

Análisis *in vitro* del efecto sinérgico de las oncoproteínas virales E5, E6 y E7 del VPH-18 en la proliferación, migración e invasión celular de queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente (línea celular HaCaT)

Bach. Felipe Parietti

LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tutora: Dra. Jimena Hochmann

Co-tutor: Dr. Santiago Mirazo

Julio 2019

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer muchísimo a Jimena porque ha sido una excelente tutora durante todo el transcurso de la pasantía. Destaco su entusiasmo por enseñar a los demás, su disposición frente a dudas y consultas y su buena voluntad. ¡No cambies nunca! Sos una gran persona e investigadora, y estoy seguro que me llevo una gran amiga también.

A Santiago y a Juan por abrirme las puertas del labo y permitirme realizar la pasantía en la Sección. Sin ustedes nada de esto hubiera sido posible. Gracias también por todo lo que me enseñaron en el curso de Virología. El conocimiento es invaluable.

A Mabel, Adriana, Ana, Natalia y Sandra: gracias por todo lo que aprendí con ustedes y por estar siempre disponibles y dispuestas a ayudar.

A mis compañeros del labo: Ana, Catalina, Lucía, Irene, Natalia, Gabriel, Gastón, David, Sebastián, Marcie, Florencia C. y Florencia O. Por todos los momentos que compartimos juntos dentro y fuera del labo.

A la Sección de Biología Celular por permitirme realizar algunos experimentos en su laboratorio.

A mis amigos por bancarme cuando tengo que estudiar y no puedo salir los fines.

A los Dres. Dora Ruchansky y Uriel Koziol, por corregir esta tesina y aceptar ser miembros de este tribunal.

Por último, pero no menos importante, a mi mamá Susana, que siempre me impulsó a estudiar una profesión que me hiciera feliz. A mi papá Álvaro y a mis abuelos que, aunque ya no estén físicamente conmigo, siempre los siento muy cercanos.

«La esperanza está en los sueños, en la imaginación, y en el coraje de los que se atreven a hacer realidad los sueños».

– Jonas Salk

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1. Generalidades sobre los VPH.....	2
1.2. Genoma Viral.....	3
1.3. Oncoproteínas virales E5, E6 y E7.....	4
1.4. Potencial transformante de las oncoproteínas virales.....	6
1.5. Persistencia de la infección por VPH de alto riesgo oncogénico y progresión a malignidad.....	8
1.6. Epidemiología mundial y en Uruguay; prevención del cáncer de cuello uterino.....	9
2. Hipótesis de Trabajo	10
3. Objetivos	11
3.1. Objetivos del proyecto.....	11
3.2. Objetivos específicos.....	11
4. Materiales y Métodos	12
4.1. Construcción de las líneas celulares de trabajo.....	12
4.2a. Ensayo de viabilidad y proliferación celular (MTT).....	13
4.2b. Curva de proliferación celular.....	14
4.3. Ensayo de migración celular.....	14
4.4. Ensayo de invasión celular.....	15
4.5. Análisis estadísticos.....	15
4.6. Construcción de una filogenia actualizada de los VPH.....	16
5. Resultados	17
5.1. Filogenia actualizada de los papilomavirus humanos.....	17
5.2. Morfología de las líneas celulares estables de trabajo.....	17
5.3. Efectos de los oncogenes virales en la viabilidad y proliferación de las células HaCaT.....	17
5.4. Efecto de los oncogenes virales en la capacidad migratoria e invasiva de las células HaCaT.....	18
6. Discusión	23
7. Perspectivas	26
8. Referencias	27
9. Lista de Abreviaturas	32

RESUMEN

Introducción: El cáncer de cuello uterino o cérvix (CCU) es el tercer tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado en mujeres en el mundo con un estimado de 569.847 nuevos casos por año y 311.365 muertes anuales para el 2018, lo cual lo coloca como la tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial en mujeres (GLOBOCAN 2018). Según los últimos datos recabados del Instituto Nacional del Cáncer (INCA), en Uruguay se registran aproximadamente 318 casos anuales de CCU correspondientes a una tasa de incidencia de 14,70 y 5,43 de mortalidad ajustadas por edad cada 100.000 habitantes, lo cual representa en promedio unas 137 muertes anuales. Los papilomavirus humanos (VPH) son un grupo heterogéneo de pequeños virus desnudos, epiteliotrópicos, de simetría icosaédrica cuyo genoma es de ADN doble cadena circular cerrado; al día de hoy se han caracterizado más de 200 tipos virales clasificados en 5 géneros: α , β , γ , μ y ν . Actualmente se sabe que el principal agente etiológico necesario que conlleva al desarrollo del CCU son los α -VPHs mucosotrópicos de alto riesgo, especialmente los tipos 16 y 18 que son responsables de ~70% de los casos de CCU. El genoma de los VPH está dividido en tres regiones: una región temprana (E) que codifica para las proteínas necesarias para la replicación viral y las principales oncoproteínas virales (E5, E6 y E7), una región tardía (L) que codifica para las proteínas de cápside y una región de control no codificante.

Las oncoproteínas virales E5, E6 y E7 juegan un papel fundamental en el proceso de transformación celular; especialmente E6 y E7 ya que interactúan con proteínas reguladoras del ciclo celular como p53 y pRb. En cuanto a E5, si bien su ORF es eliminado en lesiones de alto grado, se piensa que contribuye en etapas tempranas del proceso carcinogénico. **Objetivo general:** Analizar el efecto sinérgico de E5 en conjunto con E6 y E7 del VPH-18 en algunas características que pueden contribuir a la carcinogénesis del cuello de útero, tales como la proliferación, migración e invasión celular de queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente de la línea celular HaCaT. Además, se construirá una filogenia completa y actualizada de los papilomavirus humanos que aporte información que permita elucidar mejor las relaciones filogenéticas entre los diferentes tipos virales. **Métodos:** Se trabajó con cuatro líneas celulares estables de HaCaT expresando la siguiente combinación de oncogenes: HaCaT E5-18, HaCaT E6/E7-18, HaCaT E5/E6/E7-18 y HaCaT sin ningún oncogén. En ellas se evaluó la proliferación, la migración e invasión celular entre cada línea celular y con respecto al control (HaCaT).

Resultados: Las células HaCaT transducidas con los oncogenes E5, E6 y E7 del VPH-18 mostraron un alta tasa de proliferación medida por ensayo de MTT, lo cual indica un incremento significativo en la proliferación y viabilidad celular comparado con el control (HaCaT sin ningún oncogén) y con HaCaT transducida con E6/E7 y HaCaT E5-18. En cuanto a la migración celular, HaCaT transducida con E6/E7 mostró una mayor capacidad de migración que resultó ser significativa con respecto a HaCaT E5-18 pero no con respecto al control ni con respecto a HaCaT transducida con los tres oncogenes virales. Por último, se evaluó la capacidad invasiva de las cuatro líneas celulares estables mediante un ensayo *transwell* empleando una matriz de colágeno. Las células HaCaT que expresan E5/E6/E7 presentaron un incremento significativo en la invasividad, tanto con respecto al control HaCaT como a HaCaT transducida con E5.

Conclusión: En este trabajo se demuestra por primera vez la cooperación *in vitro* de los tres oncogenes virales E5, E6 y E7 del VPH-18 en características clave del proceso carcinogénico. La confirmación de la sinergia entre los tres oncogenes virales necesitará de estudios más profundos para comprender los mecanismos moleculares subyacentes a este fenómeno que modula el proceso de transformación maligna.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades sobre los VPH.

Los virus del papiloma humano (VPH) son un grupo heterogéneo de pequeños virus desnudos (55–60 nm), de simetría icosaédrica, con un rango de huésped y un tropismo muy estrecho, siendo solamente capaces de infectar queratinocitos primarios no diferenciados del estrato basal a través de micro heridas en la piel y las mucosas. Su genoma es de ADN doble cadena circular cerrado de aproximadamente 8000 pb unido a histonas celulares. Pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, y se cree que co-evolucionaron junto con los primeros amniotas hace aproximadamente 350 millones de años (revisado por Doorbar *et al.*, 2012; Van Doorslaer, 2013). Su ciclo viral depende del estado de diferenciación de los queratinocitos, reflejando de esta manera, millones de años de estrecha co-evolución.

Actualmente se conocen 226 tipos virales de VPH clasificados en cinco géneros representados por letras griegas: α , β , γ , μ y ν . A su vez los VPH se pueden clasificar según su tropismo epitelial en cutaneotrópicos (géneros β y γ predominantemente, μ , ν y algunos α en menor medida) o mucosotrópicos (exclusivamente algunos tipos dentro del género α) (de Villiers *et al.*, 2004; Doorbar *et al.*, 2012). Los VPH cutaneotrópicos generan lesiones hiperproliferativas en la piel llamadas verrugas, sobre todo en el área de las manos y los pies. Cabe destacar que no todas las infecciones por VPH causan manifestaciones clínicas visibles, en la mayoría de los casos las infecciones son asintomáticas y se resuelven rápidamente por el sistema inmune del huésped. Por otro lado, tenemos a los VPH mucosotrópicos de mayor relevancia sanitaria que los anteriores. Estos VPH infectan las mucosas de la zona anogenital y orofaríngea. A su vez los VPH mucosotrópicos se dividen en VPH de bajo riesgo oncogénico y de alto riesgo oncogénico. Los VPH de bajo riesgo oncogénico, especialmente los tipos 6 y 11 son causantes de aproximadamente 90% de los casos de verrugas genitales por lo cual son motivo frecuente de consulta médica. La mayoría de las verrugas son generalmente benignas y se resuelven al cabo de 6 meses. Estos mismos tipos virales han sido vinculados al desarrollo de papilomatosis respiratoria recurrente (PRR), una enfermedad poco frecuente pero grave que afecta principalmente a niños menores de cinco años, caracterizada por el crecimiento exacerbado de papilomas en las vías respiratorias altas, especialmente en la zona de la laringe obstruyendo la respiración y el habla (revisado por Doorbar *et al.*, 2012). Se cree que la infección por VPH causante de esta enfermedad ocurre durante el parto. Con respecto a los VPH de alto riesgo oncogénico, el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) ha clasificado a 12 α -VPH como carcinogénicos humanos de tipo I (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, y 59). Casi la totalidad de los casos de cáncer de cuello uterino (CCU) está vinculada a una infección persistente por uno o más VPHs de alto riesgo, siendo los tipos 16 y 18 los que reportan una mayor incidencia tanto en Uruguay como a nivel mundial (Walboomers *et al.*, 1999; Berois *et al.*, 2013).

Aproximadamente el 70% de los casos de CCU a nivel mundial está causado por estos dos tipos virales (revisado por Doorbar *et al.*, 2012; Serrano *et al.*, 2018).

1.2. Genoma Viral.

El genoma de los VPH posee 8 marcos abiertos de lectura (ORFs) codificados en una hebra y está dividido en tres regiones: una región temprana o *early* (E) que codifica para las proteínas necesarias para la replicación viral y la transformación celular (E1, E2, E4, E5, E6 y E7); una región tardía o *late* (L) que codifica para las proteínas de cápside L1 y L2 y una región no codificante (LCR o URR) que contiene sitios de unión a factores de transcripción virales y celulares, el origen de replicación del genoma y controla la expresión génica ya que ahí se encuentran los promotores temprano (P_E) y tardío (P_L) (revisado por McBride, 2017; Ryu, 2017) (ver figura 1). L1 codifica para la proteína mayor de la cápside mientras que L2 codifica para la proteína menor de la cápside que se une al ADN viral y facilita su empaquetamiento dentro del virión. E1 codifica para una helicasa viral que también posee actividad ATPasa (revisado por Harden y Münger, 2016). E1 es capaz de desenrollar el ADN viral en el origen de replicación y reclutar la maquinaria de replicación celular. La unión de E1 al origen de replicación es estabilizada por E2. E2 es de hecho un grupo de proteínas pequeñas que regulan la transcripción del ADN viral, E2 también funciona como represor de E6/E7. En cuanto a E4 se sabe que juega un papel importante en el escape del virión de las capas cornificadas del epitelio, generalmente se expresa como el producto de fusión E1^{E4} y es la proteína expresada más abundante en las capas superiores del epitelio durante una infección productiva (Payne, 2017; revisado por Pinheiro *et al.*, 2018).

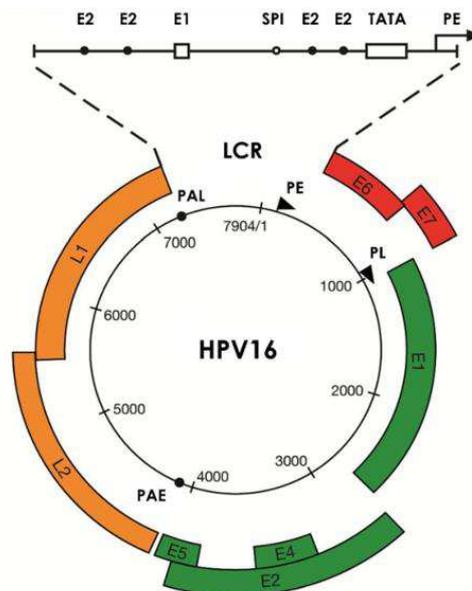


Figura 1. Organización del genoma viral del VPH-16. Comprende una región larga de control no codificante (LCR) y ocho genes que son necesarios para las diferentes etapas del ciclo viral. La región LCR contiene sitios de unión para los factores de transcripción celular, así como para las proteínas virales E1 y E2 que controlan la replicación viral y la expresión génica. PAE y PAL indican los sitios de poliadenilación temprana y tardía en el genoma viral. PE y PL indican las posiciones de los promotores temprano y tardío en el genoma. (Extraído y modificado de Doorbar *et al.*, 2012)

1.3. Oncoproteínas virales E5, E6 y E7.

E6

E6 es una proteína de aproximadamente 16 kDa de localización nuclear principalmente, aunque también se encuentra en el citosol, cuyo blanco principal es la proteína supresora de tumores p53 con la cual forma un complejo trimérico junto con una proteína adaptadora celular llamada E6-AP (E6/E6-AP/p53). Este complejo es ubiquitinizado para su degradación en el proteasoma (revisado por Moody y Liamins, 2010) (ver figura 2). E6 también interfiere con p53 por medio de la unión a dos acetiltransferasas p300 y CREB-binding protein (CBP), bloqueando la habilidad de estos factores de acetilar a p53 e incrementar su estabilidad. Por otra parte, se ha visto que E6 es capaz de interactuar con proteínas asociadas a las vías apoptóticas tanto extrínsecas como intrínsecas. E6 es capaz de unirse y acelerar la degradación de la proteína proapoptótica pro-caspasa 8 (CASP8). Adicionalmente, se ha demostrado que es capaz de inhibir la acción de Bak y Bax que son las encargadas de regular la vía intrínseca de la apoptosis. También inhibe la apoptosis evitando la transducción de la señal de los receptores Fas por la unión al dominio citosólico *Fas-associated death domain* (FADD) luego de la unión a FasL. Otra vía apoptótica que se ve alterada es la del TNF- α ya que E6 se une al receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1) evitando la activación de las caspasas 3 y 8 (revisado por Moody y Liamins, 2010).

La proliferación celular excesiva es un requerimiento necesario para la progresión a malignidad y la expresión constitutiva de E6 es capaz de inducir la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT). La activación de hTERT ocurre por dos mecanismos distintos: la activación del promotor de hTERT por la sobreexpresión del protooncogén c-Myc y el factor de transcripción Sp1; y, por otro lado, por la degradación del represor de hTERT (NFX-91) (revisado por Pinheiro *et al.*, 2018).

Otro blanco importante de E6 de los VPH de alto riesgo son aquellas proteínas que poseen un dominio PDZ que regulan funciones de suma importancia como la polaridad y la motilidad celular, debido a que las E6 de alto riesgo poseen un dominio de unión a PDZ en el extremo C-terminal que está ausente en las E6 de bajo riesgo oncogénico. E6 también degrada a proteínas relacionadas a la adhesión celular como la paxilina y fibulina-1 de la matriz extracelular (revisado por Estêvão *et al.*, 2019).

E7

E7 es una proteína de aproximadamente 13 kDa de localización principalmente nuclear y su blanco principal es la proteína del retinoblastoma (pRb) la cual fosforila y esto provoca la liberación del factor de transcripción E2F. El factor E2F liberado se transloca al núcleo y recluta diferentes factores remodeladores de la cromatina, incluyendo las desacetilasas de las histonas (HDAC) que promueven la expresión de genes activados por E2F como los genes de la ciclinas A y E lo que lleva a un aumento en la proliferación celular. *E7* también inactiva las “proteínas de bolsillo” p107 y p130 reguladoras de E2F.

Otra función importante de *E7* es la inactivación de proteínas reguladoras de la transición G1-S del ciclo celular, los inhibidores de Cdks p21 y p27, esto provoca que la proliferación celular se desregule ya que se mantiene la actividad de Cdk2.

Estudios recientes también demuestran que *E7* induce roturas en el ADN, al mismo tiempo que incrementa los niveles de expresión de la desacetilasa Sirt1 que reduce los niveles de la histona γ -H2AX que participa en la reparación de las roturas de la doble cadena de ADN (revisado por Pinheiro *et al.*, 2018)

E7 también es capaz de mantener el largo de los telómeros en ausencia de la actividad de la telomerasa mediante la vía alternativa de alargamiento de los telómeros (ALT), que involucra recombinación homóloga entre los telómeros de cromátidas hermanas (revisado por Xue *et al.*, 2012).

E5

La oncoproteína *E5* ha sido la menos estudiada a nivel de transformación celular, sin embargo, se sabe que al igual que *E6* y *E7* contribuye al proceso carcinogénico. *E5* es una proteína transmembrana pequeña de 8,3 kDa (VPH-18) e hidrofóbica que se localiza principalmente en las membranas intracelulares del retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi. También es capaz de disminuir la acidificación de los endosomas (de un pH de 5,9 a 6,9) bloqueando la actividad de la ATPasa vacuolar, esto conduce a una retención del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en la membrana plasmática evitando su degradación, el reciclaje de los mismos en la membrana celular y la prolongación de su señal activa. De esta forma *E5* es capaz de estimular la proliferación celular formando complejos con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la membrana celular (revisado por DiMaio y Petti, 2013).

También se ha visto que *E5*, mediante su interacción con el aparato de Golgi, es capaz de reducir la expresión del MHC de clase I en la membrana celular; por lo cual juega un papel importante en la evasión de la respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos (revisado por DiMaio y Petti, 2013) (ver figura 2).

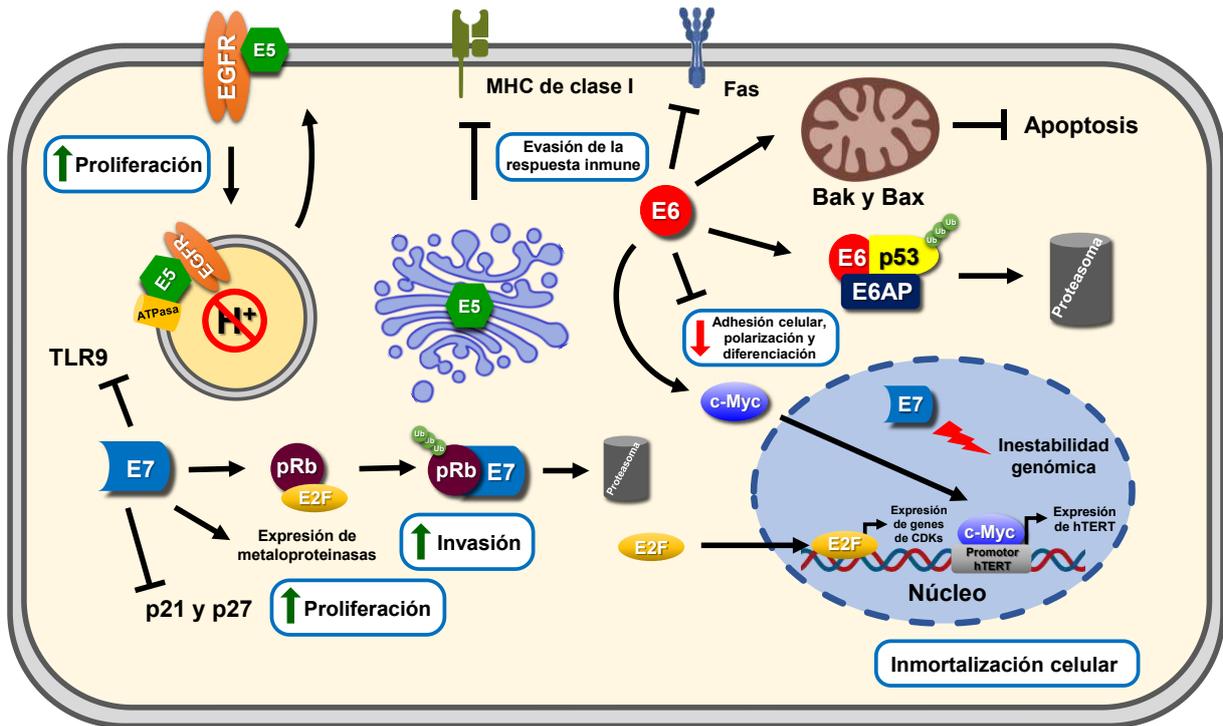


Figura 2. Interacción de las oncoproteínas virales E5, E6 y E7 con sus principales blancos celulares. Las oncoproteínas virales poseen actividades transformantes y perturban diversos procesos celulares.

1.4. Potencial transformante de las oncoproteínas virales.

Las oncoproteínas virales E5, E6 y E7 de los VPH de alto riesgo oncogénico son los principales factores virales responsables de la transformación maligna y progresión a cáncer cervical. E6 y E7 se expresan de forma constitutiva luego de la integración del genoma viral al genoma de la célula huésped; son oncoproteínas pleiotrópicas, ya que poseen muchos blancos a nivel celular y no poseen actividad enzimática conocida. Cabe destacar que la integración del genoma viral o de fragmentos subgenómicos es puramente accidental y resulta en la desregulación de la expresión de E6 y E7 debido a que la integración interrumpe el marco abierto de lectura de E2, el principal represor de la expresión de E6 y E7. La expresión constitutiva de estos oncogenes influye de manera directa e indirecta en determinadas vías de señalización celulares que regulan procesos altamente regulados como la proliferación, migración e invasión celular, la desregulación de estos procesos puede llevar al desarrollo de la carcinogénesis (revisado por Oyervides-Muñoz *et al.*, 2018). Los altos niveles de expresión de E6 y E7 llevan a la acumulación de daño en el ADN celular que resultan en inestabilidad genómica y a una menor capacidad de respuesta de los mecanismos de reparación del ADN (revisado por Prati *et al.*, 2018).

Las células que expresan E6/E7 como producto de integración del genoma viral poseen una capacidad proliferativa mayor que las células que expresan el episoma viral. El hecho de que la pérdida de la función de E2 sea crítica para la progresión maligna fue demostrado por experimentos que muestran que la reexpresión de

E2 en líneas celulares de cáncer de cuello uterino provoca la supresión del crecimiento celular. Estos experimentos demuestran que la expresión constitutiva de E6/E7 es necesaria para mantener el fenotipo transformado (Münger *et al.*, 1989). Los VPH de bajo riesgo oncogénico, si bien expresan las mismas oncoproteínas virales, estas se unen débilmente a sus blancos celulares p53 y pRb sin degradarlos. Hawley-Nelson *et al.* demostraron que E6 y E7 del VPH-16 pueden actuar de forma cooperativa para inmortalizar un cultivo primario de queratinocitos humanos *in vitro* (Hawley-Nelson *et al.*, 1989). Esto puede ser explicado porque ambas proteínas anulan las funciones de p53 y pRb. Por otra parte, se ha demostrado el potencial transformante de E6 y E7 en varias líneas celulares tanto murinas como humanas (Bedell *et al.*, 1987; Münger *et al.*, 1989; Hawley-Nelson *et al.*, 1989) mediante la técnica de *Soft Agar* la cual permite evaluar la transformación celular *in vitro*. También se ha demostrado que E6 y E7 son indispensables para el mantenimiento del fenotipo maligno ya que su silenciamiento en la línea HeLa que es positiva para el VPH-18 lleva a la senescencia celular.

Con respecto a la oncoproteína E5, se sabe que presenta una actividad transformante débil en ausencia de E6 y E7 (revisado por DiMaio y Petti, 2013). No obstante, estudios realizados en diferentes modelos celulares han demostrado que E5 es capaz de cooperar con E6 y E7 de forma significativa en el proceso de transformación celular. Boulenouar *et al.* realizaron un trabajo interesante empleando como modelo células “tipo trofoblásticas” (BeWo) que comparten muchas similitudes tanto a nivel metabólico como funcional con células trofoblásticas de la placenta, las cuales son capaces de ser infectadas por el VPH (Boulenouar *et al.*, 2010). Estas células son un buen modelo de estudio del desarrollo de la carcinogénesis ya que poseen ciertas características en común con células tumorales como una elevada capacidad proliferativa, crecimiento independiente de anclaje y ausencia de inhibición por contacto. En este trabajo se evaluó por primera vez los efectos transformantes de las tres oncoproteínas virales (E5, E6 y E7) del VPH-16 sobre una línea celular placentaria, reportando un aumento en la proliferación, migración e invasión celular tanto de manera conjunta VPH-16 E5/E6/E7 como separada VPH-16 E5 y VPH-16 E6/E7. Los resultados obtenidos por Boulenouar *et al.* aportan evidencia sólida de que E5 coopera con las oncoproteínas E6 y E7 durante la progresión a malignidad aumentando la capacidad invasiva, proliferativa y migratoria de las células BeWo (Boulenouar *et al.*, 2010). Este trabajo es apoyado por Al-Moustafa, quien propone que E5 del VPH-16 coopera junto con E6 y E7 para inducir la transición epitelio-mesénquima (EMT) mediante la vía de señalización de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Al-Moustafa, 2015).

Por otra parte, cabe destacar el trabajo de Kivi *et al.* en donde se estudió por primera vez el efecto de E5 del VPH-16 en el transcriptoma de células epiteliales humanas mediante *microarrays* de cDNA empleando como modelo de estudio a la línea celular HaCaT. Los hallazgos de este grupo de investigación no solamente aportan nueva información desde el punto de vista de la transcriptómica, sino que también revelan que E5 afecta a varias vías celulares estrechamente relacionadas con la motilidad celular, la adhesión y la migración (Kivi *et al.*, 2008). También se ha documentado que E5 del VPH-6 y VPH-16 son capaces de cooperar con E7 en la transformación e inmortalización de células primarias murinas (Valle y Banks, 1995).

Otra característica interesante desde el punto de vista de la transformación celular es la capacidad de E5 de extender la vida media *in vitro* de los queratinocitos y el incremento de la eficiencia de la inmortalización celular en presencia de E6 y E7 (Stöppler *et al.*, 1996). Esta información es complementada por el trabajo de Liao *et al.* en donde se aporta evidencia contundente a favor de que E5 tanto del VPH-16 como del VPH-18 promueve la proliferación, migración e invasión celular tanto en modelos de cáncer de cuello uterino que contienen y expresan las oncoproteínas virales como SiHa y HeLa como en modelos celulares en donde no se expresan dichas oncoproteínas, por ejemplo la línea celular C33A que es VPH negativa. En sintonía con Al-Moustafa 2015, Liao *et al.* 2012 también reportan una disminución en la expresión de E-cadherina en las uniones adherentes. La pérdida de E-cadherina es una característica importante del proceso carcinogénico y está asociada a un mayor potencial migratorio e invasivo de las células. Otro resultado importante de este trabajo es la capacidad de E5 de alterar el citoesqueleto y esto puede estar relacionado con la mayor capacidad invasiva en las células de estudio (Liao *et al.*, 2012).

1.5. Persistencia de la infección por VPH de alto riesgo oncogénico y progresión a malignidad.

La persistencia de una infección por VPH de alto riesgo es el principal factor de riesgo que lleva al desarrollo de cáncer de cuello uterino. Normalmente las infecciones por VPH de alto riesgo oncogénico son resueltas por el sistema inmune del huésped al cabo de uno o dos años. Se cree que aproximadamente un 10–20% de estas infecciones pueden persistir pasando de ser productivas (con producción de viriones) a infecciones abortivas o transformantes, luego de las cuales se pueden desarrollar lesiones precancerosas y finalmente llevar al desarrollo de una neoplasia (revisado por Shanmugasundaram y You, 2017). Sin embargo, lograr diagnosticar cuáles lesiones progresarán a malignidad y cuales se resolverán sigue siendo objeto de intenso estudio; así como entender los mecanismos por los cuales algunos individuos desarrollan una infección persistente por VPH de alto riesgo oncogénico (revisado por Schiffmann *et al.*, 2016). La progresión a malignidad es un evento infrecuente y lento ya que se manifiesta años o décadas más tarde luego de la infección inicial. Estudios epidemiológicos de persistencia viral indican que las mujeres jóvenes presentan infecciones transitorias mientras que las mujeres mayores y aquellas infectadas por un VPH de alto riesgo oncogénico (p. ej. VPH-16 o VPH-18) presentan un riesgo mucho mayor de presentar una infección persistente (Hildesheim *et al.*, 1994). También es importante destacar el rol de las variantes moleculares virales y su correlación con la persistencia de la infección. Una variante de VPH se define taxonómicamente cuando dos secuencias nucleotídicas difieren en menos de un 2% en la secuencia del ORF L1 con respecto al genoma de referencia de ese tipo viral (De Villiers *et al.*, 2004). En un trabajo realizado por Villa *et al.* en una región de Brasil con alta incidencia de infecciones por

VPH se demuestra que las variantes intratípicas no europeas del VPH-16 y 18 poseen una tendencia a provocar infecciones persistentes más frecuentemente que otras variantes (Villa *et al.*, 2000).

Cabe destacar que la variante asiático-americana, bastante prevalente en las poblaciones americanas, posee una mayor capacidad de desarrollo carcinogénico sobre otras variantes circulantes en la población (Hochmann *et al.*, 2016).

En años recientes la atención se ha centrado en factores de riesgo que puedan evitar la correcta resolución de infecciones persistentes por VPH. Varios estudios han demostrado que los hábitos de vida como el consumo de alcohol y el tabaquismo son un factor de riesgo importante que pueden aumentar las probabilidades de padecer infecciones persistentes por VPH. Una explicación plausible es que los carcinógenos en el humo de tabaco, benzopirenos específicamente, incrementan la carga viral por un mecanismo en el cual la liberación de Ca^{2+} intracelular estimularía la activación de proteínas quinasas C (PKCs) que emplean Ca^{2+} y diacilglicerol (DAG) como segundos mensajero; corroborado por estudios realizados en cultivos epiteliales organotípicos (Alam *et al.*, 2008). Otros trabajos apuntan a una alteración de la microbiota vaginal como posible factor de riesgo en el desarrollo de una infección persistente, aunque esta relación es un tanto difusa (Kwasniewski *et al.*, 2018).

1.6. Epidemiología mundial y en Uruguay; prevención del cáncer de cuello uterino.

El cáncer de cuello uterino es un problema de salud a nivel mundial, a pesar de ser prevenible es el tercer tipo de cáncer más común en mujeres registrándose aproximadamente 569.847 nuevos casos y 311.365 muertes anuales en 2018. Es el segundo tipo de cáncer más común en mujeres de entre 15 y 44 años. Según los últimos datos recabados del INCA, en Uruguay se registran aproximadamente 318 casos anuales de CCU correspondientes a una tasa de incidencia de 14,70 y de mortalidad de 5,43 ajustadas por edad cada 100.000 habitantes, lo cual representa en promedio unas 137 muertes anuales (ver figura 3). El cáncer de cuello uterino es una enfermedad altamente prevenible por medio de la vacunación de niñas y niños de entre 9 y 14 años contra el VPH. Además de la vacunación, el tamizaje mediante el test de Papanicolaou y el tratamiento de las lesiones precancerosas pueden reducir significativamente la incidencia del cáncer de cuello uterino como problema de salud pública.

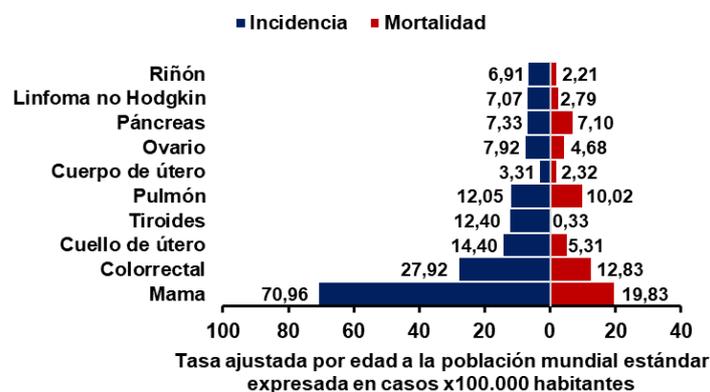


Figura 3. Tasa de incidencia y mortalidad de los principales cánceres que afectan a mujeres en Uruguay. Período (2010-2014). (Extraído y adaptado de la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Basándonos en que la gran mayoría de los trabajos realizados sobre los procesos de transformación maligna que conllevan al desarrollo del cáncer de cuello de útero se han enfocado en las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH-16, con muy poca literatura referente al VPH-18, es que en el presente trabajo nos planteamos como principal hipótesis determinar si la oncoproteína E5 del VPH-18 es capaz de cooperar junto con las oncoproteínas E6 y E7 del mismo tipo viral; evaluando su impacto en diferentes características del proceso carcinogénico tales como la proliferación, migración e invasión celular. Se espera que la presencia de E5 en la línea celular transducida con los tres oncogenes virales presente una mayor capacidad invasiva, migratoria y proliferativa que el resto de las líneas celulares y el control sin ningún oncogén viral.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos del proyecto.

Analizar el efecto sinérgico de E5 en conjunto con E6 y E7 del VPH-18 en algunas características que pueden contribuir a la carcinogénesis de cuello de útero, tales como la proliferación, migración e invasión celular de queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente (HaCaT). Se escogió esta línea celular debido a que los queratinocitos humanos son los principales hospederos del VPH.

3.2. Objetivos específicos.

- Estudiar el efecto sinérgico de los tres oncogenes del VPH-18 (E5/E6/E7) en la proliferación celular mediante una curva de proliferación celular y ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).
- Evaluar la cooperación de los tres oncogenes del VPH-18 en la migración celular mediante ensayo de una herida en la monocapa celular.
- Evaluar la capacidad invasiva mediante un ensayo de *transwell* que utiliza una matriz de colágeno.
- Construir una filogenia completa y actualizada de los papilomavirus humanos que aporte información que permita elucidar mejor las relaciones filogenéticas entre los diferentes tipos virales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Construcción de las líneas celulares de trabajo.

La construcción de las líneas celulares de estudio fue realizada por mi tutora, la Dra. Jimena Hochmann en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (Brasil), en el marco de una pasantía de tres meses junto con la colaboración de la Dra. Laura Sichero, jefa del laboratorio. Este proyecto de tesis se enmarca dentro de su proyecto post-doctoral.

Como modelo de estudio se empleó la línea celular HaCaT, que son queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente, los cuales fueron cultivados en el medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Baja Glucosa (Capricorn Scientific, Alemania) con 10% de SFB (Gibco, Estados Unidos).

El ARN total celular fue extraído mediante el método de TRIzol[®] (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Los cDNAs fueron realizados mediante transcripción reversa empleando el kit comercial High Capacity RNA to cDNA (Life Technologies, Estados Unidos). Posteriormente fueron amplificados por PCR empleando la polimerasa Ampli Taq Gold con GeneAmp (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Los genes E6 y E7 del VPH-18 se clonaron en el vector retroviral pLXSN (Addgene, Estados Unidos), y E5 en el vector lentiviral MSCV-N (Addgene, Estados Unidos), los cuales poseen genes de resistencia a diferentes antibióticos (geneticina y puromicina respectivamente). Una vez co-transducidas las células de estudio HaCaT, las mismas fueron posteriormente seleccionadas con sus respectivos antibióticos 0,5 mg/mL de geneticina (Gibco, Estados Unidos) y 0,5 mg/mL de puromicina (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos) durante una semana. De esta forma se obtuvieron tres líneas celulares HaCaT estables que expresan la siguiente combinación de oncogenes: a) E5-18, b) E6/E7-18 y c) E5/E6/E7-18. Como control se utilizaron células HaCaT sin ningún oncogén.

La expresión de RNA de las células transducidas con: VPH-18 E5, VPH-18 E6/E7 y VPH-18 E5/E6/E7 fue analizada mediante RT-PCR usando los siguientes pares de primers:

- E7 VPH-18 F: 5'-ATGTCACGAGCAATTAAGC-3'
- E7 VPH-18 R: 5'-TTCTGGCTTCACACTTACAACA-3'
- E5 VPH-18 F: 5'-CATGTATGTGTGCTGCCATG-3'
- E5 VPH-18 R: 5'-GGCAGGGGACGTTATTACCA-3'
- GAPDH F: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'
- GAPDH R: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

Luego se procedió a amplificar el cDNA de GAPDH para evaluar la calidad del cDNA obtenido. Las células HF (aclamar), que son queratinocitos humanos que expresan el genoma completo del VPH-18 fueron empleadas

como control positivo para las RT-PCR. Todas las amplificaciones fueron hechas en un termociclador de 96 pocillos Veriti™ (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel con 3% de agarosa y teñidos con bromuro de etidio, lo cual se visualiza en la figura 4.

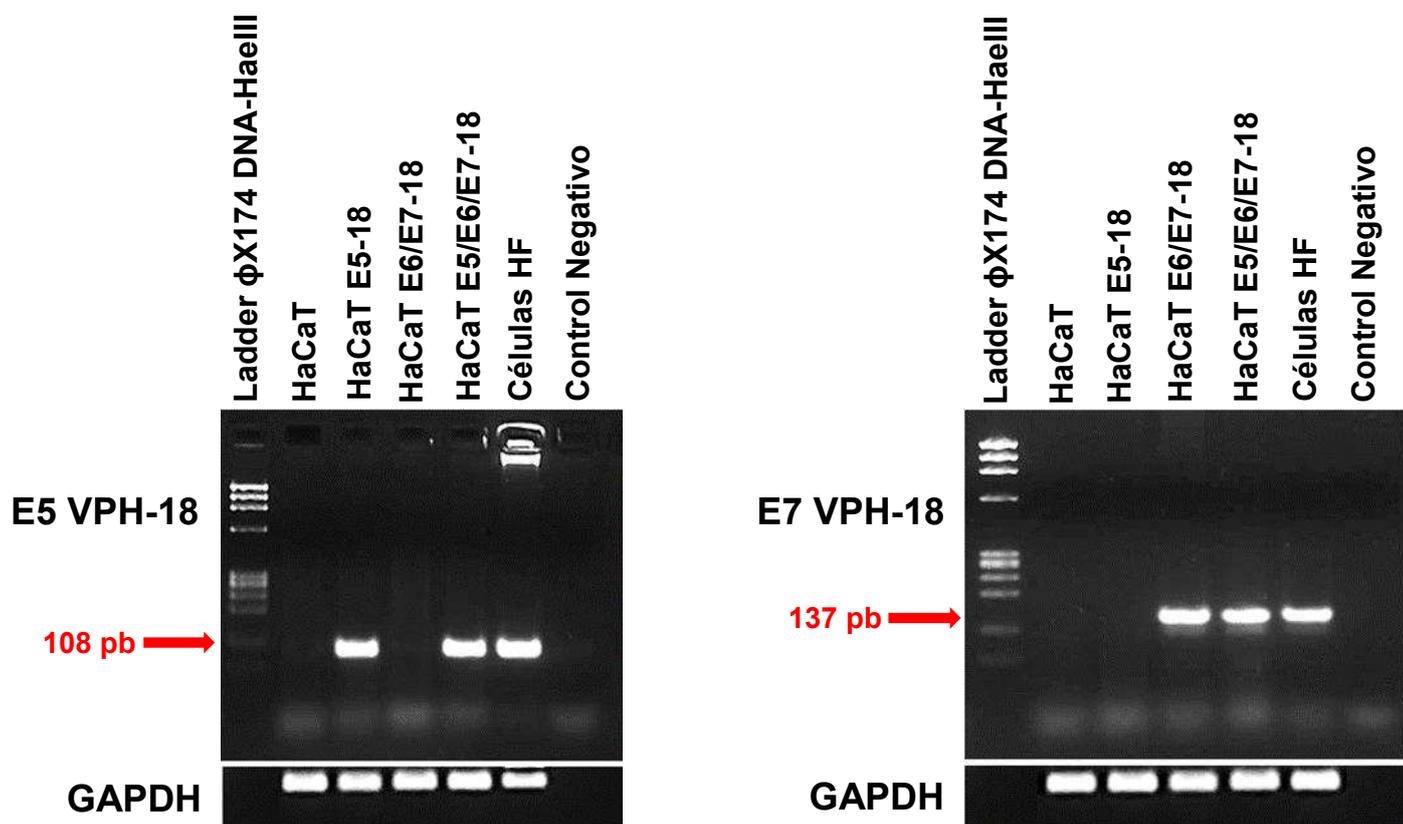


Figura 4. RT-PCR confirmatoria de la expresión de los oncogenes virales en las líneas celulares estables generadas. Izquierda: RT-PCR para el oncogén E5 en las cuatro líneas celulares estables HaCaT. Derecha: RT-PCR para el oncogén E7 en las cuatro líneas celulares estables HaCaT. El ADN de las células HF (fibroblastos humanos) que expresan el genoma completo de VPH-18 fue empleado como control positivo en ambas RT-PCR. El tamaño de los amplicones, 108 pb para E5 y 137 pb para E7 respectivamente, se indica con flechas. Este experimento fue realizado por la Dra. Jimena Hochmann en el marco de su pasantía en Brasil.

4.2a. Ensayo de viabilidad y proliferación celular mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Este ensayo involucra la reducción de un reactivo colorimétrico bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a un producto insoluble de color violeta por la acción de las coenzimas celulares NADH y NADPH. Esta conversión refleja la actividad enzimática en las células viables y la intensidad del producto es proporcional al número de células viables (Berridge y Tan, 1993). Para llevar a cabo este experimento se plaquearon $8,0 \times 10^3$ células en placas de 96 pocillos. Luego de 48 horas, se agregó 10 μ L del reactivo MTT (5

mg/mL) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y se dejó la placa en la estufa de cultivo celular por 4 horas a 37°C, 5% CO₂. Pasadas las 4 horas se agregaron 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) resuspendiendo bien para disolver los cristales de formazán formados en los pocillos, luego se leyó la absorbancia a 570 nm medido en el Varioskan Flash (Thermo Fischer Scientific, Estados Unidos). Cada experimento se realizó por triplicado.

4.2b. Curva de proliferación celular.

Por otra parte, se realizó una curva de proliferación celular por el método de conteo en cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) durante cuatro días. Se plaquearon $5,0 \times 10^4$ células (día 0) de las líneas estables generadas HaCaT (Control); HaCaT E5-18; HaCaT E6/E7-18 y HaCaT E5/E6/E7-18 en placas de 6 pocillos, cada placa fue numerada de forma correspondiente a un día distinto del experimento (día 1, día 2, día 3 y día 4), cada día se contaron únicamente los pocillos correspondientes a una placa. Las placas fueron incubadas a 37°C, 5% CO₂ durante toda la noche. Posteriormente, se tripsinizaron los pocillos de cada placa del día correspondiente con 500 µL de tripsina 1X y fueron neutralizados con 1,0 mL de medio de cultivo con 10% SFB. Luego se procedió al conteo en la cámara de Neubauer y se determinó el número de células correspondiente a cada día. Pasados los 4 días de cultivo se realizó la curva mediante el programa GraphPad Prism versión 8.0.0. Cada línea celular se plaqueó por triplicado.

4.3. Ensayo de migración celular.

La migración celular es un proceso de suma importancia en el desarrollo de la carcinogénesis y es suprimida por un fenómeno conocido como inhibición por contacto. La misma puede ser estimulada por medio de una herida en una monocapa celular, lo cual ha aumentado la popularidad de estos ensayos in vitro ya que son relativamente económicos. Para elucidar el efecto de los oncogenes virales sobre la migración celular se realizó un ensayo de la herida o wound healing sobre monocapas confluentes de las líneas celulares de trabajo (HaCaT, HaCaT E5-18, HaCaT E6/E7-18 y HaCaT E5/E6/E7-18) sembradas en placas de 12 pocillos, cada línea por triplicado. Debido a que tanto la migración como la proliferación celular contribuyen al cierre de la herida, se debe de realizar un cambio de medio DMEM baja glucosa a medio DMEM baja glucosa con 1% SFB para evitar que las células proliferen debido a la presencia de factores de crecimiento en el suero. De esta forma se puede asegurar que solamente la migración va a contribuir a la cicatrización de la herida.

En este experimento se sembraron $6,0 \times 10^5$ células en placas de 12 pocillos y se las dejó crecer hasta llegar a una confluencia de 90%, luego se realizó una “herida” en la monocapa con una punta de un tip de 200 µL (P200) de forma recta en el pocillo. Hecho esto, se agregó medio DMEM con 1% de SFB a los pocillos para evitar que las células proliferaran. Se dejaron las células incubando en la estufa a 37°C, 5% CO₂ por 24 horas. Se dividió a cada pocillo en 3 zonas (arriba, medio y abajo) trazando tres líneas paralelas para que las zonas fueran cuantificables. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

De cada zona se tomaron dos fotografías, una por encima de cada línea y otra inmediatamente por debajo, 6 en total por pocillo (a tiempo 0 y 24 horas más tarde) para cada línea celular en un microscopio invertido Leitz Labovert FS (Oberkochen, Alemania) y luego se realizó la cuantificación de la migración celular. El área de cobertura de la “herida” fue cuantificada mediante el software Zeiss LSM Image Browser Versión 3.2.0.115.

Fórmula matemática empleada para calcular el área de cobertura en el programa Microsoft Excel 2019:

$$\text{Área de cobertura (\%)} = \frac{\text{Área a tiempo 0 h} - \text{Área a tiempo 24 h}}{\text{Área a tiempo 0 h}} \times 100$$

4.4. Ensayo de invasión celular.

La transición epitelio-mesénquima (EMT) y la invasión de la matriz extracelular (ECM) son procesos de suma importancia durante la metástasis. Para estudiar este fenómeno se realizó un ensayo *transwell* de invasión celular que emplea una matriz de colágeno, ECM551 | QCM™ Collagen Cell Invasion Assay, 24-well (8 μm), Colorimetric (Millipore, Alemania). Se plaquearon $9,0 \times 10^5$ células en el inserto por triplicado en medio DMEM con 1% de SBF. La cámara de abajo del inserto se recubrió con medio con 10% de SFB que actuó como quimioatrayente para las células, las placas se incubaron por 48 horas a 37°C, 5% CO₂. Posteriormente las células fueron teñidas con una solución de Giemsa, y luego se removió con un cotonete las células que no invadieron la matriz extracelular. De esta manera pudo detectarse aquellas células que invadieron la matriz extracelular a través de la observación al microscopio invertido, mediante el cual se tomaron fotografías 48 horas después. Los insertos fueron lavados con agua destilada para retirar el exceso de colorante y luego se colocaron en una placa de 24 pocillos con 200 μL de buffer de extracción por 15 minutos. Posteriormente se transfirieron 100 μL de cada muestra a una placa de 96 pocillos para leer la absorbancia a 560 nm en el Varioskan Flash (Thermo Fischer Scientific, Estados Unidos). El ensayo se realizó por triplicado y en dos experimentos independientes.

4.5. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos y la confección de las gráficas de los ensayos de viabilidad, migración e invasión celular fueron realizados en el programa GraphPad Prism versión 8.0.1 (244) (GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos). La gráfica correspondiente a la curva de proliferación celular fue realizada en el programa Microsoft Excel 2019. Todos los experimentos fueron realizados en triplicado y los datos fueron presentados como la media ± desviación estándar (SD). Se realizó un test ANOVA (Análisis de la Varianza) de una sola vía seguido de la prueba *post-hoc* HSD de Tukey. Los valores por debajo de $P < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

4.6. Construcción de una filogenia actualizada de los VPH.

También se realizó la construcción de una filogenia actualizada al día de hoy de los papilomavirus humanos. Las secuencias fueron obtenidas en su totalidad del Papillomavirus Episteme (PaVE: <https://pave.niaid.nih.gov/>). El alineamiento de las mismas se realizó en el sitio web de análisis bioinformáticos Galaxy@Pasteur desarrollado por el Instituto Pasteur de París (<https://galaxy.pasteur.fr/>) por el método de ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). La historia evolutiva de los VPH fue inferida por el método de *Neighbor-Joining* (NJ) empleando 500 réplicas de bootstrap (Saitou y Nei, 1987). La construcción de la filogenia basados en la secuencia del genoma completo de los papilomavirus humanos se realizó utilizando el programa de análisis filogenético *Molecular Evolutionary Genetics* (MEGA versión 7.0) (Kumar *et al.*, 2016). Posteriormente el árbol fue editado en el programa Inkscape versión 0.92.4.

5. RESULTADOS

5.1. Filogenia actualizada de los papilomavirus humanos.

La historia evolutiva de los papilomavirus humanos fue inferida por medio de un análisis filogenético en el cual se empleó el método de *Neighbor-Joining* (NJ) basado en distancias genéticas y Tamura-Nei (TN93) como modelo de sustitución nucleotídica. El genoma de los VPH es bastante pequeño (~8 kb) lo cual permitió el análisis completo del mismo. Se emplearon la totalidad de las secuencias de genomas completos existentes en la base de datos del Papillomavirus Episteme (PaVE: <https://pave.niaid.nih.gov/>). Las secuencias fueron alineadas por el método ClustalW en el sitio web Galaxy@Pasteur. Posteriormente se procedió a editar el alineamiento y generar la filogenia en el programa *Molecular Evolution Genetic Analysis* (MEGA). Los árboles filogenéticos obtenidos concuerdan con los realizados en trabajos anteriores (ver figuras 5A y 5B). Se observa que los tipos 16 y 18 se agrupan en dos clados distintos, lo cual sugiere patrones de divergencia evolutiva diferente entre el VPH-16 y el VPH-18.

5.2. Morfología de las líneas celulares estables de trabajo: HaCaT, HaCaT E5-18, HaCaT E6/E7-18 y HaCaT E5/E6/E7-18.

Para confirmar la expresión de los oncogenes E5 y E6/E7 en las líneas celulares estables generadas se llevó a cabo una RT-PCR utilizando primers que amplifican fragmentos de los oncogenes virales del VPH-18. Se observaron amplicones correspondientes a los tamaños esperados de E5 y E7 de 103 y 107 pb, respectivamente (ver figura 4). Las células HaCaT transducidas con los oncogenes virales del VPH-18 presentaron una morfología bastante distinta a la de las células parentales. Las células transducidas con E5 presentaron una morfología elongada y aplanada en comparación con las células transducidas con los oncogenes E6 y E7 y cotransducidas con E5/E6/E7. Éstas últimas exhibieron un fenotipo intermedio entre HaCaT E5-18 y HaCaT E6/E7-18 (ver figura 6).

5.3. Efectos de los oncogenes virales en la viabilidad y proliferación de las células HaCaT.

Para medir la viabilidad celular se llevó a cabo un ensayo colorimétrico que emplea el reactivo de MTT. Este ensayo mide la viabilidad celular reduciendo el reactivo MTT a un producto coloreado insoluble llamado formazán que forma cristales en la célula y de esta forma se obtiene una medida estimativa de la viabilidad celular. Los resultados obtenidos indican que las células co-transducidas con los tres oncogenes virales del VPH-18 E5/E6/E7 presentaron una absorbancia mayor a 570 nm, lo cual indica un aumento significativo en el número de células viables comparado con las células HaCaT transducidas solamente con E6/E7 o con E5, y con respecto a las células control HaCaT (ver figura 7A). También se observó que E5 y E6/E7 del VPH-18 por separado contribuyen al aumento en la viabilidad celular de forma significativa con respecto al control HaCaT,

ver figura 7A. Estos resultados indican un incremento en el número de células viables en particular en células expresando E5/E6/E7 con respecto al control y al resto de las líneas celulares. Se puede apreciar una tendencia en la gráfica (ver figura 7A), hacia una cooperación sinérgica entre los tres oncogenes virales, pero no es del todo clara, podría tratarse de una cooperación aditiva.

Por otra parte, se realizó una curva de proliferación celular por el método del conteo en cámara de Neubauer durante cuatro días. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la proliferación entre las cuatro líneas celulares de trabajo, aunque sí se reportó una tendencia de HaCaT E5/E6/E7-18 a duplicarse más que las células HaCaT parentales (ver figura 7B). Todas las líneas celulares presentaron un Tiempo de Duplicación (*Doubling Time*) similar, HaCaT (DT = 25,32 h), HaCaT E5-18 (DT = 26,47 h), HaCaT E6/E7-18 (DT = 25,95 h), HaCaT E5/E6/E7-18 (DT = 22,38 h) que se encuentra en el orden de las 24 horas.

5.4. Efecto de los oncogenes virales en la capacidad migratoria e invasiva de las células HaCaT.

Para evaluar el efecto sinérgico de las oncoproteínas E5, E6 y E7 en la migración celular se llevó a cabo el ensayo de *Wound Healing* o *Scratch Assay* (“Ensayo de la Herida”) en las 4 líneas celulares de estudio, y se comparó la capacidad migratoria de células que poseen solamente E5 o E6/E7, las que poseen los tres oncogenes E5/E6/E7, y sin los mismos (control). Luego de realizada la herida se tomaron fotografías de las distintas líneas celulares a tiempo 0. Después de 24 horas se volvieron a tomar fotografías de las mismas zonas en la monocapa para ser cuantificadas por computadora. Los resultados de este experimento mostraron un incremento significativo en la migración celular de las células transducidas solamente con E6/E7 del VPH-18 con respecto a las células transducidas con E5 solo (ver figura 8A). También se observa que E5 tiende a disminuir la migración celular con respecto al control, mientras que E6/E7 tiende a estimularla. La suma de estas tendencias antagónicas se ven reflejadas en el comportamiento de E5/E6/E7 que presenta un fenotipo intermedio entre E5 y E6/E7.

Para estudiar la invasión celular se realizó un ensayo *transwell* por medio de un kit comercial que emplea una matriz de colágeno. Como se muestra en la figura 8B, las células HaCaT transducidas con los oncogenes E5/E6/E7 del VPH-18 presentaron un mayor potencial invasivo que el resto de las líneas celulares de trabajo. Esto fue corroborado mediante un análisis estadístico el cual mostró que los tres oncogenes en su conjunto aumentan de manera significativa la capacidad invasiva de esta línea celular con respecto a HaCaT y a HaCaT E5-18 (ver figura 8B).

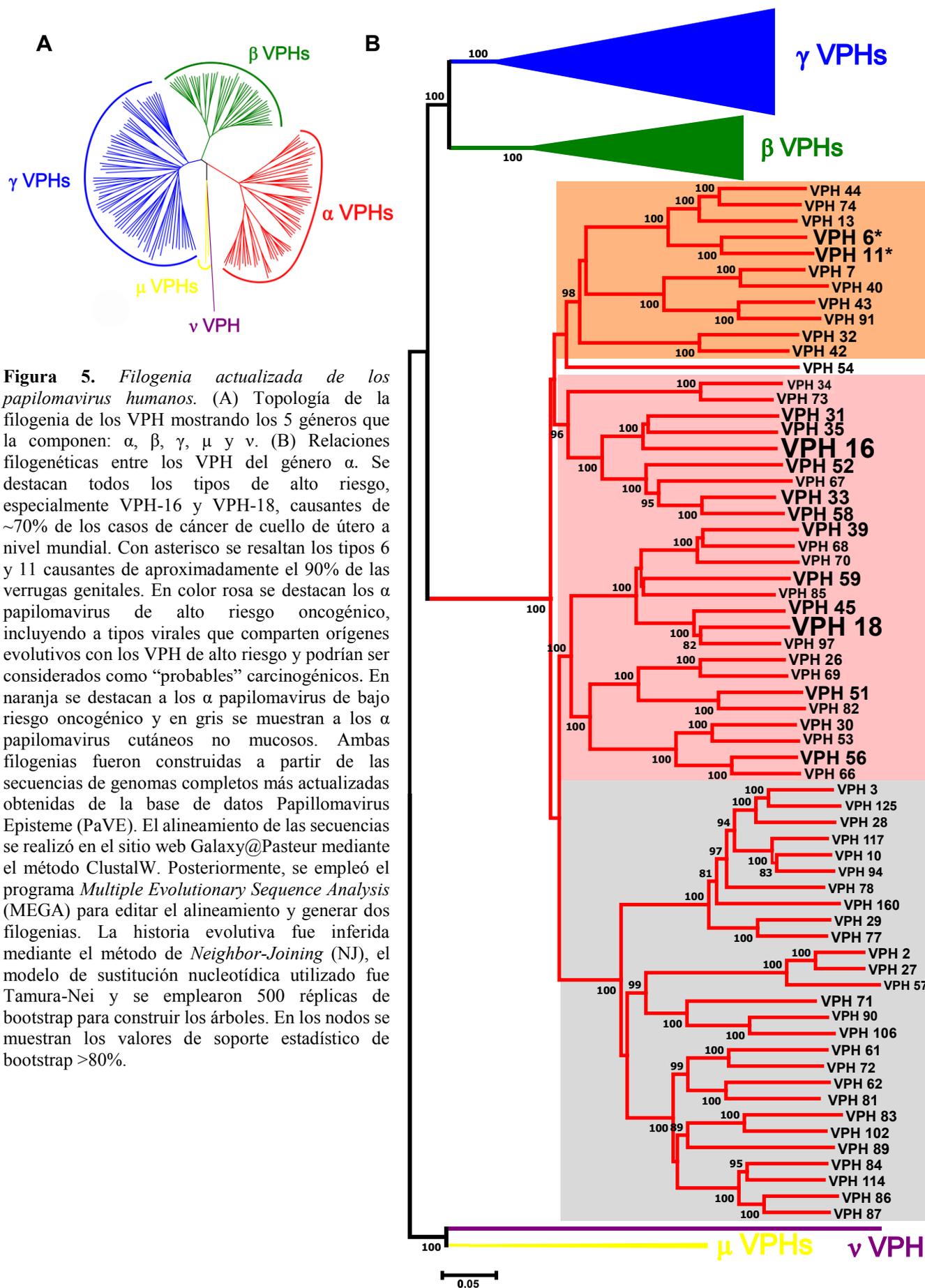


Figura 5. Filogenia actualizada de los papilomavirus humanos. (A) Topología de la filogenia de los VPH mostrando los 5 géneros que la componen: α , β , γ , μ y ν . (B) Relaciones filogenéticas entre los VPH del género α . Se destacan todos los tipos de alto riesgo, especialmente VPH-16 y VPH-18, causantes de ~70% de los casos de cáncer de cuello de útero a nivel mundial. Con asterisco se resaltan los tipos 6 y 11 causantes de aproximadamente el 90% de las verrugas genitales. En color rosa se destacan los α papilomavirus de alto riesgo oncogénico, incluyendo a tipos virales que comparten orígenes evolutivos con los VPH de alto riesgo y podrían ser considerados como “probables” carcinogénicos. En naranja se destacan a los α papilomavirus de bajo riesgo oncogénico y en gris se muestran a los α papilomavirus cutáneos no mucosos. Ambas filogenias fueron construidas a partir de las secuencias de genomas completos más actualizadas obtenidas de la base de datos Papillomavirus Episteme (PaVE). El alineamiento de las secuencias se realizó en el sitio web Galaxy@Pasteur mediante el método ClustalW. Posteriormente, se empleó el programa *Multiple Evolutionary Sequence Analysis* (MEGA) para editar el alineamiento y generar dos filogenias. La historia evolutiva fue inferida mediante el método de *Neighbor-Joining* (NJ), el modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue Tamura-Nei y se emplearon 500 réplicas de bootstrap para construir los árboles. En los nodos se muestran los valores de soporte estadístico de bootstrap >80%.

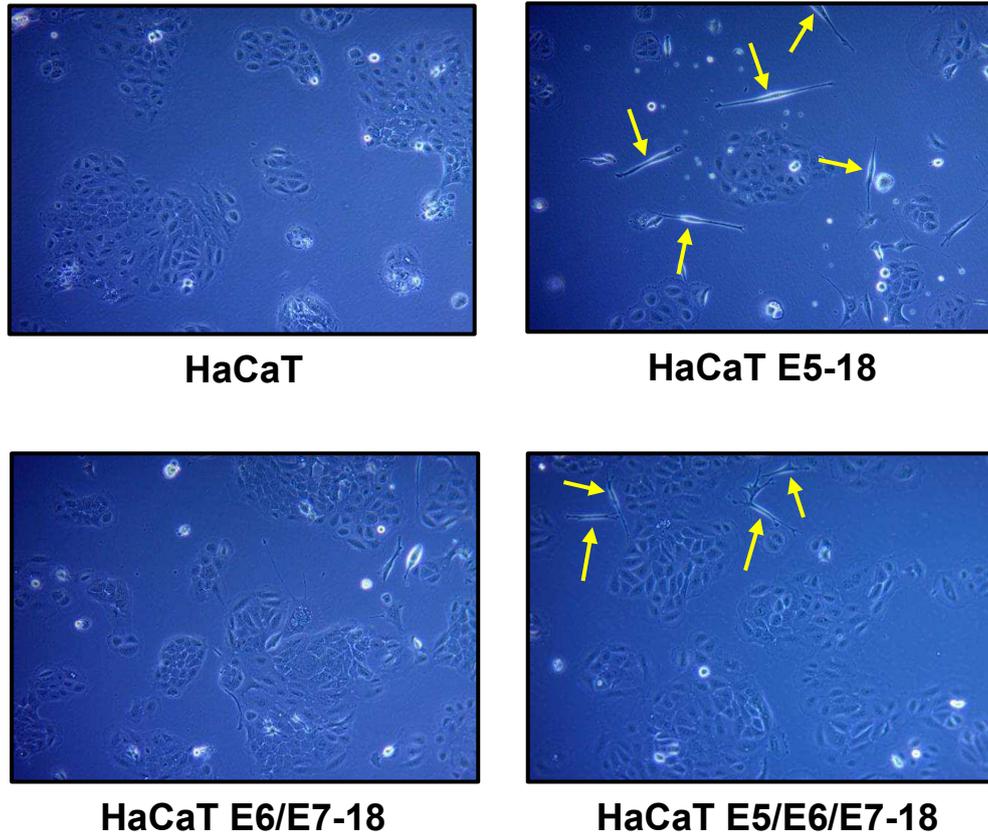


Figura 6. Morfología de las líneas celulares estables HaCaT generadas por la transducción de los oncogenes virales E5, E6 y E7 del VPH-18. La morfología de las cuatro líneas celulares de trabajo (HaCaT, HaCaT E5-18, HaCaT E6/E7-18 y HaCaT E5/E6/E7-18) fue analizada por microscopía de contraste de fases empleando un microscopio Zeiss Primovert. Aumento 10x. Las flechas amarillas señalan las células que presentan un fenotipo ahusado en la línea celular transducida con E5-18 y E5/E6/E7-18. Todas estas fotografías fueron tomadas por la Dra. Jimena Hochmann en el marco de su pasantía en Brasil.

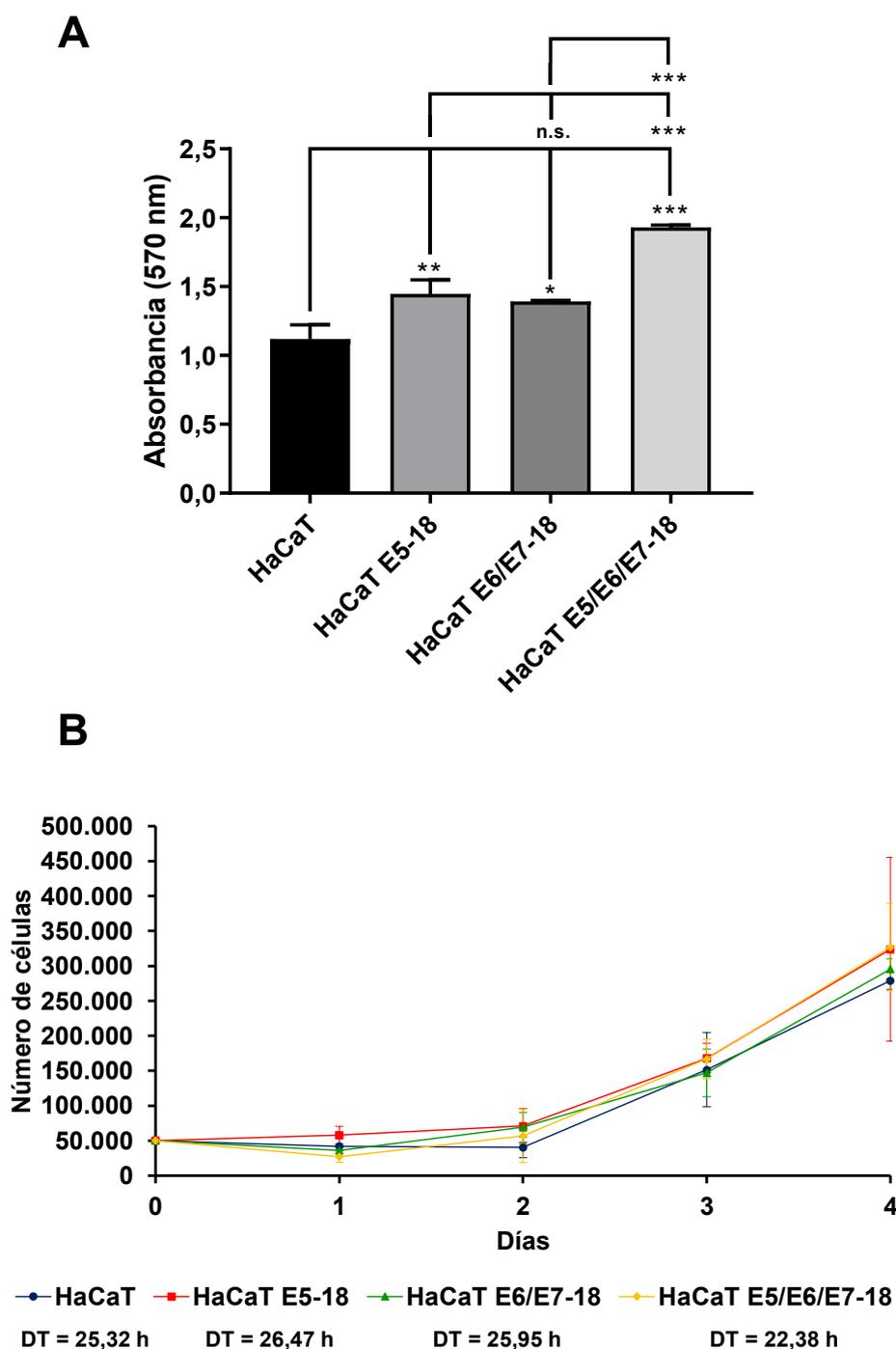


Figura 7. Efecto de los oncogenes virales E5, E6 y E7 en la viabilidad y proliferación celular de las células HaCaT. (A) Un total de $8,0 \times 10^3$ células HaCaT parentales o transducidas con los oncogenes virales fue sembrada en placas de 96 pocillos por 48 horas a 37°C , 5% de CO_2 , luego se midió la absorbancia a 570 nm. Tres experimentos independientes fueron realizados por triplicado. Se muestra la media \pm desvío estándar para cada línea celular ($n = 3$). Se realizó un test de ANOVA de una sola vía para evaluar la significancia estadística entre grupos junto con la prueba HSD de Tukey para evaluar diferencias grupo a grupo. (n.s.) no significativo, (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,001$. (B) Curva de proliferación celular realizada por el método de conteo en cámara de Neubauer. Un total de $5,0 \times 10^4$ células correspondientes a las líneas celulares de trabajo fueron plaqueadas en 8 placas de 6 pocillos cada una (cada placa fue numerada de forma correspondiente a un día distinto del experimento: día 1, día 2, día 3 y día 4) y se contaron los pocillos correspondientes a esa placa. Las placas fueron incubadas a 37°C , 5% de CO_2 . Se muestra la media \pm desvío estándar ($n = 3$) y el Tiempo de Duplicación (DT) para cada línea celular.

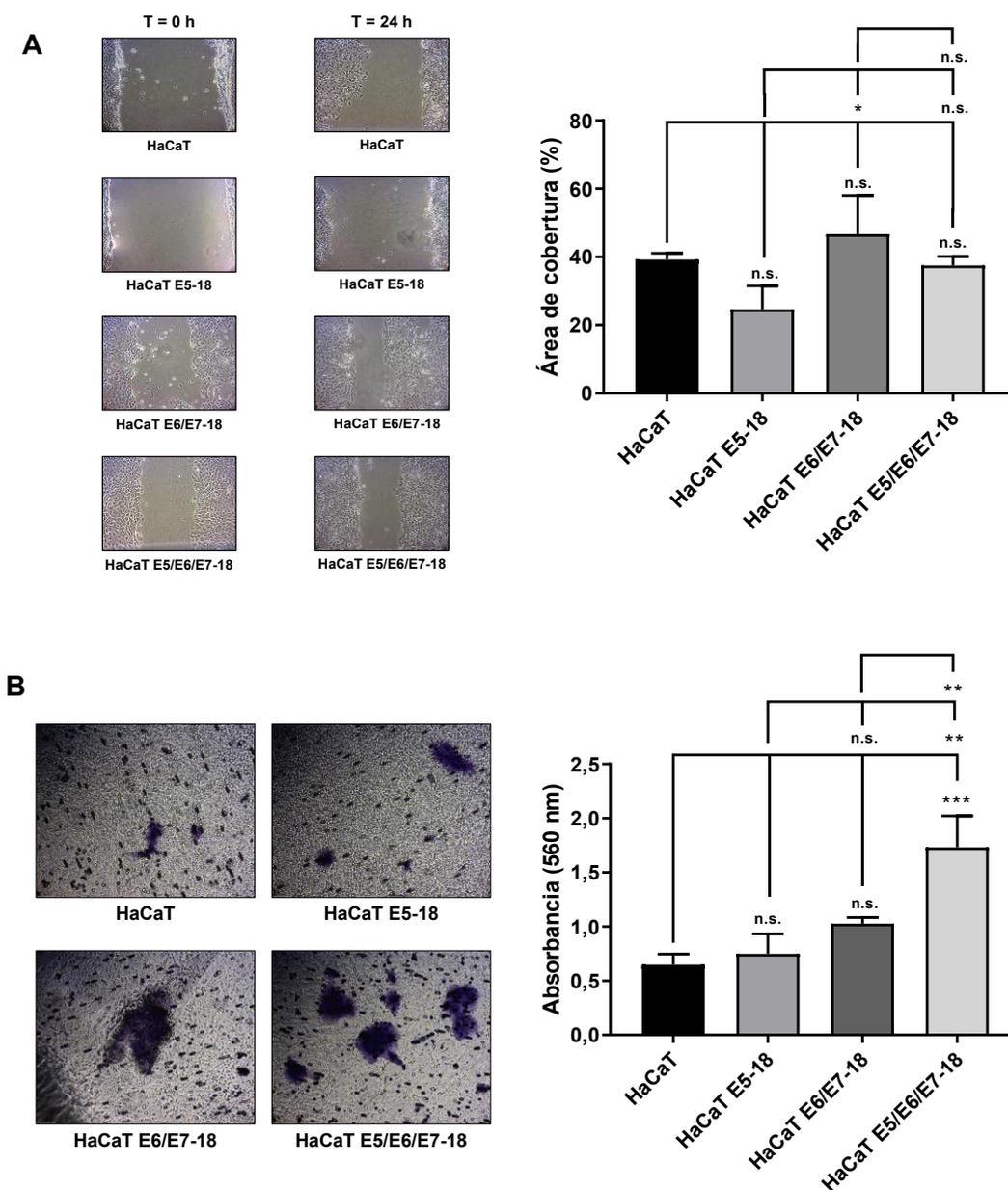


Figura 8. Efectos de los oncogenes virales E5, E6 y E7 del VPH-18 en la migración e invasión de las células HaCaT. (A) Ensayo de migración celular empleado para evaluar la capacidad migratoria de las células. Un total de $6,0 \times 10^5$ células pertenecientes a las líneas celulares de trabajo HaCaT, HaCaT E5-18, HaCaT E6/E7-18 y HaCaT E5/E6/E7-18 fueron plaqueadas por triplicado en placas de 12 pocillos y se las dejó crecer hasta una confluencia del 90%. Luego se realizó una “herida” en la monocapa con la punta de un tip de forma recta en el pocillo. Se dejaron las células incubando en la estufa por 24 horas. Pasadas 24 horas se tomaron 6 fotografías de cada pocillo, para cada línea celular en un microscopio invertido, y luego se realizó la cuantificación de la migración celular. Izquierda: fotografías de las heridas en las monocapas celulares a tiempo cero y 24 horas después, aumento 10x. Derecha: cuantificación del área de cobertura de la herida. Se muestra la media \pm desvío estándar ($n = 3$). (B) El potencial invasivo de las líneas celulares fue evaluado utilizando un ensayo de transwell que emplea una matriz de colágeno. Un total de $9,0 \times 10^5$ células fueron plaqueadas en cada inserto conteniendo medio DMEM baja glucosa sin suero, el pocillo correspondiente a cada inserto fue llenado con medio DMEM con 10% de SFB que actúa como quimioatrayente y las placas fueron incubadas a 37°C por 48 horas. Las células que invadieron la matriz de colágeno fueron visualizadas en un microscopio invertido. Dos experimentos independientes fueron realizados en triplicado. Izquierda: fotografías de los insertos con las células que invadieron la matriz de colágeno, aumento 10x. Derecha: cuantificación de los resultados obtenidos del ensayo de invasión celular. Se muestra la media \pm desvío estándar ($n = 3$). En ambos experimentos se realizó un test ANOVA de una sola vía seguido por la prueba HSD de Tukey para determinar las diferencias entre los grupos. (n.s.) no significativo, (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,001$.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se logró comprobar por primera vez la cooperación entre los oncogenes virales E5, E6 y E7 del VPH-18 en algunas características clave del proceso carcinogénico como la proliferación celular excesiva, migración celular e invasión celular en una línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente (HaCaT). Para ello, se realizaron diferentes ensayos que miden cada uno de estos parámetros por separado y los resultados obtenidos arrojaron información inédita sobre el comportamiento *in vitro* en la línea celular HaCaT de los ya mencionados oncogenes virales. También se realizó la construcción de una filogenia actualizada de los α papilomavirus humanos para elucidar posibles nuevas relaciones filogenéticas entre los tipos que componen a este género en particular.

Con respecto al análisis filogenético (ver figura 5), se puede observar que dentro del grupo de α papilomavirus de alto riesgo oncogénico hay dos clados bien definidos, lo cual sugiere patrones de divergencia evolutiva diferente entre el VPH-16 y el VPH-18. Sin embargo, Willemsen *et al.*, 2019, argumentan en su trabajo la posibilidad de un origen común entre las oncoproteínas E5 de los α papilomavirus mucosotrópicos (Willemsen *et al.*, 2019). Debido a que el alineamiento empleado para realizar la filogenia es de genoma completo, hay que tener en cuenta que se está analizando la historia evolutiva de todo el genoma viral y no simplemente de un ORF en particular como E5, lo cual puede dar lugar a incongruencias con otras filogenias en las cuales solamente se examina un ORF en particular.

Debido a que nuestros resultados muestran que las células HaCaT conteniendo el oncogén E5 del VPH-18 presentaron una morfología ahusada (ver figura 6), es que posiblemente este fenotipo observado se deba a una probable remodelación del citoesqueleto de actina. Estos resultados validan los datos reportados por Liao *et al.* 2012 en el cual reportaron que E5 del VPH-16 y VPH-18 en células cancerígenas (SiHa y HeLa) aumentan la expresión de paxilina fosforilada, una proteína altamente expresada en las adhesiones focales, estrechamente relacionada con la motilidad celular y la regulación de los filamentos de actina. Estos resultados obtenidos por Liao *et al.* 2012 podrían estar relacionados con la morfología ahusada más mesenquimal que observamos en una población de células de la línea celular que expresan E5 del VPH-18 (ver figura 6). Sin embargo, no es posible afirmar con certeza que esta sea la causa del fenotipo observado, ya que se necesitaría caracterizar la estructura de los filamentos de actina de esta población celular mediante el marcado con faloidina-rodamina y medir la expresión de p-paxilina en todas las líneas celulares.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la cooperación entre los tres oncogenes virales E5/E6/E7 de VPH-18 aumentan de forma significativa la viabilidad de las células, detectada por el ensayo de MTT (ver figura 7A). Por otra parte, en el ensayo de proliferación celular realizado por conteo en cámara de Neubauer (ver figura 7B), no se observan diferencias significativas en el Tiempo de Duplicación (DT) entre las diferentes líneas celulares, sin embargo, se observa una tendencia de un aumento en el número de células para la línea celular transducida con los tres oncogenes del VPH-18 con respecto al resto de las células. Cabe destacar

que ambos métodos miden procesos celulares diferentes pero complementarios, y por ende brindan diferente información. El ensayo de MTT mide el número de células viables, mientras que por el método del conteo en cámara de Neubauer se puede obtener una medida aproximada de la proliferación celular. Estos resultados contradicen en parte a los de Boulenouar *et al.* en cual se reporta que E5 del VPH-16 afecta la viabilidad celular, pero no así E6 y E7, que favorecen el crecimiento celular y neutralizan la actividad citotóxica de E5 (Boulenouar *et al.*, 2010). Cabe destacar que en ese trabajo se emplearon como modelo de estudio células tipo trofoblásticas (BeWo), las cuales comparten varias características con células cancerígenas como una alta tasa de multiplicación celular, crecimiento independiente de anclaje y elevada capacidad de invasión de otros tejidos circundantes (revisado por Ross, 2014).

Estas observaciones pueden explicar las diferencias con nuestro proyecto, ya que como modelo de estudio se emplearon queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente de la línea celular HaCaT, que son células transformadas no tumorigénicas, con una capacidad de migración e invasión limitada. Sin embargo, otro trabajo como el de Liao *et al.* 2012 reporta que E5 de los tipos 16 y 18 aumentan tanto la proliferación celular, como la migración y la invasión en las líneas celulares SiHa y HeLa; lo cual valida parte de los resultados obtenidos en este trabajo en donde se observa que la línea celular HaCaT E5-18 aumenta de forma significativa la viabilidad medida por ensayo MTT con respecto al control HaCaT y también contribuye al aumento de la proliferación en la línea que expresa los tres oncogenes.

En cuanto a la migración celular (ver figura 8A), los resultados obtenidos indican que E6 y E7 del VPH-18 estimulan la migración celular, mientras que no se observan diferencias significativas de E5 con respecto al control HaCaT ni con el resto de las líneas celulares de estudio. Estos resultados se contraponen a lo observado por Boulenouar *et al.*, Liao *et al.* y Kivi *et al.* en donde se aprecia que E5 del VPH-16 estimula la migración celular (Kivi *et al.*, 2008; Boulenouar *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2012). Con respecto a lo observado por Boulenouar *et al.* y Liao *et al.*, se puede argumentar nuevamente que el modelo de estudio celular difiere con el empleado en este proyecto, también en el caso de Boulenouar *et al.* se empleó otro ensayo para medir la capacidad de migración de las células lo cual puede explicar las discrepancias entre los resultados obtenidos. Otra posibilidad es que haya diferencias entre el potencial oncogénico de E5-18 con respecto a E5-16, lo cual no ha sido aún reportado en la literatura. Se podría corroborar esta hipótesis comparando el comportamiento de dos líneas celulares, una transducida con el oncogén de E5-16 y otra con E5-18, en diferentes procesos del desarrollo carcinogénico como la proliferación, migración e invasión celular.

Luego se evaluó la capacidad invasiva de las diferentes líneas celulares de estudio: HaCaT, HaCaT E5-18, HaCaT E6/E7-18 y HaCaT E5/E6/E7-18 mediante un ensayo *transwell* empleando una matriz de colágeno. La línea celular transducida con los tres oncogenes virales fue la que presentó una mayor capacidad invasiva comparada con el resto de las líneas celulares (HaCaT E5-18, HaCaT E6/E7-18) y con respecto al control sin ningún oncogén (HaCaT) (ver figura 8B). Parte de nuestros resultados se corroboran con trabajos anteriores en donde se demuestra que los tres oncogenes (E5/E6/E7) del VPH-16 cooperan entre sí para aumentar la capacidad

invasiva de las células (Boulenouar *et al.*, 2010). Trabajos recientes como el de Weschler *et al.* y Liao *et al.* sugieren que E5 juega un papel muy importante en la inducción de la invasión celular. Weschler *et al.* argumenta que la sobreexpresión de EGFR estimulada por E5 es un proceso clave en la progresión a malignidad.

Además, Weschler *et al.*, también demuestra la importancia de la cooperación entre los oncogenes virales de VPH-16 mediante ensayos de *knock down* por ARN de interferencia (ARNi), en los cuales se observa que cuando E5 es silenciado esto lleva a la reducción de la expresión de E6 y E7 en un 99%, acompañado de una reducción significativa en el potencial invasivo de las células transfectadas con E5-ARNi. Resaltando, de esta forma, la importancia de E5 del VPH-16 en la invasión celular (Weschler *et al.*, 2018). Cabe destacar que los oncogenes de los VPH son transcritos en un ARNm policistrónico que posteriormente sufre “splicing” alternativo para generar múltiples mensajeros distintos. Este mecanismo podría explicar el hecho de que el silenciamiento de E5 también silencie a E6 y E7, y que por ende se vea afectada la cooperación entre los tres oncogenes virales.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo pionero, sugieren por primera vez la existencia de una cooperación entre los oncogenes virales E5, E6 y E7 del VPH-18 en la inducción de un fenotipo celular más oncogénico. También cabe destacar la importancia de E5 del VPH-18 en este proceso y en como contribuye de manera significativa en la transformación maligna de queratinocitos humanos inmortalizados.

7. PERSPECTIVAS

Como perspectiva más importante de este trabajo se pretende analizar la expresión de vimentina y E-cadherina, los cuales son marcadores de la transición epitelio-mesénquima (EMT), con el objetivo de complementar los ensayos de migración e invasión celular previamente realizados. Además, se estudiará la expresión de 84 proteínas relacionadas al cáncer mediante el uso de un array de proteínas comercial (Human XL Oncology Array Kit) R&D Systems. Esto permitirá elucidar si existen diferencias en la expresión de las diferentes proteínas relacionadas al proceso carcinogénico entre las diferentes líneas celulares. Finalmente, nos planteamos realizar un ensayo de transformación celular *in vitro* mediante el ensayo de formación de colonias en *soft agar* para medir el crecimiento independiente de anclaje en las diferentes líneas celulares. De esta manera, podremos obtener información de sumo interés para comprender mejor el proceso de transformación maligna, complementando la información obtenida en el presente trabajo.

8. REFERENCIAS

- Al Moustafa, A. E. (2015).** E5 and E6/E7 of high-risk HPVs cooperate to enhance cancer progression through EMT initiation. *Cell Adhesion & Migration*, 9(5), 392-393. doi:10.1080/19336918.2015.1042197
- Alam, S., Conway, M. J., Chen, H. S., y Meyers, C. (2008).** The cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene enhances human papillomavirus synthesis. *Journal of Virology*, 82(2), 1053-1058. doi: 10.1128/JVI.01813-07
- Bedell, M. A., Jones, K. H., y Laimins, L. A. (1987).** The E6-E7 Region of Human Papillomavirus Type 18 Is Sufficient for Transformation of NIH3T3 and Rat-1 Cells. *Journal of Virology*, 61(11), 3635-3640. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC255968/>
- Berois, N., De Cremoux, P., Mazal, D., Sica, A., Cedeira, M., Caserta, B., Barrios, E., Osinaga, E., y Sastre-Garau, X. (2013).** Prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus genotypes in invasive carcinoma of the uterine cervix in Uruguay. *International Journal of Gynecological Cancer*, 23(3), 527-532. doi:10.1097/IGC.0b013e318285e753
- Berridge, M. V., y Tan, A. S. (1993).** Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), 474-482. doi:10.1006/abbi.1993.1311
- Boulenouar, S., Weyn, C., Van Noppen, M., Moussa Ali, M., Favre, M., Delevenne, P., Bex, F., Noel, A., Englert, Y., y Fontaine, V. (2010).** Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion. *Carcinogenesis*, 31(3), 473-480. doi:10.1093/carcin/bgp281
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., y zur Hausen, H. (2004).** Classification of Papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27. doi:10.1016/j.virol.2004.03.033
- DiMaio, D., y Petti, L. (2013).** The E5 proteins. *Virology*, 445(1-2), 99-114. doi:10.1016/j.virol.2013.05.006
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., y Stanley, M. A. (2012).** The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30(5), 55-70. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083
- Estêvão, D., Rios Costa, N., Gil da Costa, R., y Medeiros, R. (2019).** Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862, 153-162. doi:10.1016/j.bbagrm.2019.01.001

-
- Harden, M., y Münger, K. (2016).** Human Papillomavirus Molecular Biology. *Mutation Research*, 3-12. doi:10.1016/j.mrrev.2016.07.002
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K., Hubbert, N., Lowy, D., y Schiller, J. (1987).** HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *The EMBO Journal*, 8(12), 3905-3910. doi:10.1002/j.1460-2075.1989.tb08570.x
- Hildsheim, A., Schiffmann, M. A., Gravitt, P. E., Glass, A. G., Greer, C. E., Zhang, T., Scott, D. R., Rush, B. B., Lawler, P., Sherman, M. E., Kurman, R. J., y Manos, M. M. (1994).** Persistence of Type-Specific Human Papillomavirus Infection among Cytologically Normal Women. *The Journal of Infectious Diseases*, 169(2), 235-240. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8106758>
- Hochmann, J., Sobrinho, J., Villa, L., y Sichero, L. (2016).** The Asian-American variant of human papillomavirus type 16 exhibits higher activation of MAPK and PI3K/AKT signaling pathways, transformation, migration and invasion of primary human keratinocytes. *Virology*, 492, 145-154. doi:10.1016/j.virol.2016.02.015
- Hoppe-Seyler, K., Bossler, F., Braun, J., Herrmann, A., y Hoppe-Seyler, F. (2018).** The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends in Microbiology*, 26(2), 158-168. doi:10.1016/j.tim.2017.07.007
- Kivi, N., Greco, D., Auvinen, P., y Auvinen, E. (2008).** Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene*, 27(18), 2532-2541. doi:10.1038/sj.onc.1210916
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016).** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874. doi:10.1093/molbev/msw054
- Kwasniewski, W., Wolun-Cholewa, M., Kotarski, J., Warchol, W., Kuzma, D., Kwasniewska, A., y Gozdicka-Jozefiak, A. (2018).** Microbiota dysbiosis is associated with HPV-induced cervical carcinogenesis. *Oncology Letters*, 16(6), 7035-7047. doi:10.3892/ol.2018.9509
- Liao, S., Deng, D., Zhang, W., Hu, X., Wang, W., Wang, H., Lu, Y., Wang, S., Meng, L., y Ma, D. (2012).** Human papillomavirus 16/18 E5 promotes cervical cancer cell proliferation, migration and invasion in vitro and accelerates tumor growth in vivo. *Oncology Reports*, 29, 95-102. doi:10.3892/or.2012.2106
- McBride, A. (2017).** Oncogenic human papillomaviruses. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Biological Sciences*, 372(1732), 20160273. doi:10.1098/rstb.2016.0273

- Moody, C., y Laimins, L. (2010).** Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10(8), 550-560. doi:10.1038/nrc2886
- Münger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M., y Schlegel, R. (1989).** The E6 and E7 Genes of the Human Papillomavirus Type 16 Together Are Necessary and Sufficient for Transformation of Primary Human Keratinocytes. *Journal of Virology*, 63(10), 4417-4421. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC251060/>
- Oyervides-Muñoz, M. A., Pérez-Maya, A. A., Rodríguez-Gutiérrez, H. F., Gómez-Macías, G., Fajardo-Ramírez, O. R., Treviño, V., Barrera-Saldaña, H. A., Garza-Rodríguez, M. L. (2018).** Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. *Infection, Genetics and Evolution*, 61, 134-144. doi: 10.1016/j.meegid.2018.03.003
- Payne, S. (2017).** Family *Papillomaviridae*. En *Viruses: From Understanding to Investigation*. Academic Press Elsevier.
- Pinheiro Araldi, R., Araujo Sant'Ana, T., Grado Mórdolo, D., Correa de Melo, T., Spadacci-Morena, D. D., de Casia Stocco, R., Cerutti, J., y Barreiros de Souza, E. (2018).** The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1537-1556. doi:10.1016/j.biopha.2018.06.14
- Prati, B., Marangoni, B., y Boccardo, E. (2018).** Human papillomavirus and genome instability: from productive infection to cancer. *Clinics*, 73(1), 1-9. doi:10.6061/clinics/2018/e539s
- Ross, C. (2014).** The Trophoblast Model of Cancer. *Nutrition and Cancer*, 67(1), 61-67. doi:10.1080/01635581.2014.956257
- Ryu, W.-S. (2017).** Papillomaviruses. En *Molecular Biology of Human Oncogenic Viruses* (págs. 97-109). Academic Press Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-800838-6.00007-2
- Sahab, Z., Sudarshan, S., Liu, X., Zhang, Y., Kirilyuk, A., Kamonjoh, C., Simic, V., Dai, Y., Byers, S., Doorbar, J., Suprynowicz, F., y Schlegel, R. (2012).** Quantitative measurement of human papillomavirus type 16 e5 oncoprotein levels in epithelial cell lines by mass spectrometry. *Journal of Virology*, 86(17), 9465–9473. doi:10.1128/JVI.01032-12
- Saitou, N., y Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425. doi:<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

- Schiffmann, M., Doorbar, J., Wetzensen, N., de Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B., Stanley, M., y Franchesi, S. (2016).** Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, Article number: 16086. doi:10.1038/nrdp.2016.86.
- Serrano, B., Brotons, M., Bosch, F. X., y Bruni, L. (2018).** Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 47, 14-26. doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.08.006
- Shanmugasundaram, S., y You, J. (2017).** Targeting Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses*, 9(8), 2-14. doi:10.3390/v9080229
- Stöppler, M., Straight, S. W., Tsao, G., Schlegel, R., y McCance, D. J. (1996).** The E5 Gene of HPV-16 Enhances Keratinocyte Immortalization by Full-Length DNA. *Virology*, 223(1), 251-254. doi:10.1006/viro.1996.0475
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., y Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*, 22(22), 4673-4680. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308517/>
- Valle, G., y Banks, L. (1987).** The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *Journal of General Virology*, 61(11), 1239-1245.
- Van Doorslaer, K. (2013).** Evolution of the Papillomaviridae. *Virology*, 445(1-2), 11-20. doi:10.1016/j.virol.2013.05.012
- Venuti, A., Paolini, F., Nasir, L., Corteggio, A., Roperto, S., Campo, M., y Borzacchiello, G. (2011).** Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Molecular Cancer*, 10(140), 1-18. doi: 10.1186/1476-4598-10-140
- Villa, L., Sichero, L., Rahal, P., Caballero, O., Ferenczy, A., Rohan, T., y Franco, E. (2000).** Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *Journal of General Virology*, 81(12), 2959-2968. doi:10.1099/0022-1317-81-12-2959
- Walboomers, J., Jacobs, M., Manos, M., Xavier Bosch, F., Alain Kummer, J., Shah, K., Snijders, P., Peto, J., Meijer, C., y Muñoz, N. (1999).** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*, 189(1), 12-19. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F

- Weschler, E., Tugizov, S., Herrera, R., Da Costa, M., y Palefsky, J. (2018).** E5 can be expressed in anal cancer and leads to epidermal growth factor receptor-induced invasion in a human papillomavirus 16-transformed anal epithelial cell line. *Journal of General Virology*, *99*(5), 631-644. doi:10.1099/jgv.0.001061
- Willemsen, A., Féliz-Sánchez, M., y Bravo, I. G. (2019).** Genome Plasticity in Papillomaviruses and De Novo Emergence of E5 Oncogenes. *Genome Biology and Evolution*, *11*(6), 1602-1617. doi:10.1093/gbe/evz095
- Xue, J., Vesper, B., y Radosevich, J. (2012).** Proteins Encoded by the Human Papillomavirus Genome and Their Functions. En J. Radosevich, *HPV and Cancer* (págs. 17-34). Springer. doi:10.1007/978-94-007-5437-9

9. LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ALT	Vía alternativa de alargamiento de los telómeros.
ANOVA	Análisis de la Varianza.
ARNi	ARN de interferencia.
CBP	Proteína de unión a CREB.
CCU	Cáncer de Cuello de Útero.
cDNA	ADN copia.
Cdks	Quinasas dependientes de ciclinas.
DAG	Diacilglicerol.
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DT	Tiempo de duplicación.
ECM	Matriz extracelular.
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
EMT	Transición epitelio-mesénquima.
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas.
FasL	Fas Ligando.
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GLOBOCAN	Observatorio Global del Cáncer.
HDAC	Desacetilasas de las histonas.
hTERT	Subunidad catalítica de la telomerasa humana.
IARC	Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer.
INCA	Instituto Nacional del Cáncer.
LCR	Región larga de control no codificante.
MSCV-N	Murine Stem Cell Virus.
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NJ	Neighbor-Joining.
ORF	Marco abierto de lectura.
PaVE	Papillomavirus Episteme.
PCKs	Proteínas quinasas C.
PRR	Papilomatosis Respiratoria Recurrente.
SD	Desvío estándar.
SFB	Suero Fetal Bovino.
TN93	Tamura-Nei 93.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa.
VPH	Virus del Papiloma Humano.