo E5 mostraron escasa transformación celular. La expresión de E5 no genero transformación significativa por si sola y en presencia de Ras se observó un comportamiento atípico ya que se esperaba que la presencia de dos oncogenes generara una sinergia y se incrementará la actividad transformante, sin embargo, lo que se observó fue una inhibición del proceso de transformación generado por Ras. Esto sugiere que, E5 de HPV16 está modulando negativamente la proliferación, lo cual se observó en las alteraciones en la cascada de señalización de las MAPKs en donde Ras está involucrada. Nuestros resultados coinciden con los publicados por Cardoso y colaboradores (2015), que demostraron que la activación de la vía MAPKs se encuentra atenuada en células de queratinocitos inmortalizadas HaCaT que expresan E5 de HPV16<sup>(7)</sup>.

## 8.2 Modulación del proceso de proliferación celular por E5 de HPV16.

### 8.2.1 Regulación de la cascada de MAPKs por E5 de HPV16.

Los resultados obtenidos muestran una regulación compleja y multifactorial de la cascada de MAPK en respuesta a la expresión de los oncogenes E5 y Ras. En primer lugar, observamos un aumento en la activación del EGFR en las líneas celulares que expresan E5 y/o Ras lo cual concuerda con múltiples reportes en la literatura que demuestran que E5 de HPV16 aumenta los niveles de EGFR en la superficie celular ( [Crusius et al., 1998](#) , [Pim et al., 1992](#) , [Straight et al., 1993](#) , [Tomakidi et al., 2000](#) )<sup>(33,34,35,36)</sup>. Lo novedoso en nuestros hallazgos fue encontrar que no solo existe un aumento en la expresión del receptor, sino que también aumenta su activación específicamente en la Tyr1068, la cual es la encargada del reclutamiento de GRB2 (Growth factor receptor-bond protein 2) para activar la vía de RAS-RAF y las MAPK <sup>(37)</sup>.

La proteína GRB2 es un adaptador intracelular esencial en la transducción de señales de la vía MAPK <sup>(38)</sup>. En nuestros ensayos se observó una reducción aproximada del 30% en los niveles de GRB2 en las líneas celulares EWT2bis(+Ras), EGNE5(E5) y WTE53 (E5+Ras) con respecto a las 3T3 (control negativo). Esto, a pesar de que se observó activación del EGFR en la Tyr1068 importante para la unión con GRB2. Se ha reportado que niveles bajos de esta proteína regulan negativamente a SOS-1, reduciendo así la señal de la cascada de RAS-MAPK (Zarich, et al., 2006) <sup>(39)</sup>.

"Goldilocks Principle": este concepto sugiere que debe haber un nivel preciso, "justo" de señalización oncogénica para una aptitud tumoral óptima; muy poca señalización no es suficiente para impulsar el cáncer, pero demasiada es perjudicial y desencadena senescencia. Este fenómeno de precisión se ve reflejado en nuestros experimentos. Las mutaciones en ciertos componentes de la misma vía suelen ser mutuamente excluyentes "Exclusividad mutua". Por ejemplo, las mutaciones de KRAS y BRAF rara vez coexisten en la misma

célula cancerosa, probablemente porque la sobreactivación de la vía RAF/MEK/ERK provoca senescencia o apoptosis, un mecanismo que impide la actividad concurrente de oncogenes en la misma vía <sup>(40)</sup>. Estos conceptos se ven reflejado en nuestro estudio con la disminución de los niveles GRB2 y el aumento de la expresión y la activación de EGFR.

El análisis de Ras evidenció que los niveles de expresión de esta proteína fueron mayores en las líneas que expresan E5, esto se observó incluso en la línea EGNE5 (E5), la cual no está transfectada con Ras mutante. También cabe resaltar que E5 podría estar favoreciendo un entorno intracelular que aumenta la expresión o estabilidad de Ras, posiblemente mediante la activación sostenida del EGFR. Dado que nuestro estudio carece de ensayos funcionales directos (por ejemplo, inhibición farmacológica, silenciamiento génico o análisis dinámicos de actividad enzimática) es necesario ensayos posteriores para corroborar nuestro análisis.

A partir del análisis de la vía de señalización MAPKs, observamos que en células que expresan solo E5(EGNE5), la expresión de RAF y la activación de MEK y ERK disminuyeron considerablemente en comparación con las células que expresan solo +Ras (EWT2bis). Este fenómeno sugiere que E5 interfiere negativamente en la señalización por debajo de RAS; lo cual puede estar dado por el desvío de la señal hacia otras vías como PI3K/AKT (sobrevida) o por mecanismos de retroalimentación negativa activados por la hiperestimulación de EGFR, lo que contribuiría a una menor eficiencia en la transmisión de la señal a lo largo de la cascada de MAPKs. Interesante fue observar que la actividad positiva de RAF-MEK-ERK se recupera completamente cuando se introduce Ras activado a las células WTE53 (E5+Ras), lo que sugiere que el bloqueo de la señal de E5 sobre la cascada está por encima de Ras. Este resultado es contradictorio con lo previamente reportado para papiloma de Rhesus (mono) en donde se demostró que E5 es un activador del Ras endógeno, esto en células 3T3 transfectadas con E5 (Ghai, et al., 1996) <sup>(41)</sup>. Sin

embargo, el efecto de E5 sobre Ras en el sistema de HPV no ha sido reportado previamente.

A pesar de la disminución de la actividad de la vía MAPK a partir de RAF en las células que expresan E5, se observó un aumento en la expresión de c-MYC, lo cual fue mayor en las células que expresan E5+Ras (WTE53). El incremento en los niveles de c-MYC en células que expresan E5 concuerda con el nivel de transformación observado en estas líneas celulares; además, se sugiere que la regulación de c-MYC podría ocurrir de manera independiente de la vía MAPK. Es posible que E5 favorezca la estabilidad de la proteína c-MYC inhibiendo su degradación. Este patrón apunta a una regulación oncogénica compleja y multifactorial en el contexto de la transformación celular inducida por E5. Dada las limitaciones en el tamaño de muestra del ensayo es necesario más estudios para corroborar nuestro análisis

#### 8.2.2 Influencia de E5 de HPV16 en la cascada PI3K/AKT y en proteínas inhibitorias del ciclo celular (p21 y p27).

Los resultados obtenidos revelan que la expresión del oncogén E5 de HPV16 impacta significativamente en la cascada PI3K/AKT. Los datos obtenidos muestran que E5 y Ras por separado aumentan los niveles de PI3K y la actividad de AKT, aunque lo hace en menor proporción E5, lo cual es consistente con la activación esperada de esta vía en presencia de estos oncogenes; dado que E5 de HPV16 promueve la activación de EGFR, favoreciendo así la actividad de la vía PI3K/AKT y de esta forma la vía de supervivencia de las células y protección contra apoptosis como se ha reportado previamente (Zhang, et al., 2015) <sup>(42)</sup>. Por otro lado, EWT2bis (+Ras) puede inducir la expresión de PI3K indirectamente a través de c-MYC (aumentado en esta línea celular). Sin embargo, células que expresan E5+Ras (WTE53) mostraron una disminución de más del 50% de los niveles de PI3K y de la actividad de AKT, estos resultados podrían interpretarse con resultados de dos conceptos explicados anteriormente: Goldilocks Principle y Mutual Exclusivity; cuyo objetivo final es evitar la muerte celular.

Por otra parte, es posible también que E5 al inducir una sobre expresión de PI3K, pero con una reducida activación de AKT, podría estar favoreciendo la

activación de cinasas similares a AKT como SGK (Serum and Glucocorticoid-regulated Kinases) o factores transcripcionales como NF- $\kappa$ B que se ha reportado se encuentra aumentado en HPV16<sup>(43)</sup>, sin embargo, esto es una hipótesis que requiere ser estudiada en ensayos posteriores.

FOXO es un factor transcripcional que al ser fosforilado por AKT en residuos específicos (**Thr24**, **Ser256** y **Ser319** en FOXO3) <sup>(44,45,46)</sup> ocasiona que FOXO sea retenido en el citoplasma. En condiciones de estrés celular o ausencia de señales de proliferación, AKT no se activa, lo que permite que FOXO3A se transloque al núcleo, permitiendo la transcripción de genes inhibidores del ciclo celular como p21 y p27<sup>(47)</sup>.

En nuestro estudio se observó un aumento en la expresión total de FOXO3A en células que expresan E5+Ras (WTE53), que junto con el bajo índice de activación de AKT podría permitir una mayor proporción de FOXO3A activa, presumiblemente nuclear. Nuestros experimentos se realizaron en lisados celulares totales y, por lo tanto, no permiten determinar directamente la localización subcelular de FOXO3A. Sin embargo, dado que p21 es una diana transcripcional de FOXO3A, esta hipótesis se ve respaldada por los resultados obtenidos en donde la expresión de p21 se encuentra aumentada en las líneas celulares que expresan E5 y/o RAS, lo que nos da una medida indirecta de la actividad de FOXO3A en el núcleo. Sin embargo, esto debe ser corroborado por fraccionamiento celular.

En nuestro modelo celular observamos un aumento en los niveles de p21 junto con un aumento en la fosforilación de p27(p-T187), lo que sugiere un incremento en la degradación de esta proteína, ya que la fosforilación de la treonina 187 la marca para su degradación por la vía del complejo SCF-SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2), permitiendo así la progresión del ciclo celular (Wang, et al., 2008) <sup>(48)</sup>. Esta combinación sugiere un mecanismo de regulación dual del ciclo celular en respuesta a la activación oncogénica inducida por E5, RAS y su combinación. El aumento en la expresión de p27-Thr187, que favorece su degradación proteosomal, implica una remoción del freno del ciclo celular. La pérdida de p27 facilita la activación de los complejos Cyc D/CDK4-6 y CycE/CDK2, permitiendo la progresión de la fase G1 a S y

favoreciendo la proliferación celular descontrolada, característica del fenotipo transformado. La combinación de estos hallazgos indica que, aunque existe una señal de freno proliferativo a través del aumento de p21, las células compensan este efecto promoviendo la degradación de p27, lo cual permite mantener un fenotipo proliferativo. Este mecanismo puede ser clave en la transformación celular observada en nuestros ensayos de proliferación y crecimiento independiente del anclaje <sup>(49,50)</sup>

### 8.2.3 Influencia de E5 de HPV16 en el comportamiento de la CALPAINA-2

Posteriormente decidimos evaluar el comportamiento de la proteína CALPAINA-2 la cual pertenece a una familia de cisteína proteasa dependiente de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) <sup>(28)</sup>, esto debido a que E5 es una viroporina; y se ha reportado que las viroporinas pueden modular la entrada y salida de iones <sup>(10,51)</sup>. En nuestros ensayos se observó un aumento de la expresión de CALPAINA-2 en células que expresan solo +Ras (EWT2bis), mientras que las que expresan solo E5 presentaron niveles de CALPAINA-2 semejantes a lo observado en células 3T3 (control negativo). Dado que la activación sostenida de la CALPAINA-2 puede conducir a una proteólisis excesiva y apoptosis, es posible que E5, en su papel transformante module negativamente este sistema proteolítico para favorecer la supervivencia celular. Sin embargo, cuando se evaluaron los niveles de CALPAINA-2 en células que expresan E5+Ras (WTE53), se observó que los niveles de CALPAINA-2 se redujeron en un 30% comparados con las células que expresan solo +RAS(EWT2bis). Esto sugiere un efecto antagonista de E5 sobre cierta parte de la cascada de señalización de Ras, lo que indica una interacción compleja entre ambos oncogenes.

Nuestro estudio arrojó como resultado el complejo entramaje que desarrolla E5 de HPV16 en diferentes puntos críticos como la vía de señalización de MAPK, la vía PI3K-AKT, los reguladores del ciclo celular (p21 y p27) y la cisteína proteasa dependiente de calcio (CALPAINA-2) para evitar la muerte celular. E5 no debe entenderse como un oncogén transformante clásico, sino como un modulador contextual de la señalización oncogénica dependiente de EGFR capaz de potenciar o amortiguar el fenotipo transformado según el estado basal de la célula.

## 9. Conclusiones

### 9.1 E5 de HPV16 como modulador negativo de la proliferación celular

-Los resultados muestran que las líneas celulares que expresan E5 (EGNE5 y WTE53) presentan una disminución en la cinética de crecimiento y en el grado de transformación en ensayos de agar suave, en comparación con la línea EWT2bis que solo expresa el oncogén Ras.

### 9.2 Modulación del receptor EGFR y su impacto en la cascada MAPK

-La oncoproteína E5 de HPV16 modula la señalización del EGFR y altera el equilibrio de la cascada MAPK, promoviendo proliferación celular y transformación parcial, aunque con efectos compensatorios y no lineales en presencia de RAS.

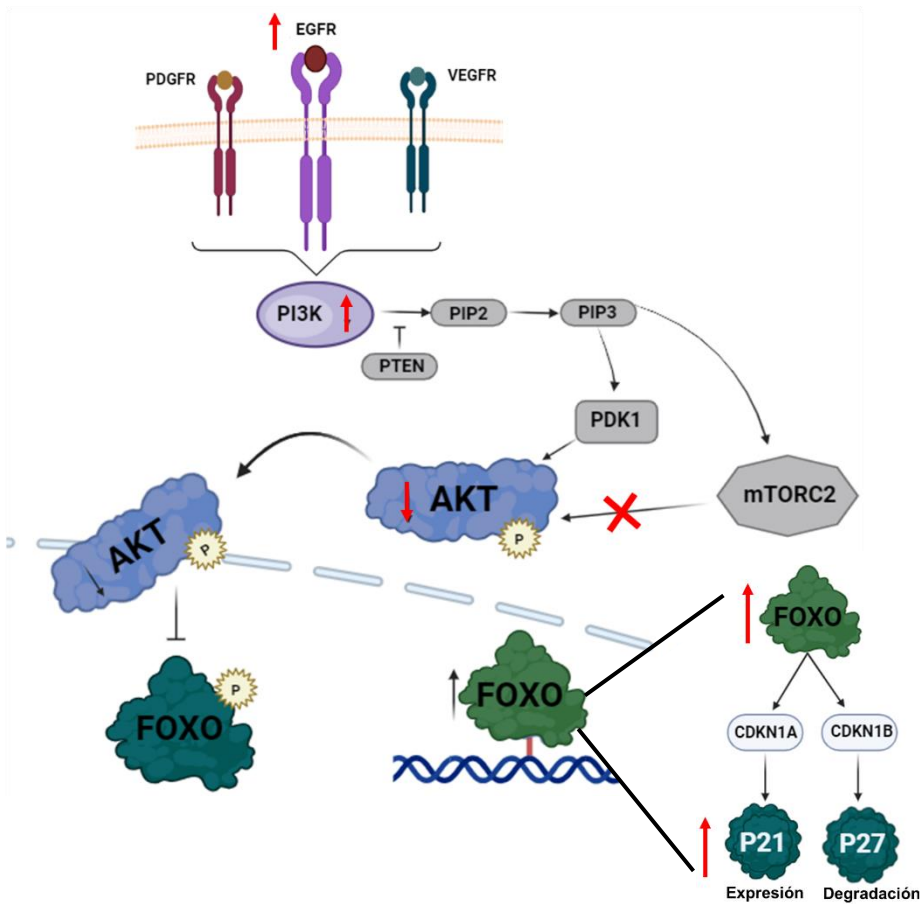
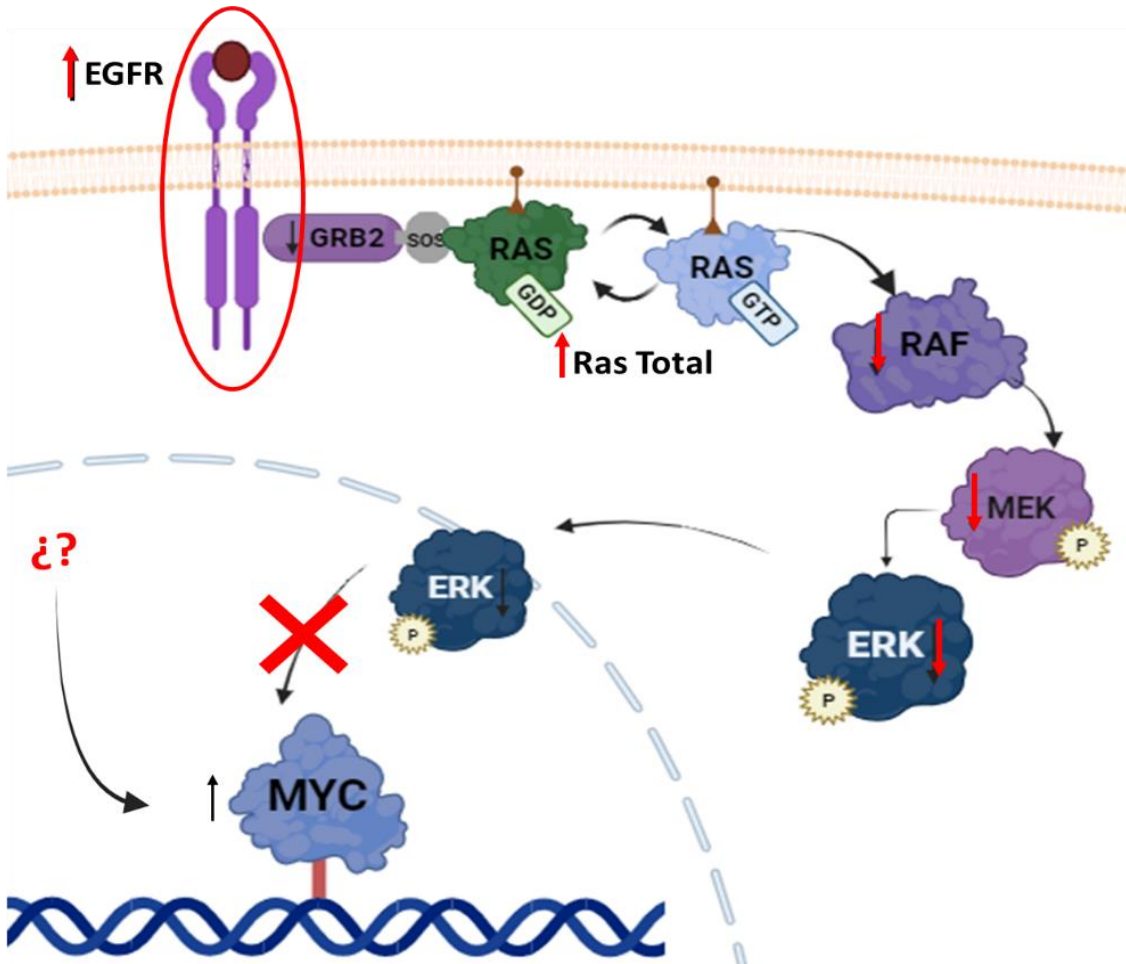
### 9.3 E5 de HPV16 en la cascada PI3K/AKT

-E5 de HPV16 induce un aumento en la expresión de PI3K, pero no se traduce en una activación efectiva de AKT, sugiriendo una modulación parcial de la vía PI3K/AKT y la posible activación de rutas alternativas como SGK o NF- $\kappa$ B.

-E5 de HPV16 promueve la acumulación de FOXO3A y la expresión de p21, lo que sugiere activación de mecanismos de control del ciclo celular; sin embargo, también favorece la fosforilación y degradación de p27, contribuyendo al desequilibrio proliferativo en células transformadas.

### 9.4 E5 de HPV16 y el comportamiento de la CALPAINA-2

-La expresión de E5 de HPV16 no induce un aumento en los niveles de calpaina-2, lo que sugiere que esta oncoproteína no activa rutas dependientes de proteólisis mediada por calpaina, a diferencia de Ras, que sí promueve su expresión.



## 10. Limitaciones y Perspectivas del Estudio

El presente estudio presenta limitaciones que deben considerarse al interpretar los resultados. Los análisis realizados se basan principalmente en la evolución de cambios en niveles de expresión y fosforilación proteica, lo que nos permitió identificar asociaciones y tendencias relacionadas con la presencia de E5 en HPV16.

EL número de réplicas experimentales representan una limitación estadística, dado que nuestro trabajo corresponde a un estudio de carácter preliminar y exploratorio, debido a las restricciones de tiempo para su desarrollo, no fue posible realizar un mayor número de repeticiones en todos los experimentos, algunos resultados presentan valor de significancia marginal ( $p < 0.1$ ), los cuales siguieren tendencias, pero no son concluyentes.

Dado nuestras limitaciones en el estudio dentro de las perspectivas futuras de nuestro trabajo se incluyen la realización de estudios con un mayor tamaño muestral, con el fin de confirmar y fortalecer las tendencias observadas. Asimismo, será necesario incorporar aproximaciones experimentales funcionales, tales como la inhibición farmacológica, el silenciamiento génico o el análisis dinámico de la actividad enzimática, que permita evaluar de manera directa el impacto biológico de E5 en HPV16 y profundizar en los posibles mecanismos moleculares involucrados. Estas estrategias contribuirán a validar y ampliar los hallazgos aquí descritos, fortaleciendo su valor estadístico y biológico.

## 11. Bibliografía

1. Global Cancer Observatory [Internet]. *larc.fr*. 2020. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/>
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 2018 Sep 12;68(6):394–424. Disponible en: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21492>
3. Bray F. Trends in Cervical Squamous Cell Carcinoma Incidence in 13 European Countries: Changing Risk and the Effects of Screening. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2005 Mar 1;14(3):677–86. Disponible en: <https://aacrjournals.org/cebpa/article/14/3/677/169576/Trends-in-Cervical-Squamous-Cell-Carcinoma>
4. Skelin J, Sabol I, Tomaić V. Do or Die: HPV E5, E6 and E7 in Cell Death Evasion. *Pathogens*. 2022 Sep 1;11(9):1027. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/9/1027>
5. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina* [Internet]. 2019 Jul 17;55(7):384. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6681523/pdf/medicina-55-00384.pdf>
6. Small W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*. 2017 May 2;123(13):2404–12. Disponible en: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.30667>
7. Cardoso Jaime, V. M. J. (2015). Análisis de los efectos de la expresión de E5 de VPH-16 sobre las vías de señalización involucradas en los procesos de auto-renovación y diferenciación de queratinocitos inmortalizados HaCaT (Tesis de Maestría). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, Departamento de Genética y Biología Molecular. <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/2416/SSIT0013539.pdf?sequence=1>
8. Scarth JA, Patterson MR, Morgan EL, Macdonald A. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. *Journal of General Virology*. 2021 Mar 1;102(3).
9. DiMaio D, Petti LM. The E5 proteins. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):99–114.
10. Wetherill LF, Holmes KK, Verow M, Muller M, Howell G, Harris M, et al. High-Risk Human Papillomavirus E5 Oncoprotein Displays Channel-Forming Activity Sensitive to Small-Molecule Inhibitors. *Journal of Virology*. 2012 Feb 22;86(9):5341–51.
11. Bhattacharjee R, Das SS, Biswal SS, Nath A, Das D, Basu A, et al. Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2022 Jun;174:103675.
12. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*. 2015 Mar;25(1):2–23.

13. Breitinger U, Farag NS, Sticht H, Breitinger HG. Viroporins: Structure, function, and their role in the life cycle of SARS-CoV-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2022 Apr;145:106185. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2022.106185>
14. Purpura V, Belleudi F, Caputo S, Torrisi MR. HPV16 E5 and KGFR/FGFR2b interplay in differentiating epithelial cells. *Oncotarget*. 2013 Feb 22;4(2):192–205.
15. Kim SH ., Oh JM ., No JH ., Bang YJ ., Juhnn YS ., Song YS . Involvement of NF- B and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis*. 2009 Mar 25;30(5):753–7.
16. Wasson CW, Morgan EL, Müller M, Ross RL, Hartley M, Roberts S, et al. Human papillomavirus type 18 E5 oncogene supports cell cycle progression and impairs epithelial differentiation by modulating growth factor receptor signalling during the virus life cycle. *Oncotarget*. 2017 Oct 6;8(61):103581–600.
17. Arlhee Díaz, Lage A. Terapias con inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico: acercando el futuro. *Biotecnología Aplicada*. 2007 Jan 1;24(1):1–18.
18. Jin Y, Ha N, Forés M, Xiang J, Gläßer C, Maldera J, et al. EGFR/Ras Signaling Controls Drosophila Intestinal Stem Cell Proliferation via Capicua-Regulated Genes. Clurman BE, editor. *PLOS Genetics*. 2015 Dec 18;11(12):e1005634. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1005634>
19. Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu II, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Dec 26;22(1):173.
20. Revista, De Cancerología. Contribución de la vía PI3k/Akt-PTEN y sus blancos corriente abajo en iniciación y progresión de glioblastoma multiforme. 2004;8(3):28–38. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcc/v8n3/v8n3a05.pdf>
21. Follo MY, Manzoli L, Poli A, McCubrey JA, Cocco L. PLC and PI3K/Akt/mTOR signalling in disease and cancer. *Advances in Biological Regulation*. 2015 Jan;57:10–6.
22. Gutiérrez-Hoya A, Soto-Cruz I. Role of the JAK/STAT Pathway in Cervical Cancer: Its Relationship with HPV E6/E7 Oncoproteins. *Cells*. 2020 Oct 15;9(10):2297.
23. Álvarez LMorales, Ariza M. Eventos de señalización asociados al Factor de Crecimiento Derivados de Plaquetas (PDGF) al . 2005.
24. Ilahi NE, Bhatti A. Impact of HPV E5 on viral life cycle via EGFR signaling. *Microbial Pathogenesis*. 2020 Feb;139:103923.
25. Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2015 May 1;1849(5):506–16. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187493991400073X>
26. Dang Chi V. MYC on the Path to Cancer. *Cell*. 2012 Mar [cited 2019 Nov 12];149(1):22–35. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3345192/>

27. Farrell AS, Sears RC. MYC Degradation. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2014 Mar 1;4(3):a014365–5. Disponible en: <https://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/4/3/a014365.long>
28. Shapovalov I, Harper D, Greer PA. Calpain as a therapeutic target in cancer. Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2022 Mar 4;26(3):217–31. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/14728222.2022.2047178>
29. Cristian Prieto-Garcia, Tomašković I, Varun Jayeshkumar Shah, Dikic I, Diefenbacher ME. USP28: Oncogene or Tumor Suppressor? A Unifying Paradigm for Squamous Cell Carcinoma. 2021 Oct 4;10(10):2652–2. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/10/2652> )
30. Alameda F, Baro T, Mariñoso ML, et al. Carcinoma escamoso invasor de cérvix uterino. Estudio de la expresión de p53, BCL-2, Ki-67, C-MYC y ciclina D1. Rev Mex Patol Clin Med Lab. 2007;54(4):150-158.
31. Ocampo EA, Arregui Mena AL, González de la Rosa CH. Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular II. 2016 May 11
32. Voice JK, Klemke RL, Le A, Jackson JH. Four human Ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. J Biol Chem. 1999 Jun 11;274(24):17164–70. doi:10.1074/jbc.274.24.17164
33. Crusius K, Auvinen E, Steuer B, Gaissert H, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. Exp Cell Res. 1998 May 25;241(1):76-83. DOI: [10.1006/excr.1998.4024](https://doi.org/10.1006/excr.1998.4024). PMID: 9633515.
34. Pim D, Collins M, Banks L. El gen E5 del virus del papiloma humano tipo 16 estimula la actividad transformante del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Oncogene. Enero de 1992;7(1):27-32. PMID: 1311063.
35. Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. J Virol. 1993;67(8):4521–32. doi: [10.1128/jvi.67.8.4521-4532.1993](https://doi.org/10.1128/jvi.67.8.4521-4532.1993)
36. Tomakidi P, Cheng H, Kohl A, Komposch G, Alonso A. Modulation of the epidermal growth factor receptor by the human papillomavirus type 16 E5 protein in raft cultures of human keratinocytes. Eur J Cell Biol. 2000;79(6):407–12. DOI: [10.1078/0171-9335-00060](https://doi.org/10.1078/0171-9335-00060)
37. Bishayee A, Beguinot L, Bishayee S. Phosphorylation of tyrosine 992, 1068, and 1086 is required for conformational change of the human epidermal growth factor receptor C-terminal tail. Mol Biol Cell. 1999 Mar;10(3):525–36. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.3.525> PMID: 10069801.
38. Erdreich-Epstein A, Liu M, Kant AM, Izadi KD, Nolta JA, Durden DL. GRB2: a pivotal protein in signal transduction. Med Oncol. 2001;18(4):249–57. doi:10.1016/s0093-7754(01)90291-x. [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)
39. Zarich N, Oliva JL, Martínez N, Jorge R, Ballester A, Gutiérrez-Eisman S, et al. Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1. Mol Biol Cell. 2006 Aug;17(8):3591–7. doi: [10.1091/mbc.E05-12-1104](https://doi.org/10.1091/mbc.E05-12-1104)
40. Cisowski, J., & Bergo, M. O. (2017). What makes oncogenes mutually exclusive?. Small GTPases, 8(3), 187–192. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1212689>

41. Ghai J, Ostrow RS, Tolar J, McGlennen RC, Lemke TD, Tobolt D, et al. The E5 gene product of rhesus papillomavirus is an activator of endogenous Ras and phosphatidylinositol-3'-kinase in NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 12;93(23):12879–84. doi:10.1073/pnas.93.23.12879.
42. Zhang L, Wu J, Ling MT, Zhao L, Zhao KN. The role of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in human cancers induced by infection with human papillomaviruses. *Mol Cancer*. 2015 Apr 17;14:87. doi:10.1186/s12943-015-0361-x
43. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol*. 2001 May;75(9):4283–96. doi:10.1128/JVI.75.9.4283-4296.2001
44. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96(6):857–68. doi:10.1016/s0092-8674(00)80595-4.
45. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*. 2005;24(50):7410–25. doi:10.1038/sj.onc.1209086.
46. Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 15):2479–87. doi:10.1242/jcs.001222.
47. Stahl M, Dijkers PF, Kops GJ, Lens SM, Coffey PJ, Burgering BM, et al. The forkhead transcription factor FOXO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol*. 2002;168(10):5024–31. doi:10.4049/jimmunol.168.10.5024.
48. Wang, Q., Zhou, Y., Wang, X. et al. p27<sup>Kip1</sup> nuclear localization and cyclin-dependent kinase inhibitory activity are regulated by glycogen synthase kinase-3 in human colon cancer cells. *Cell Death Differ* 15, 908–919 (2008). <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.2>
49. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999;13(12):1501–12. doi:10.1101/gad.13.12.1501
50. Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*. 1999;1(4):193–9. doi:10.1038/12013
51. Breiting U, Farag NS, Sticht H, Breiting HG. Viroporins: Structure, function, and their role in the life cycle of SARS-CoV-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2022 Apr;145:106185. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2022.106185>



Cuernavaca, Morelos, 20 de enero de 2026.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo  
Director de la Facultad de Medicina

Presente

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **Caracterización de la cascada de señalización que utiliza la oncoproteína E5 de HPV16, el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y Ras durante el proceso de transformación celular**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Lisandra Gómez Mata. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. **Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

#### Sello electrónico

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2026-01-20 17:43:19 | FIRMANTE

ImN4Qhrytl21P0UoxHj4bdBoVZ8hmZk9tLWWh4AgYdHfpaayx8Mjx47pcTgZTmgwnnjCxAwko1qOdTAs3+UZ+qLR742FpN2jXdhkEO92qmxlk65iElr+ApS09Y3CywBxMX5f8ITuU1m/GHmfMNoxAXK1dS6sXU0QUUNfm5ga7LU0g8caXxl6kLEJ4hwr5fQkym7m1gksrQe6yD/bk3F3mJKKh+tAN/mEmAx8647XGDh9/m3xy9UFNtfoth1aSMamebL/uMKZrnZpJBujj+v2/oRw+xZe9rMQ8BbamitT38hBcWk+AhFhuJZX+/Dsh4mhzhYWNrTZg3nRwoNi6POMm/A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[v0sUAibeJ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ht2Fpyy79M6ypkdqwMLsOvtnlQYoBeCb>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 20 de enero de 2026.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo  
Director de la Facultad de Medicina

**Presente**

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **Caracterización de la cascada de señalización que utiliza la oncoproteína E5 de HPV16, el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y Ras durante el proceso de transformación celular**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Lisandra Gómez Mata. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

**Dra. Delia Vanessa López Guerrero**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

#### Sello electrónico

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2026-01-21 01:15:05 | FIRMANTE

08Jpvf+8lcqgEla8O5HNXTO8Yrtz7fPiXmjP1oEm7JHr07pmznMyj10/UDVEveFpVEOc/HhvEvcKuPc92CenPINoWjwwRFZM2ycFsedcioSJFJWjtme5u6STiH2ZqZWxV3+bavu1hrr  
Jt0EFMt0DafdE+Clrsv6ehoYsn41jbPks+gs+OJ5DRQz10fUbOcBFR8mlcwRqfQopJq1Jo0GoqYe5fYeOuWsv6wah9BL2f/F9Qti7ouJToMnWlr3Xv8mxM/i7rC7Zb+YUhn/GRc/qEVo  
vYoTvQPpP9tBgiSza3r5DL0yxJ0tMI0CDmcai3H/r6q37+OYk3SM1joS1KYzCpmg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[nokxs07rf](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/CuFJbBIV6TjUmQhJ3VsnXqznJKOtI3ad>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 20 de enero de 2026.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo  
Director de la Facultad de Medicina

Presente

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **Caracterización de la cascada de señalización que utiliza la oncoproteína E5 de HPV16, el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y Ras durante el proceso de transformación celular**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Lisandra Gómez Mata. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. **Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

#### Sello electrónico

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2026-01-20 16:01:14 | FIRMANTE

eS4f+zRdGvEQzQrO2Dauh7rrurdXkcyHJQFshwDspVJKB3nN2/ITVLDIcip9/WMCOXGzACO9V7itXuf4IJ83YvPZHc3TXG4w/pFWrKFnUhSoXZrwOQGGePNJhcvYTieblryzsWfJT/pKnrI8LbVzPqJdYVVRb3VRMSfZWgQm9+QjkDqP81vdl5dYXFVV2ccOaXzcaw1+dl9Vp6T2yAZfeQ0a3bc8u3LUoLFgTxOiMYGnLi+onRI+H9n3Mi50mnT6uks6p5QQHdpGgMYbtQUDWLX5e3f6J9HTFRD+RNfkI5hTZwmN5lcVcuw1EIHvJ1HSimXaBFCIVz5hiVx/HVdTg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[jUMamvDFO](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9QO9DFGMYRi01GL5eGgfU2G1hQ5J6Cyb>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 03 de diciembre de 2025.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo  
Director de la Facultad de Medicina

**Presente**

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **Caracterización de la cascada de señalización que utiliza la oncoproteína E5 de HPV16, el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y Ras durante el proceso de transformación celular**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Lisandra Gómez Mata. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

- I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

**Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

#### Sello electrónico

MARÍA DE LOURDES GUTIÉRREZ XICOTENCATL | Fecha:2025-12-03 14:49:01 | FIRMANTE

HEWh4LmZ+Ruz51uNKD/19rl+VTHnWuwAFBhdBda+5qhpq6O4C5xBhOOio2azq8okPLfMZH85PmO4KY5vIT549lvhJVamVReKM41bJf6dltwfd+Subs62HcS0uaw2c9ta02c/Y3Z  
AO8525Qq72CaK9/+W37SOAqñQDDeTFj9PCiYEl+LqRRMN+aFR69dpv9IR0bpL3QwHxAb8AR9QLbKm8mlGnUBqqLWoHHyoXA4DBjJ7DFD51ene9Dv1S/YTcZ9yo33Vg66G4  
zXd6iRkAJhvGZvtjgpVClcjQc+1pW7/Tuc22EiW4GxMfZB93w5kkOvSa+G7YgfSyRVsEa4+HMI6Ng==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



WRyUCOLTi

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/sYpxh1ioyiKR1h0tafG7ng7104hQRUrv>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029