



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Análisis de los efectos de la expresión de la proteína E5 de  
VPH16 sobre los procesos de auto-renovación y diferenciación  
temprana en queratinocitos humanos inmortalizados”**

**T E S I S**

**Que presenta**

**M. EN C. ALICIA MARÍA REVELES ESPINOZA**

**Para obtener el grado de**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE  
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Director de Tesis**

**DR. JOSÉ EFRAÍN GARRIDO GUERRERO**

**Ciudad de México**

**ENERO, 2018**

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación en Biología Molecular y Celular del Cáncer (Lab. No. 1) del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección del Dr. José Efraín Garrido Guerrero y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante los fondos del proyecto CB256514.

Durante el desarrollo de este trabajo, la autora fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de registro: 268289. Por lo que manifiesta un sincero agradecimiento al CONACyT por el apoyo económico brindado, sin el cual no habría podido realizar los estudios de Doctorado.

*"El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar.  
Es la fuente de todo arte y ciencia verdaderos"*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por todo..., por permitirme existir en este tiempo y espacio, y acompañarme en cada momento.

Al **Dr. Efraín Garrido Guerrero**, por aceptarme en su equipo de trabajo, por su apoyo y guía a lo largo de la presente investigación, y por participar en mi formación académica y personal.

A la **Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez**, por su asesoría y consejos, que fueron de gran ayuda para el desarrollo de este trabajo.

Al **Dr. Glustein Pozo Molina**, por su participación y asesoría en el desarrollo del presente trabajo; y por su amistad.

A los **Dres. Humberto Lanz Mendoza, Rosa María Bermúdez Cruz y Bulmaro Cisneros Vega**, por darle seguimiento al presente trabajo y por sus sugerencias para mejorarlo.

Al **M. en C. Victor Manuel Jonathan Cardoso Jaime**, con quien tuve la oportunidad de trabajar y aprender juntos, por su colaboración en este trabajo, y por su amistad.

Al **Lic. Daniel Arturo Rangel de León**, por permitirme ser su asesora de tesis y aprender, por su amistad.

A **mis amigos y compañeros del lab. 1 de GyBM**, con quienes tuve la oportunidad de convivir y pasar buenos momentos, y que de una u otra forma me apoyaron durante mi estancia en el laboratorio: Alberto, Ángeles, Vicky, Janet, Jairo, Alfredo, Alejandra, Gloria, Jessica, Rocío, Vania y Yánerit.

A **mis amigos de la maestría**, quienes siempre me brindaron su apoyo, amistad sincera y gratos momentos: Eva, Marcela, Érika, Víctor, Lety, Eloy, Mary Carmen y Moisés.

Al **Biol. Pedro Chávez Olmos**, por compartirme de sus amplios conocimientos tanto técnicos, académicos y de cultura general; por sus anécdotas y buen sentido del humor.

A **Bianca Hernández Martínez**, por su apoyo con el material y limpieza del laboratorio, por sus consejos y buenas charlas que siempre fueron muy positivos.

A **mis amigos y conocidos de GyBM**, Marco, Sandra, Angélica, Manuel, Mine, Liz, Juan, Paulina, Pablo y Enrique.

Al **M. en C. Víctor Hugo Rosales y a la Unidad de Citometría de Flujo del LANSE**, por permitirme emplear los citómetros de flujo, por su ayuda y asesoría en el uso de éstos.

Al **M. en C. Iván J. Galván y a la Unidad de Microscopía Confocal del LANSE**, por permitirme utilizar el microscopio confocal.

A **Gabriela Mora Macías**, por su asesoría y ayuda con los trámites necesarios durante mi estancia en el posgrado.

A todas las personas que me apoyaron para que esto fuera posible.

## DEDICATORIA

Al amor de mi vida, **mi esposo Jesús Arturo**, por *coincidir...*, por brindarme cada día su amor, apoyo y motivación, que me han ayudado a cerrar este ciclo de mi vida.

A **mi mamá Alicia**, por ser toda una guerrera que con sus consejos, apoyo y cariño incondicionales me ha ayudado a salir adelante, y me ha enseñado a levantarme y continuar.

A **mi papá Cosme**, porque su ejemplo ha perdurado todo este tiempo, y me enseñó a no decir “no puedo”, sino que los límites los pongo yo.

A **mi hermano Said Israel**, por su apoyo y consejos, por mostrarme que es posible alcanzar las metas propuestas.

A **mi hermana Wendy Rubí**, por su apoyo y confianza, por ser un ejemplo de fortaleza y brindarme su cariño.

A **mi cuñada Lía y a mis sobrinos Ían Israel y Samantha Regina**.

# RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) aún representa un problema de salud mundial, principalmente en las regiones menos desarrolladas, como México. La causa principal y necesaria para el desarrollo del CaCU es la infección por un virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo. Este virus infecta la capa basal del epitelio escamoso estratificado, en donde uno de sus blancos podrían ser las células troncales. E5 es una de las proteínas virales que se expresa en la capa basal epitelial, y podría participar en las etapas tempranas de la progresión maligna. Esta proteína activa varias vías de señalización para alterar procesos como proliferación, diferenciación y apoptosis. Por lo que en el presente trabajo se analizaron los efectos de la proteína E5 de VPH16 sobre los procesos de auto-renovación y diferenciación temprana de los queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT, así como la posible participación de la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en estos procesos. Para este fin, el gen E5 de VPH16 fue expresado en las células HaCaT mediante un sistema lentiviral, y se determinaron la proliferación celular, los niveles de citoqueratinas 10 (CK10) y 14 (CK14), al igual que los marcadores de troncalidad OCT4, SOX2, NANOG, BMI1 y la subpoblación ALDH<sup>bri</sup>. Estos mismos parámetros fueron evaluados tras la estimulación de las células HaCaT que contenían E5, con el factor de crecimiento epidérmico (EGF). E5 provocó una disminución en la proliferación celular, generando un aumento de CK10, un marcador de diferenciación temprana, y un decremento de OCT4, SOX2, NANOG y BMI1; mientras que el estímulo con EGF presentó un efecto sinérgico con E5 en la disminución de estos marcadores. El análisis del efecto de la estimulación con EGF en las células HaCaT control, permitió observar un incremento de CK10 y una disminución de OCT4, SOX2 y NANOG, de manera muy similar al efecto que la expresión de E5 provoca. Estos resultados indican que la proteína E5 de VPH16 podría estar induciendo la salida de las células con características de troncalidad hacia un estado de diferenciación temprana, de forma análoga a lo que observamos con el EGF; y que éste factor de crecimiento podría tener un efecto sinérgico con E5 sobre estos procesos.

# SUMMARY

Cervical cancer still represents a world health problem, mainly in the less developed regions, like Mexico. The principal and necessary cause for cervical cancer development is the high risk human papillomavirus (HPV) infection. This virus infects the basal layer of the stratified squamous epithelium, where one of its targets could be the stem cells. E5 is one of the viral proteins that is expressed in the epithelial basal layer, and could participate in the early stages of the malignant progression. This protein activates several signaling pathways to alter processes like proliferation, differentiation and apoptosis. For this reason, in the present work the effects of E5 HPV16 protein on the self-renewal and early differentiation processes of the immortalized human keratinocytes HaCaT were analyzed, as well as the possible participation of the EGFR pathway in these processes. For this end, the E5 HPV16 gene was expressed in HaCaT cells by a lentiviral system, and the cell proliferation, cytokeratins 10 (CK10) and 14 (CK14) levels, as well as, the stem markers OCT4, SOX2, NANOG, BMI1 and the ALDH<sup>bri</sup> subpopulation were determined. These same parameters were evaluated after the stimulation of the HaCaT cells containing E5, with the epidermal growth factor (EGF). E5 provoked a decrease in the cell proliferation, generating an increase of CK10, an early differentiation marker, and a reduction of OCT4, SOX2, NANOG and BMI1; whereas that the EGF stimulus presented a synergic effect with E5 in the decrease of these markers. The effect analysis of EGF stimulation on the control HaCaT cells, allowed to observe an increase of CK10 and a decrease of OCT4, SOX2, and NANOG, in a very similar way to the effect that the E5 expression provokes. These results indicate that the E5 HPV16 protein could be inducing the exit of the cells with stem characteristics toward an early differentiation state, analogously to how we observed with the EGF; and that this growth factor could have a synergic effect with E5 on these processes.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>16</b>
1.1 El cáncer cérvico-uterino .....	16
1.2 El virus del papiloma humano.....	18
1.2.1 Ciclo replicativo del virus del papiloma humano .....	21
1.3 El epitelio escamoso estratificado.....	24
1.3.1 Subpoblaciones de queratinocitos de la capa basal del epitelio escamoso estratificado .....	27
1.4 La proteína E5 de VPH16 .....	30
1.4.1 Relación de E5 de VPH16 con vías de señalización celulares .....	32
1.5 La vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico.....	35
<b>2 ANTECEDENTES .....</b>	<b>39</b>
<b>3 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>4 HIPÓTESIS.....</b>	<b>42</b>
<b>5 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>43</b>
<b>6 OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>43</b>
<b>7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>44</b>
<b>8 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
8.1 Modelo de estudio.....	46

8.2	Cultivo celular.....	46
8.3	Síntesis génica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	47
8.4	Clonaciones en el plásmido de transferencia pSin-EF2-Pur .....	49
8.5	Generación de vectores lentivirales .....	50
8.6	Titulación de vectores lentivirales .....	51
8.7	Transducción y selección celular .....	53
8.8	Tratamiento con EGF .....	53
8.9	Extracción de RNA y síntesis de cDNA .....	54
8.10	PCR punto final.....	55
8.11	PCR cuantitativa (qPCR) .....	56
8.12	Inmunofluorescencia indirecta .....	57
8.13	Ensayo de proliferación celular.....	59
8.14	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) e inmunodetección en fase sólida (Western blot).....	60
8.15	Citometría de flujo .....	62
8.16	Análisis estadístico.....	63
<b>9</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
9.1	Síntesis del gen E5 de VPH16 .....	64
9.2	Clonación del gen E5 de VPH16 y del fragmento génico LacZ $\alpha$ en el plásmido de transferencia pSin-EF2-Pur .....	66
9.3	Producción y titulación de los vectores lentivirales E5 VPH16 y LacZ $\alpha$ .....	70
9.4	Transducción celular y expresión del transgén E5 de VPH16 en las células HaCaT 73	
9.5	Proliferación de las células HaCaT que expresan E5 de VPH16.....	77
9.6	Expresión de las citoqueratinas 10 y 14 en las células HaCaT-E5 VPH16 .....	79
9.7	Expresión de los factores de troncalidad OCT4, SOX2, NANOG y BMI1 en células HaCaT-E5 VPH16 .....	82
9.8	Abundancia relativa de las células ALDH <sup>bri</sup> de HaCaT-E5 VPH16.....	84
9.9	Efectos del EGF sobre la expresión de las citoqueratinas 10 y 14 en células HaCaT-E5 VPH16 .....	86

9.10 Efectos del EGF sobre la expresión de los factores de troncalidad en las células HaCaT-E5 VPH16 .....	92
<b>10 DISCUSIÓN.....</b>	<b>95</b>
<b>11 CONCLUSIONES .....</b>	<b>103</b>
<b>12 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>105</b>
<b>13 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>106</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>125</b>

# LISTA DE ABREVIATURAS

ALDH	Aldehído deshidrogenasa
AP-1	Proteína activadora-1
b	Bases
bri	Incrementado(a)
BSA	Albúmina sérica bovina
CaCU	Cáncer cervicouterino
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CK1	Citoqueratina 1
CK5	Citoqueratina 5
CK10	Citoqueratina 10
CK14	Citoqueratina 14
Col.	Colonia
Conc.	Concentración
COX-2	Ciclooxigenasa-2
d	Día(s)
DE	Desviación estándar
DEAB	Dietilaminobenzaldehído
Dil.	Dilución
Dim	Disminuido(a)

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
D-MEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleósidos trifosfato
ED	Diferenciada(s) temprana(s)
EF-1 $\alpha$	Factor de elongación-1 $\alpha$
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
Fig.	Figura
g	Gravedades
h	Hora(s)
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IRES	Sitio interno de entrada del ribosoma
kDa	Kilo Daltones
KO SR	KnockOut Serum Replacement
LCR	Región larga de control
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
MHC-I	Complejo principal de histocompatibilidad clase I
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
Min	Minutos(s)

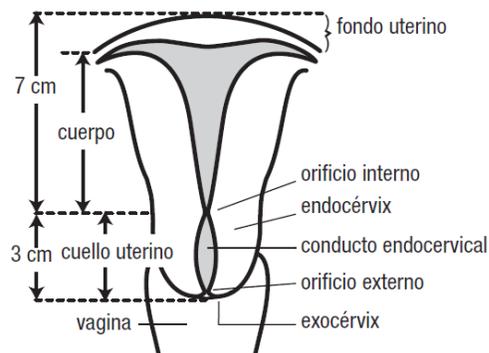
ml	Mililitros
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA(s)	Ácido(s) ribonucleico(s) mensajero(s)
ORF(s)	Marco(s) de lectura abierto(s)
PAE	Sitio de poliadenilación temprano
PAL	Sitio de poliadenilación tardío
pb	Pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfatos
PBST	Buffer salino de fosfatos con Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Promotor temprano
pEGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico fosforilado
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PL	Promotor tardío
PM	Peso molecular
PRC1	Complejo represivo 1 de Polycomb
qPCR	PCR cuantitativa o PCR en tiempo real
Región E	Región temprana
Región L	Región tardía
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto

s	Segundo(s)
SC	Célula(s) troncal(es)
SFB	Suero fetal bovino
SILs	Lesiones intraepiteliales escamosas
S/R	Sin restringir
TA	Amplificada(s) transitoriamente
TBS	Buffer salino de Tris
TBST	Buffer salino de Tris con Tween 20 al 0.2 %
Tm	Temperatura de alineamiento
TU	Unidades de transducción
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VHS-2	Virus del herpes simple de tipo 2
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano
Wt	Wild type

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 El cáncer cérvico-uterino

El cáncer cérvico-uterino (CaCU), cáncer de cuello uterino, cáncer cervical o cáncer de cérvix, es un crecimiento autónomo, descontrolado e invasivo de las células que revisten el cuello uterino (1). El cuello uterino o cérvix es la porción inferior del útero que sobresale hacia la parte superior de la vagina, mide de 2.5 a 3 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro (Fig. 1). A la región vaginal del cérvix se le conoce como exocérvix, mientras que a los dos tercios superiores se les llama endocérvix. El conducto endocervical discurre por el centro del cuello uterino, desde el orificio interno (la abertura de entrada a la cavidad uterina) hasta el orificio externo (la abertura del cuello uterino hacia la vagina). La mayoría de los casos de cáncer cérvico-uterino se originan en el área donde el endocérvix se une al exocérvix (zona de transformación) (1, 2).

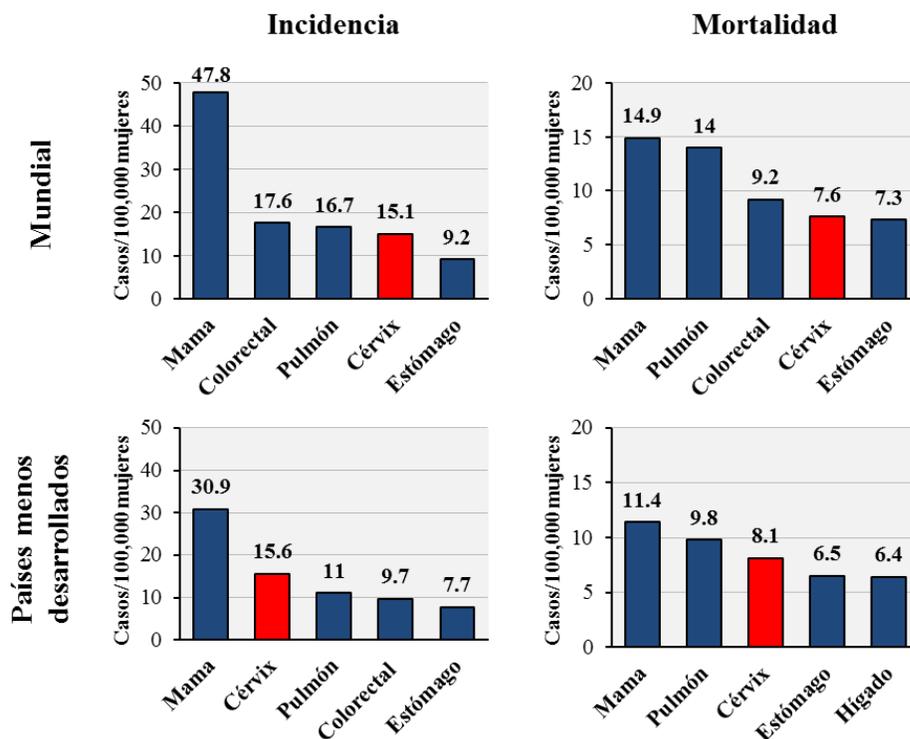


*Figura 1. Localización y anatomía del cuello uterino. El cérvix es la porción inferior del útero, mide de 2.5 a 3 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro. Éste se encuentra constituido por tres regiones: el exocérvix, el endocérvix y el conducto endocervical. El cáncer*

*cérvico-uterino generalmente se origina en el área donde el endocérvix se une al exocérvix. Tomada de Burns et al., 2016 (1).*

El CaCU es el cuarto cáncer más frecuente en las mujeres a nivel mundial (Fig. 2), con un estimado de 528,000 casos nuevos en el año 2012 y una tasa de incidencia de 15.1 casos por cada 100,000 mujeres. Asimismo, este tipo de cáncer se sitúa en el cuarto lugar de mortalidad por cáncer en la población femenina mundial, con un estimado de 266, 000 decesos en el año 2012 y una tasa de mortalidad de 7.6 muertes por cada 100,000 mujeres (3).

Sin embargo, el CaCU presenta una mayor incidencia y mortalidad en las regiones menos desarrolladas del mundo (Fig. 2), en donde ocupa el segundo lugar en incidencia, con una tasa de 15.6 casos por cada 100,000 mujeres, y el tercer lugar en mortalidad, con una tasa de 8.1 muertes por cada 100,000 mujeres (3). Esto es debido a que los países en desarrollo carecen de acceso a exámenes de salud regulares y a un sistema de salud formal, lo que dificulta la detección temprana y el tratamiento de lesiones precancerosas antes de su progresión a cáncer, así como la vacunación contra el virus del papiloma humano (VPH) (4).



*Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer cervical a nivel mundial y en los países menos desarrollados. Se presentan las tasas correspondientes como número de casos por cada 100, 000 mujeres. Modificada de GLOBOCAN, 2012 (3).*

En México, el CaCU ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad por cáncer en la población femenina. En el año 2015 se presentaron 3,071 casos nuevos de tumores malignos del cuello uterino, representando una tasa de incidencia de 6.01 casos por cada 100,000 mujeres (5). Mientras que en el año 2014, en mujeres de 25 años y más, se registraron 4,056 defunciones, con tasa de 11.9 defunciones por cada 100,000 mujeres (6).

La infección por VPH es la causa principal y necesaria para el desarrollo del cáncer cérvico-uterino. Este virus ha sido encontrado en el 99.7% de los casos de carcinoma cervical en el mundo (7). Sin embargo, la infección por VPH no es suficiente para el desarrollo del cáncer cervical y otros factores también tienen un papel importante en este proceso, tales como: el uso de anticonceptivos hormonales a largo plazo, un número elevado de partos, fumar tabaco, la co-infección con otros agentes transmitidos sexualmente como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus del herpes simple de tipo 2 (HSV-2) y *Chlamydia trachomatis* (8), la variabilidad y susceptibilidad genética del hospedero, la inmunosupresión, la inflamación crónica, las hormonas endógenas, el inicio de la actividad sexual a edad temprana y tener múltiples parejas sexuales. Asimismo, influyen factores relacionados con el VPH como los son: la infección por tipos específicos, la co-infección con múltiples tipos, las variantes, la carga viral, así como la integración viral (8-12). Además, el VPH ha sido asociado con otros cánceres anogenitales, como los carcinomas de vagina, vulva, pene, ano y perianales, y con cánceres de cabeza y cuello, como los carcinomas orofaríngeos y laríngeos (13, 14).

## **1.2 El virus del papiloma humano**

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae* (15, 16). Actualmente se han identificado más de 200 tipos de este virus (17) y estos se clasifican en cinco géneros: Alfa-, Beta-, Gamma-, Mu- y Nu-papilomavirus (18, 19). El género Alfa se divide en tipos cutáneos y mucosos. Los tipos mucosos se subdividen a su vez en grupos de bajo y de alto

riesgo, mientras que los cutáneos también se consideran de bajo riesgo. Los VPH de bajo riesgo causan infecciones inaparentes o papilomas benignos y raramente son asociados con el desarrollo de neoplasias o cáncer (20). Tal es el caso de los VPH6 y 11 que causan las verrugas genitales (21). En tanto que los VPH de alto riesgo u oncogénicos son causa de varios tipos de cáncer, como el cáncer cervical, cánceres anogenitales y tumores de cabeza y cuello. Dentro de los tipos de alto riesgo se encuentran VPH16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59 (20). Siendo VPH16 y 18 los tipos más frecuentes en cáncer cervical invasivo a nivel mundial, ya que se han identificado en aproximadamente el 54.4 y 15.9 % de los casos, respectivamente (22).

Las partículas de papilomavirus humanos son no envueltas con una cápside icosaédrica de aproximadamente 55 nm de diámetro (Fig. 3A). Su genoma es DNA circular de doble cadena (episomas), con un tamaño de alrededor de 8,000 pares de bases (23, 24) (Fig. 3B). Este se encuentra organizado en tres regiones: una región larga de control (LCR, *long control region*), una región temprana (E, *early*) y una región tardía (L, *late*). La LCR es un segmento que representa aproximadamente el 10% del genoma viral y no codifica para proteínas, esta contiene el origen de replicación, un promotor temprano y sitios de unión para factores de transcripción y proteínas reguladoras. La región E ocupa más del 50% del genoma y codifica para seis o más marcos de lectura abiertos (ORFs, *open reading frames*) llamados E1, E2, E4, E5, E6 y E7. En tanto que la región L abarca casi el 40% del genoma, se encuentra río abajo de la región E y codifica para dos ORFs conocidos como L1 y L2 (20, 24, 25).

Todos los ORFs se encuentran codificados en una sola cadena del genoma viral y son transcritos a partir de dos promotores principales (Fig. 3B). El promotor temprano (PE, *early promoter*, también llamado P97 en VPH16) se encuentra localizado río arriba del ORF E6 y es responsable de la expresión de casi todos los genes tempranos. Mientras que el promotor tardío (PL, *late promoter*, llamado P670 en VPH16) se ubica dentro del ORF E7, es responsable de la expresión de los genes tardíos y su actividad puede ser inducida únicamente en queratinocitos diferenciados. Además, tanto la región E como la región L se encuentran seguidas por los sitios de poliadenilación temprano (PAE, *early polyadenylation site*) y tardío (PAL, *late polyadenylation site*), respectivamente. El empleo de estos

diferentes promotores y sitios de poliadenilación durante la transcripción, así como procesos de *splicing* alternativo dan origen a una serie de RNAs mensajeros (mRNAs) bi o policistrónicos que codifican para más de una proteína (20, 24, 25).

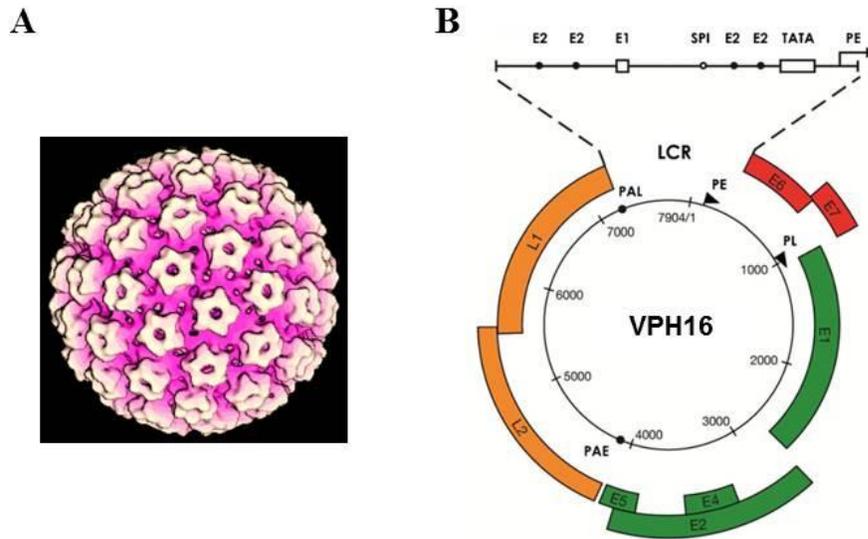


Figura 3. Estructura y organización del genoma de Alfa-papilomavirus humanos. A) Los VPH tienen una cápside icosaédrica de alrededor de 55 nm de diámetro compuesta por las proteínas L1 y L2. B) El genoma viral se encuentra organizado en tres regiones la LCR, la región temprana y la región tardía. La LCR contiene secuencias reguladoras; la región temprana comprende a los ORFs E1, E2, E4, E5, E6 y E7; y la región tardía a L1 y L2. Adaptada de Steben and Duarte-Franco, 2007 y Doorbar et al., 2012 (12, 20).

La proteína E1 es una helicasa de DNA dependiente de ATP específica del virus, la cual participa en la replicación del genoma viral. La proteína E2 también colabora en la replicación del genoma viral, ya que recluta a E1 en el origen de replicación de este. Asimismo, E2 regula la transcripción y es importante para la segregación del genoma del virus durante la división celular. La proteína E4 se expresa principalmente durante las últimas etapas del ciclo viral, esta se une a los filamentos de citoqueratinas y desorganiza su estructura. Además, se cree que E4 contribuye a la liberación y transmisión del virus. L1 es la proteína principal que constituye la cápside viral, esta se ensambla en capsómeros pentaméricos que son los componentes principales de la cubierta icosaédrica del virión (Fig. 3A). L2 es la proteína menor de la cápside, una unidad de esta se encuentra incrustada

axialmente en cada uno de los capsómeros, está involucrada en la encapsidación del DNA viral, facilita la entrada del virus a la célula durante la infección y su tráfico hacia el núcleo (25, 26).

Las proteínas E6 y E7 inducen la entrada al ciclo celular en las células epiteliales diferenciadas para permitir la amplificación del genoma viral. E6 de los VPH de alto riesgo induce la degradación de p53, evitando así el arresto del crecimiento celular y la apoptosis, y activa la expresión de la telomerasa conllevando a la inmortalización celular. E7 se asocia con las proteínas de la familia de retinoblastoma (Rb) y las conduce a degradación. Esto resulta en la liberación y activación de los factores de transcripción E2F que dirigen la expresión de genes específicos de la fase S del ciclo celular. E7 también altera el control del ciclo celular a través de interacciones con deacetilasas de histonas, ciclinas e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas. Además, E6 y E7 inducen inestabilidad genómica y promueven la tumorigénesis (27). La proteína E5 promueve la proliferación celular, inhibe la apoptosis y evade la respuesta inmune. Estas funciones las realiza a través de la alteración del tráfico vesicular y la interacción con diversas proteínas, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la subunidad de 16 Kilo Daltones (kDa) de la H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar (16K V-ATPasa) y la cadena pesada del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I). E5 tiene una actividad transformante débil cuando es expresada sola, sin embargo, puede incrementar las funciones de E6 y E7 y tener un papel importante en la carcinogénesis (28, 29). Las proteínas E5, E6 y E7 de los VPH de alto riesgo son consideradas oncoproteínas y son los principales factores virales responsables del inicio y la progresión del cáncer cervical (27).

### **1.2.1 Ciclo replicativo del virus del papiloma humano**

Los VPH presentan tropismo por el epitelio escamoso estratificado, como el de la piel y las mucosas, y es en este tejido en donde se lleva a cabo su ciclo infeccioso completo (25, 30). Para que la infección ocurra, los viriones deben acceder a la membrana basal del epitelio, esto se puede dar a través de pequeñas heridas o en la zona de transformación (unión escamo-columnar, el borde entre el epitelio escamoso estratificado del exocérvix y el epitelio columnar del endocérvix (2)) (Fig. 4). Enseguida, los viriones ingresan a las células de la capa basal del epitelio mediante endocitosis. La cápside es desensamblada en

el endosoma tardío y el genoma viral es liberado y transportado al núcleo celular por la proteína L2 (20, 26, 30).

Después de la infección, en las células de la capa basal se produce una fase inicial de amplificación del genoma, y enseguida los genomas virales son mantenidos en el núcleo como episomas en un número bajo de copias. Durante esta fase es importante la participación de las proteínas E1 y E2, las cuales se encargan del inicio de la transcripción viral, la replicación y la segregación del genoma durante la mitosis. Además, debido a que el genoma viral no codifica para polimerasas u otras enzimas necesarias para la replicación, el virus requiere de esta maquinaria celular para la síntesis del DNA viral. La infección de las células de la capa basal permite al VPH establecer una infección persistente, ya que éstas son las únicas células capaces de proliferar en el epitelio normal (20, 26, 30, 31).

Cuando las células migran a las capas superiores del epitelio salen del ciclo celular y comienzan un proceso de diferenciación. Las proteínas E6 y E7 inducen el reingreso de estas células a la fase S del ciclo celular para permitir la amplificación del genoma viral. Además, el promotor viral tardío es activado en respuesta a la diferenciación celular. Este promotor induce un incremento en la expresión de las proteínas E1 y E2 necesarias para la replicación, así como de las proteínas E4 y E5 que contribuyen indirectamente a la amplificación del genoma modificando el ambiente celular (20, 26, 31).

En las capas superiores del epitelio se llevan a cabo los últimos pasos del ciclo replicativo del VPH, el empaquetamiento del genoma viral y la liberación de los viriones. Para la expresión de las proteínas de la cápside, L1 y L2, se producen transcritos que terminan en el sitio de poliadenilación tardío. Esto marca el cambio de la amplificación del genoma a su empaquetamiento, lo cual implica el reclutamiento de L2 a las regiones de replicación, la expresión de L1 y el ensamblaje de las cápsides en el núcleo. Finalmente, la proteína E4 parece tener una función importante en la liberación de los viriones y su infectividad en las capas superiores del epitelio (20, 26, 30).

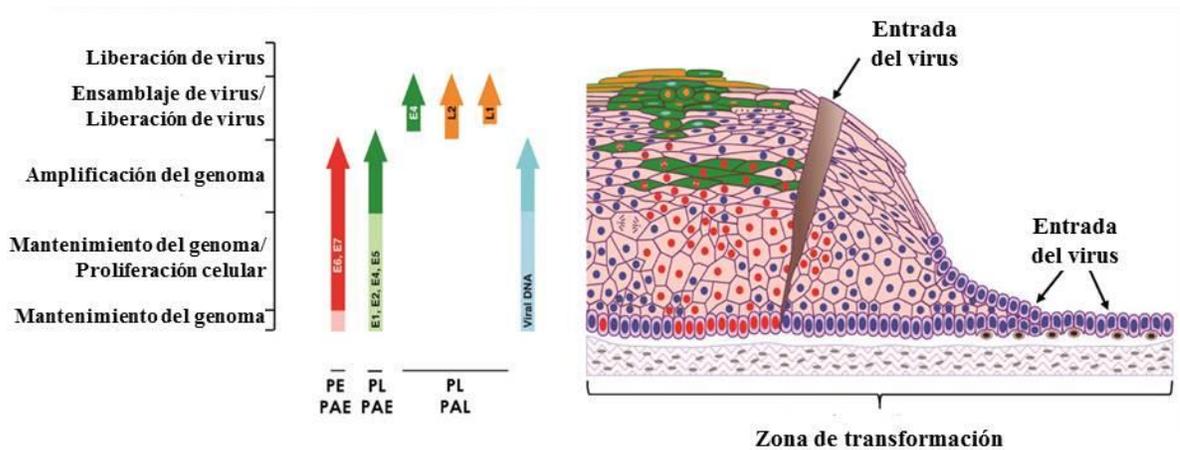


Figura 4. Ciclo replicativo del VPH. El VPH infecta las células de la capa basal del epitelio escamoso estratificado a través de microlesiones o en la zona de transformación. La expresión de los diferentes genes, al igual que el ciclo replicativo viral están relacionados con el programa de diferenciación epitelial. Modificada de Doorbar et al., 2012 (20).

La integración del genoma de los VPH de alto riesgo en los cromosomas de la célula huésped ha sido asociada con la progresión maligna. Sin embargo, si el evento de integración es crucial en sí para la carcinogénesis ha sido tema de debate. La integración ocurre generalmente en sitios frágiles comunes, y modificaciones en la expresión de genes en o cerca del sitio de integración podrían participar en la oncogénesis. Además, durante el proceso de integración se produce la ruptura del ORF de E2, esta proteína es responsable de regular la expresión de E6 y E7, de tal forma que al estar ausente se incrementa la expresión de estos oncogenes virales (Fig. 5) (30, 32).

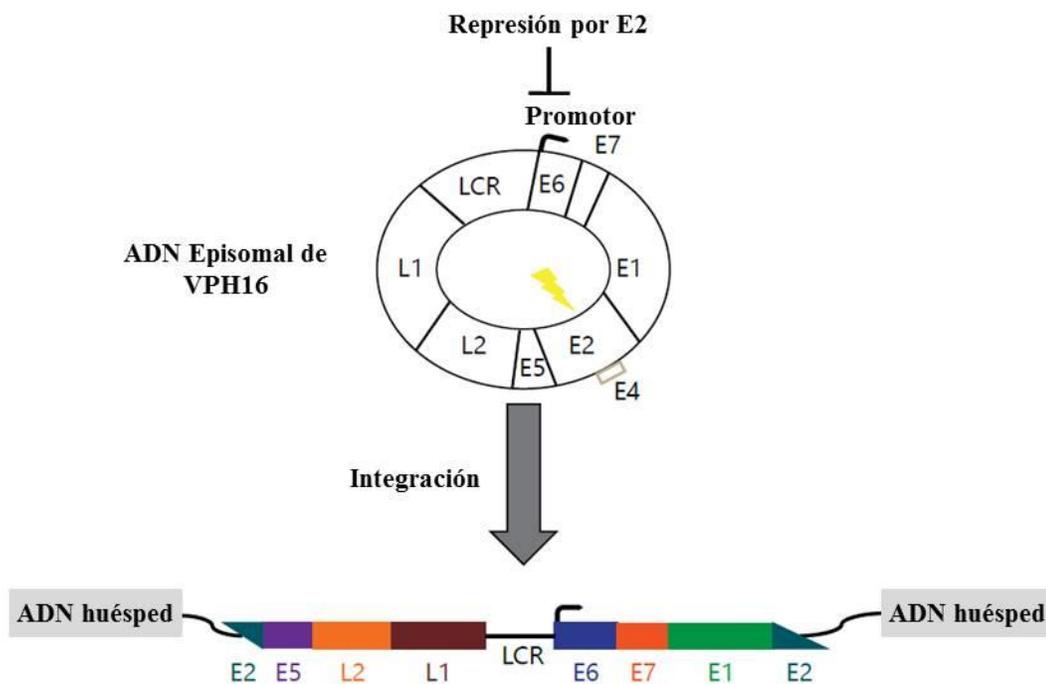


Figura 5. Integración del genoma viral. La integración viral en el genoma de la célula huésped ocurre río abajo de los genes E6 y E7, a menudo en la región de E1 o E2. Esta ruptura da como resultado una pérdida del control por retroalimentación negativa en la expresión de los oncogenes por parte de la proteína E2. Modificada de Nguyen et al., 2014 (30).

### 1.3 El epitelio escamoso estratificado

Como se describió anteriormente, el ciclo replicativo de los VPH se encuentra íntimamente ligado con los procesos de proliferación y diferenciación del epitelio escamoso estratificado. Este tipo de epitelio conforma la capa superficial de la piel (epidermis) (33) y se encarga del revestimiento del exocérvix (2).

El epitelio escamoso estratificado es denominado de esta forma porque se encuentra constituido por varias capas de células y las células de la capa apical son planas o escamosas, mientras que las situadas en las capas más profundas varían entre cúbicas y cilíndricas. En el caso de la epidermis estas células son conocidas como queratinocitos (34). La capa epitelial más interna, llamada capa basal, interacciona con una membrana basal

subyacente rica en matriz extracelular y factores de crecimiento, y es la única capa con potencial proliferativo. Periódicamente, las células de esta capa se separan de la membrana basal y ascienden por el epitelio sufriendo un proceso de diferenciación que culmina en la producción de escamas aplanadas muertas, las cuales se desprenden de la superficie y continuamente son remplazadas por células internas que se desplazan hacia afuera (Fig. 6) (35).

El proceso de diferenciación del epitelio puede ser subdividido morfológica y molecularmente en cuatro etapas:

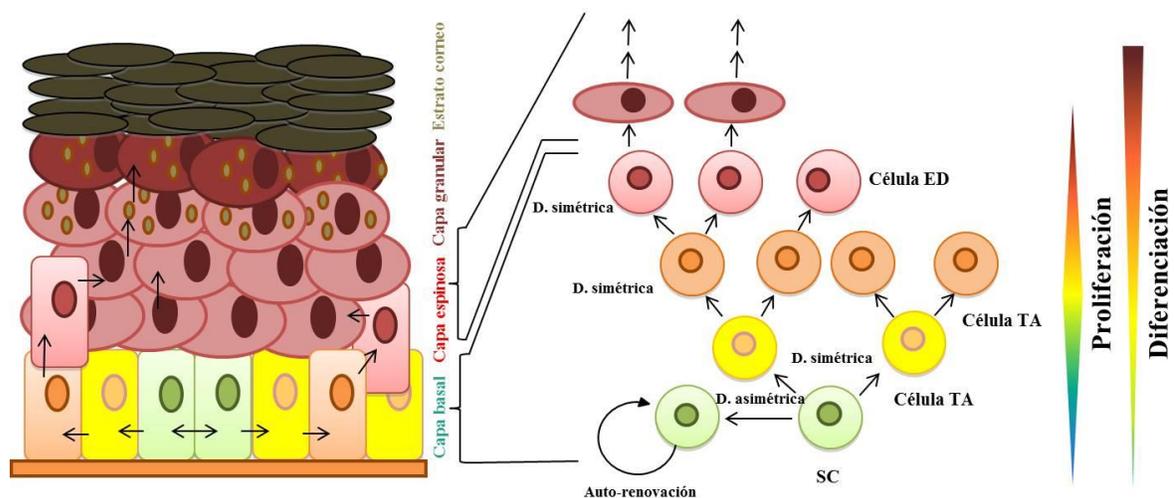
*Capa basal.* Esta capa representa el compartimento proliferativo para la generación y renovación continua del epitelio. En esta zona se encuentran tres subpoblaciones celulares importantes, las células troncales (SC, *stem cells*), las células amplificadas transitoriamente (TA, *transit amplifying*) y las células post-mitóticas o diferenciadas tempranas (ED, *early differentiating*), las cuales serán descritas más adelante. Estos queratinocitos indiferenciados expresan niveles elevados de integrinas, y su citoesqueleto se encuentra constituido principalmente por filamentos de las citoqueratinas 5 (CK5) y 14 (CK14), que son expresadas específicamente por estas células (33, 35).

*Capa espinosa.* Después de un número limitado de divisiones mitóticas, algunas células basales abandonan el ciclo celular y se comprometen a diferenciación. En estas células post-mitóticas disminuye la expresión de proteínas de anclaje, como las integrinas, y se desensamblan las uniones célula-matriz para que puedan migrar hacia las capas superiores. La expresión de las CK5 y CK14 es reprimida, mientras que se induce la expresión de las nuevas citoqueratinas 1 (CK1) y 10 (CK10). Además, se incrementa la expresión de desmosomas, lo que da a los queratinocitos una apariencia “espinosa”, y se sintetizan proteínas como la involucrina que son depositadas en la superficie interna de la membrana plasmática (33, 35).

*Capa granular.* Las células en esta etapa son caracterizadas por tener gránulos en su citoplasma. Hay dos tipos de gránulos: gránulos queratohialinos y cuerpos lamelares. Los gránulos queratohialinos son formados principalmente por profilagrina. Los cuerpos lamelares son organelos secretores que contienen fosfolípidos, colesterol,

glucosilceramidas y proteínas especializadas que son extruidos en el espacio extracelular. Estas proteínas contribuyen a la homeostasis de la barrera, la descamación, la formación de la envoltura cornificada (una envoltura lipoproteica que reemplaza la membrana plasmática), y la defensa antimicrobiana (33).

*Capa córnea.* En esta capa las células ingresan en una fase tipo apoptótica y se vuelven metabólicamente inertes. Éstas extruyen sus bicapas lipídicas y pierden sus organelos citoplásmicos, incluido el núcleo. Al final del programa de diferenciación, son células muertas, aplanadas, hechas de filamentos de queratina fuertemente empaquetados encerrados en la envoltura cornificada, llamadas corneocitos. Finalmente, éstas células sufren descamación en la superficie del epitelio y son reemplazadas por células internas (33).



*Figura 6. Proceso de diferenciación del epitelio escamoso estratificado. El epitelio consta de cuatro capas de células con diferente grado de diferenciación y potencial proliferativo: la capa basal, la capa espinosa, la capa granular y el estrato córneo. La capa basal es el único compartimiento proliferativo del epitelio, esta contiene una subpoblación de SC que dan origen a células TA; las cuales después de varias divisiones celulares se diferencian a células ED, que migran a las capas superiores. Modificada de Cardoso-Jaime, 2015 (36).*

### **1.3.1 Subpoblaciones de queratinocitos de la capa basal del epitelio escamoso estratificado**

La capa basal es la responsable de mantener la homeostasis del epitelio, ya que es el único compartimiento proliferativo, del cual emergen células que van a remplazar a las células perdidas en la superficie ya sea por el recambio normal del tejido o por una lesión (35, 37). De acuerdo con un modelo jerárquico que ha sido propuesto para la epidermis, ésta se encuentra constituida por unidades proliferativas epidermales (38, 39), las cuales en la capa basal están formadas por una SC, rodeada de su progeie, las células TA y células ED, y éstas últimas van ascendiendo y diferenciándose, formando encima una columna de células diferenciadas (Fig. 6) (35, 40).

Las SC han sido definidas como células que tienen la capacidad de perpetuarse a través de la auto-renovación y de generar células maduras de un tejido en particular a través de la diferenciación (41, 42). Para cumplir con estas tareas las SC pueden presentar dos tipos de divisiones celulares: una división asimétrica, en la que cada SC genera una célula hija con las mismas características troncales que ella (auto-renovación), y una célula hija destinada a diferenciarse; o una división simétrica, en la cual cada SC puede dar origen a dos SC hijas (auto-renovación; puede presentarse durante la cicatrización de heridas y la regeneración) o dos células hijas dirigidas a la diferenciación. El balance entre estos dos tipos de divisiones celulares debe estar bien regulado, porque de lo contrario podrían dar origen a enfermedades, como el cáncer (43).

Las SC epidermales son relativamente indiferenciadas, conservan una capacidad elevada de auto-renovación, persisten a través de la vida del tejido, y tienen un gran potencial proliferativo, sin embargo, ingresan raramente al ciclo celular, encontrándose en un estado de reposo o quiescencia (33, 40). Cuando las células troncales se dividen dan origen a células TA. Las células TA proliferan rápidamente por un tiempo corto, y después de varias rondas de división, se diferencian para dar origen a células comprometidas a la diferenciación (44), las células post-mitóticas o ED. Las ED comienzan la migración fuera de la capa basal, pero aún mantienen contacto con la membrana basal, y expresan *de novo* la CK10 (45, 46).

Actualmente, no está claro cuál de las tres subpoblaciones celulares que se encuentran en la capa basal del epitelio escamoso estratificado es el blanco para la infección por el VPH, sin embargo, se ha sugerido que este virus podría infectar a las células troncales (47-49). Debido a que las células troncales perduran en el epitelio y tienen el mayor potencial proliferativo, podrían asegurar el mantenimiento del genoma viral en el tejido a largo plazo y contribuir a la latencia de la infección por VPH (26).

Las células troncales podrían estar también involucradas en el desarrollo del CaCU, ya que en tejidos con un alto recambio celular, como el epitelio escamoso estratificado, estas células son las más probables para acumular las alteraciones genéticas iniciales para la transformación maligna, pues presentan el mayor promedio de vida en dichos tejidos. Además, con un mecanismo de auto-renovación presente, aparentemente son necesarias menos alteraciones para cambiar una célula troncal normal en una célula troncal cancerosa (*CSC, cancer stem cell*) (50, 51).

El modelo de la CSC propone que no todas las células en un tumor tienen la misma capacidad para formar tumores, sino que un grupo definido de células cancerosas tiene la habilidad exclusiva de conducir el crecimiento y la propagación de un tumor. Estas células presentan características de células troncales, particularmente la capacidad de autorenovación y de dar origen a células cancerosas más diferenciadas. Se ha propuesto que las CSCs se pueden originar a partir de células troncales normales transformadas o a partir de células progenitoras que han ganado la capacidad de autorenovación (50, 51).

Desde que comenzó el estudio de las SC epiteliales, diversas estrategias han sido utilizadas para tratar de identificarlas, aislarlas y caracterizarlas, así como para su empleo con fines terapéuticos (39, 46). Dichas estrategias se han basado en sus características morfológicas y fisiológicas, y en marcadores moleculares y bioquímicos; sin embargo, en la actualidad no se han logrado aislar completamente. Una característica morfológica que ha sido propuesta es que éstas son células pequeñas con una alta proporción núcleo-citoplasma (52). Otra característica, frecuentemente determinada, es su capacidad para formar holoclonas, colonias originadas a partir de una sola célula, con una capacidad proliferativa y densidad celular elevadas, que presentan un perímetro casi circular liso y son constituidas por células pequeñas (53).

Entre las proteínas que han sido consideradas marcadores para identificar a las SC se encuentran p63 y BMI1. p63 es un factor de transcripción cuya expresión es alta en células con características de troncalidad, y su participación es fundamental en el mantenimiento del potencial proliferativo de las células de la capa basal (54, 55). BMI1 (*B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1*) forma parte del complejo represivo 1 de Polycomb (PRC1, *Polycomb repressive complex 1*), y es una proteína requerida para el mantenimiento y la auto-renovación de las SC de varios tejidos (56-58), y se ha sugerido que también puede ser un marcador de SC de la piel (59, 60). Sin embargo, estos marcadores no parecen ser los adecuados para aislar una población troncal pura, y al tratarse de proteínas intracelulares, dificultan la obtención de células vivas.

La identificación de proteínas de superficie como marcadores de las SC, ha permitido el aislamiento de estas aún vivas para su posterior estudio. La expresión abundante de la proteína de adhesión a la membrana basal integrina  $\beta 1$  ( $\beta 1$ -integrina<sup>bri</sup>) ha sido sugerida para identificar una subpoblación de queratinocitos enriquecida en SC (61, 62). Por otro lado, la expresión disminuida de desmogleína 3 (Dsg3<sup>dim</sup>), una proteína que forma parte de las uniones intercelulares desmosomas, ha permitido aislar células con características troncales en queratinocitos primarios e inmortalizados (63, 64). Además, se han utilizado combinaciones de marcadores de superficie, quizá la más común implica a la proteína de adhesión a la membrana basal integrina  $\alpha 6$  y al receptor de transferrina CD71. Se ha demostrado que la subpoblación  $\alpha 6$ -integrina<sup>bri</sup>/CD71<sup>dim</sup> se encuentra enriquecida en células con características de troncales, mientras que la subpoblación  $\alpha 6$ -integrina<sup>bri</sup>/CD71<sup>bri</sup> presenta características de células TA y la subpoblación  $\alpha 6$ -integrina<sup>dim</sup> muestra características de células ED (65-67).

También se han empleado marcadores bioquímicos para identificar y aislar a las SC, tal es el caso de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH). Se ha demostrado que subpoblaciones celulares con una actividad elevada de la ALDH (ALDH<sup>bri</sup>), presentan características de células troncales y progenitoras, en diversos tejidos adultos y en líneas celulares en cultivo (68, 69). Recientemente, se ha utilizado este marcador para identificar queratinocitos con características troncales (60).

## 1.4 La proteína E5 de VPH16

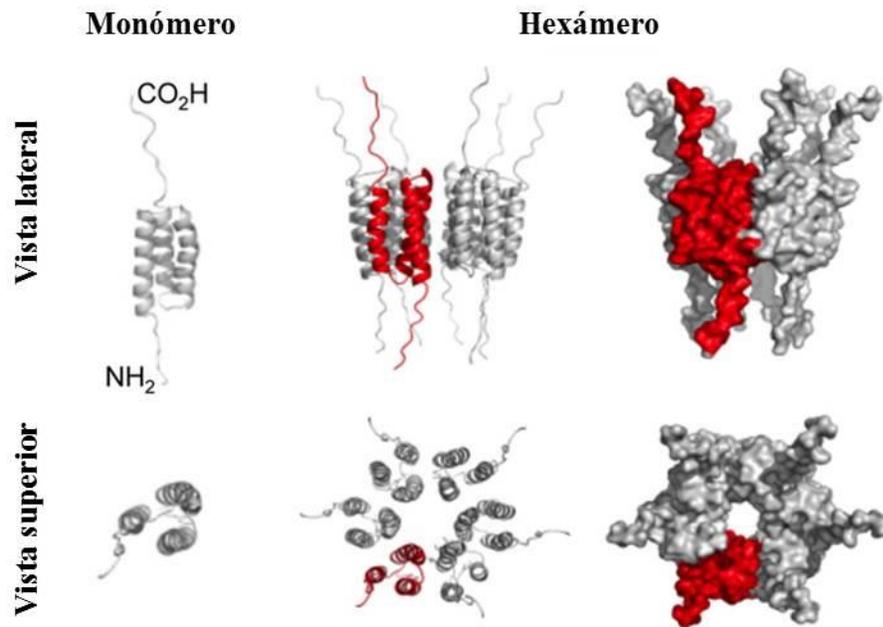
La proteína E5 de los VPH de alto riesgo ha sido considerada una oncoproteína (27, 70), sin embargo, su participación en la tumorigénesis y en el ciclo replicativo viral no ha sido definida con suficiente claridad. Se ha sugerido que ésta proteína participa principalmente en la etapa temprana de la progresión maligna, porque en infecciones por VPH de alto riesgo que progresan a cáncer, el genoma viral comúnmente se integra en el genoma de la célula huésped, dando por resultado la pérdida del ORF de E5 (28, 70). Sin embargo, el DNA de VPH16 puede existir en forma episomal, integrada o ambas, en cáncer cervical primario (71), y se ha sugerido que los tumores con VPH16 en forma episomal presentan un comportamiento más agresivo (28).

En lesiones intraepiteliales escamosas (*SILs, squamous intraepithelial lesions*) de bajo grado, la proteína E5 de VPH16 se ha encontrado expresada principalmente en el tercio inferior del epitelio. Mientras que en *SILs* de alto grado esta proteína se expresa a través de todo el epitelio, al igual que en carcinomas escamosos invasivos. Aproximadamente el 80% de *SILs* de bajo grado, el 90% de *SILs* de alto grado y el 60% de carcinomas cervicales escamosos expresan la proteína E5 de VPH16. En el caso de los carcinomas cervicales, la proteína E5 es expresada en aquellos que contienen el genoma viral en forma episomal (71).

El ORF de E5 de VPH es expresado durante las etapas tempranas del ciclo replicativo viral, pero principalmente en la cuarta posición de los transcritos policistrónicos del virus, por lo que es probable que poca proteína E5 sea traducida a partir de estos transcritos. Por el contrario, cuando las células epiteliales comienzan su diferenciación, el ORF de E5 se encuentra en la segunda posición de los transcritos virales tardíos. Esto sugiere que E5 podría ser sintetizada en mayor cantidad en las células epiteliales suprabasales en diferenciación (24, 72).

La proteína E5 de VPH16 está constituida por 83 aminoácidos, tiene un peso molecular aproximado de 9.4 kDa y es altamente hidrofóbica (73). Ésta proteína contiene tres dominios hidrofóbicos, en estructura  $\alpha$ -hélice, que comprenden los residuos 8-30, 37-52 y 58-76, y se ha sugerido que estos representan pasos transmembrana (Fig. 7) (74, 75).

Los primeros 30 aminoácidos de E5 determinan su localización celular (76), y esta proteína se ha encontrado localizada en el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, la membrana nuclear, los endosomas tempranos, los lisosomas, e incluso, en la membrana plasmática (28, 76). E5 de VPH16 parece auto-asociarse por medio de interacciones no covalentes de sus dominios hidrofóbicos (77) y por puentes disulfuro (78). Además, recientemente se ha demostrado que E5 de VPH16 es capaz de formar canales en las membranas con una estequiometría hexamérica y un diámetro luminal definido (Fig. 7) (77).



*Figura 7. Estructura de la proteína E5 de VPH16. La proteína E5 tiene tres dominios hidrofóbicos en  $\alpha$ -hélice que atraviesan las membranas. Ésta proteína es capaz de formar canales hexaméricos de diámetro definido a través de membranas. En rojo se indica un monómero de E5 formando parte del canal. Adaptada de Wetheril et al., 2012 (77).*

La proteína E5 tiene una actividad transformante débil en comparación con E6 y E7 de los VPH de alto riesgo. E5 de VPH16 es considerada una oncoproteína porque es capaz de transformar queratinocitos y fibroblastos murinos inmortalizados (79, 80), así como queratinocitos humanos inmortalizados (81). Sin embargo, esta proteína es incapaz de inmortalizar queratinocitos humanos primarios, aunque su expresión incrementa la inmortalización mediada por el genoma completo de VPH16 (82). E5 de VPH16 coopera con E7 de VPH16 para incrementar la proliferación de células primarias de rata (83),

aumentar su immortalización y promover su crecimiento independiente de anclaje (84). Además, E5 de VPH16 contribuye a la carcinogénesis cutánea en ratones transgénicos (85, 86), y puede contribuir a la carcinogénesis cervical sola o en combinación con E6 y E7 (87), en ratones transgénicos.

Otra actividad de E5 de VPH16 es su participación en la evasión de la respuesta inmune. Ésta proteína evita el transporte del MHC-I a la superficie celular, secuestrándolo en el aparato de Golgi, y de esta forma previene el reconocimiento de las células infectadas con VPH por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (88-90). Asimismo, E5 de VPH16 disminuye la expresión del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) en la superficie de queratinocitos, ya que evita la degradación de la cadena invariante en los endosomas tardíos y, de esta manera, bloquea la formación de moléculas de MHC-II maduras cargadas con su péptido antigénico (91).

#### **1.4.1 Relación de E5 de VPH16 con vías de señalización celulares**

La proteína E5 lleva a cabo sus actividades biológicas a través de la interacción con múltiples proteínas celulares, además, al encontrarse localizada en las membranas intracelulares también puede interferir con el tráfico vesicular (28, 29). De esta forma, E5 de VPH16 induce o potencia diversas vías de señalización que regulan procesos importantes en las células como la proliferación, la apoptosis y la angiogénesis (Fig. 8).

Varios estudios han sugerido que E5 de VPH16 ejerce su efecto transformante principalmente a través de la interacción con la vía de señalización del EGFR. La activación del EGFR regula la transcripción génica y modula la proliferación celular, la apoptosis, la angiogénesis, la invasión tumoral y la metástasis, principalmente a través de las vías de Ras/Raf/MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) y PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*)/AKT. Además, una actividad elevada de la señalización del EGFR ha sido relacionada con la mayoría de los tipos de cáncer (70).

Uno de los mecanismos a través de los cuales E5 de VPH16 regula la señalización del EGFR es incrementando el número de receptores expresados en la superficie celular. E5 interfiere con los procesos de degradación del EGFR e incrementa su reciclamiento a la membrana plasmática, para ser nuevamente activado por sus ligandos (79). Además, E5 de

VPH16 también incrementa la fosforilación del EGFR en presencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF). En queratinocitos humanos HaCaT que expresan E5 de VPH16, el tratamiento con EGF resulta en un aumento inmediato en la fosforilación del EGFR, pero no en un incremento en las cantidades totales de este receptor. Lo cual indica que el aumento en la actividad del EGFR no se debe únicamente a la alteración en su degradación (92).

La vía de señalización del EGFR puede ser activada por E5 de VPH16 a través de procesos dependientes e independientes del EGF. La actividad transformante de E5, indicada por proliferación celular aumentada o crecimiento independiente de anclaje, es considerablemente incrementada por el tratamiento con EGF, en una forma dependiente de ligando (79, 93). Por el contrario, en células HaCaT, E5 de VPH16 puede inducir la activación dependiente de estrés de las MAPK p38 y ERK1/2 por un mecanismo independiente del EGF (94).

La activación de las MAPK ERK1/2 por E5 de VPH16 involucra dos vías diferentes, una mediada por el receptor tirosina cinasa EGFR y otra dependiente de la proteína cinasa C (PKC). Ambas vías incrementan la transcripción de genes de respuesta temprana, tales como, c-Fos, c-Jun y c-Myc, los cuales regulan la expresión de otros genes celulares e inducen a las células a ingresar en el ciclo celular (95).

La proteína E5 de VPH16 protege a queratinocitos humanos de prepucio de la apoptosis inducida por radiación UV-B incrementando la activación de las vías de PI3K/AKT y ERK1/2 de manera dependiente del EGF (96). Asimismo, en varios tipos celulares E5 de VPH16 incrementa la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a través de la activación del EGFR y de las vías de señalización de MEK/ERK1/2 y PI3K/AKT (97).

E5 de VPH16 también induce vías de señalización inflamatorias. Ésta proteína incrementa la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) a través de la vía de señalización del EGFR. El principal producto enzimático de COX-2 es la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), y se ha demostrado que E5 induce su secreción. La PGE<sub>2</sub> altera la proliferación celular, la supervivencia celular, la angiogénesis, la migración y la invasión. E5 también induce la

expresión del receptor de PGE<sub>2</sub>, EP4, y la activación de este receptor incrementa la formación de colonias independientes de anclaje y la expresión del VEGF, factores requeridos para el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis (70).

Por otro lado, E5 de VPH16 incrementa la proliferación celular a través de la regulación negativa de los supresores de tumor p21 y p27, los cuales son inhibidores de proteínas cinasas dependientes de ciclinas y regulan la progresión del ciclo celular de manera negativa. E5 reprime la expresión del gen p21<sup>Waf1/Sdi1/Cip1</sup> a nivel transcripcional en queratinocitos humanos inmortalizados. Mientras que regula negativamente a p27<sup>Kip1</sup> a través de la disminución de la vida media de su proteína. Además, los efectos de E5 sobre p27<sup>Kip1</sup> dependen de la señalización del EGFR (98, 99). E5 de VPH16 también potencia la señalización del receptor de endotelina acoplado a proteína G (ET<sub>A</sub>) en respuesta a endotelina-1 (ET-1), e incrementa su actividad mitogénica en queratinocitos privados de factores de crecimiento (100).

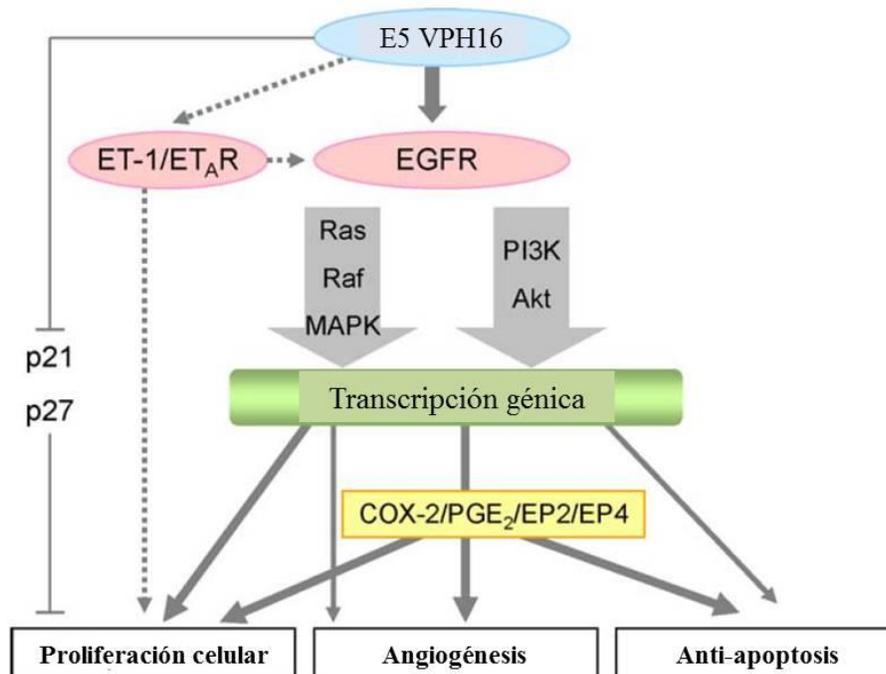


Figura 8. Vías de señalización inducidas por E5 de VPH16. La proteína E5 de VPH16 interacciona con varias vías de señalización involucradas en procesos como la proliferación celular, la angiogénesis y la apoptosis. La vía más importante a través de la cual E5 lleva a cabo sus actividades, es la del EGFR. Modificada de Kim et al., 2010 (70).

## 1.5 La vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico

El EGFR es miembro de una familia de receptores tirosina cinasas (RTK, *receptor tyrosine kinases*), conocida como ErbB en vertebrados y como Her en humanos, la cual se encuentra integrada por cuatro miembros: EGFR (ErbB1, Her1), Neu (ErbB2, Her2), ErbB3 (Her3) y ErbB4 (Her4). Estos receptores son glicoproteínas transmembrana de cadena simple que comprenden un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio transmembrana, una sección yuxtamembrana corta, un dominio tirosina cinasa y una cola C-terminal que contiene residuos tirosina (Fig. 9A). Cada receptor puede ser activado por varios ligandos, y la unión de estos ligandos solubles al dominio extracelular promueve la formación de homodímeros o heterodímeros entre receptores. La dimerización de los receptores es esencial para la activación del dominio tirosina cinasa y la subsecuente autofosforilación de las tirosinas C-terminales (Fig. 9B) (101, 102). Los residuos fosfotirosina enseguida activan, directamente o a través de la interacción con proteínas adaptadoras, diferentes vías de señalización río abajo (103).

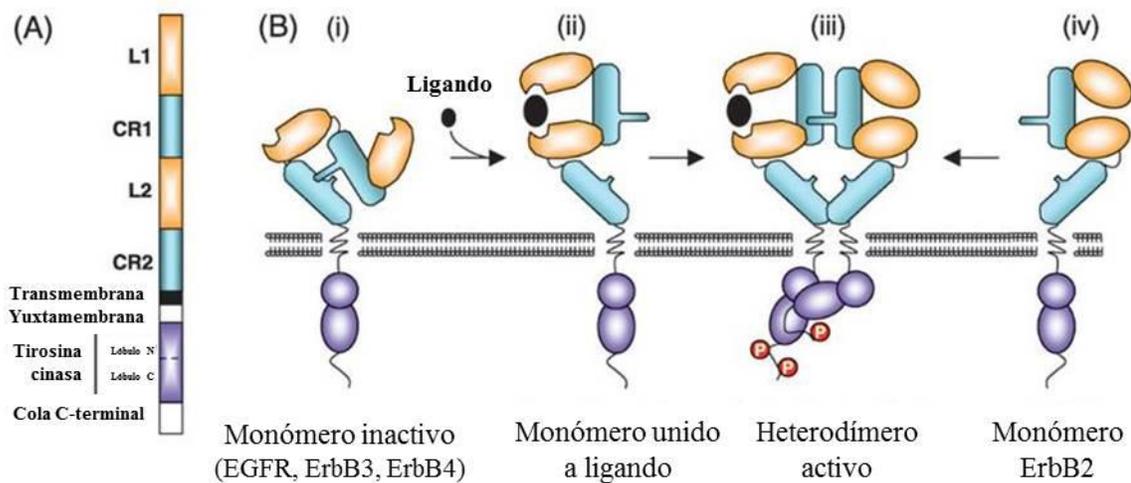


Figura 9. Estructura y activación del EGFR. A) Organización del EGFR. El EGFR se encuentra formado por un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio transmembrana, una sección yuxtamembrana, un dominio tirosina cinasa y una cola C-terminal rica en residuos tirosina. El dominio de unión al ligando contiene cuatro subdominios: L1 y L2, que interaccionan directamente con el ligando; CR1, que contiene un bucle para la dimerización; y CR2. El dominio tirosina cinasa forma dos lóbulos N y C.

*B) Activación y dimerización del EGFR. (i) En ausencia del ligando, el receptor se encuentra en una conformación atada, con el bucle de dimerización oculto. (ii) La unión del ligando induce un cambio conformacional que expone el bucle de dimerización, (iii) lo que permite la interacción con otra molécula de receptor (iv). Modificada de Wieduwilt et al., 2008 (104).*

El EGFR es una proteína con un peso molecular de alrededor de 170 kDa (105). Su dominio N-terminal de unión al ligando contiene cuatro subdominios denominados L1 y L2 (repetidos ricos en leucina 1 y 2), CR1 y CR2 (ricos en cisteína 1 y 2), alternativamente también se denominan I-IV (Fig. 9A). Los subdominios L1 y L2 interactúan directamente con el ligando. El subdominio CR1 contiene el bucle de dimerización, responsable de la interacción receptor-receptor. Por otro lado, el dominio tirosina cinasa tiene una estructura bilobulada y una unión al ATP entre los lóbulos. En ausencia de ligando, el dominio extracelular del EGFR presenta una conformación “atada”, en la cual el CR1 interactúa con el CR2 ocultando el bucle de dimerización (Fig. 9B). Cuando el ligando se une a L1 y L2 ocasiona un cambio a una conformación extendida, en la cual queda expuesto el bucle de dimerización y permite la dimerización de los receptores. Esto ocasiona un cambio conformacional en el dominio tirosina cinasa intracelular que provoca la autofosforilación de las tirosinas C-terminales (104), siendo los más importantes para el EGFR las tirosinas 1068, 1148 y 1173 (106).

Existen siete ligandos conocidos del EGFR: EGF, factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), amfiredulina (AR), heparina-unión-EGF (HB-EGF), betacelulina ( $\beta$ -CEL), epregulina (EPI) y epigen (104, 107). La unión de estos factores de crecimiento al EGFR induce la formación de homodímeros o heterodímeros diferentes con otros miembros de la familia ErbB, y puesto que cada receptor tiene la capacidad de interactuar con diversas enzimas, proteínas adaptadoras y segundos mensajeros, se activarán distintas vías de señalización río abajo. Además, se ha propuesto que un dímero de receptores particular puede discriminar entre ligandos y modificar el patrón de sitios de autofosforilación utilizados, lo que también ocasionará la interacción con diferentes proteínas y la activación diferencial de las vías de señalización (107, 108).

Las principales vías de señalización activadas por el EGFR son la vías de Ras/MAPK, PI3K/AKT, PLC $\gamma$  (*Phospholipase C*)/PKC y STATs (*Signal transducers and activators of transcription pathway*) (Fig. 10). Estas vías de señalización regulan procesos celulares importantes, como proliferación, diferenciación, supervivencia, apoptosis y migración (103, 109).

*Vía de Ras/MAPK.* El EGFR puede activar la vía clásica de ERK1/2 (MAPK). La fosforilación de las tirosinas 992, 1068, 1086, 1148 y 1173 del receptor es indispensable para la activación de esta vía, su función es anclar a la proteína GRB2 (110). La interacción GRB2-EGFR ocurre de manera directa con las tirosinas 1068 y 1086, mientras que las tirosinas 992, 1148 y 1173 reclutan indirectamente a GRB2 por medio de la proteína adaptadora SHC. Enseguida, GRB2 interactúa con el factor intercambiador de guanina SOS, lo que provoca un cambio conformacional en éste y lo capacita para reclutar a la proteína Ras-GDP y activarla (Ras-GTP). Ras-GTP por su parte, activa a Raf-1, la cual a su vez fosforila e induce la activación de MEK1/2. La forma activa de MEK1/2 puede fosforilar residuos treonina y tirosina de ERK1/2. ERK1/2 activa factores de transcripción que incluyen a Sp1, E2F, Elk-1 y AP-1, los cuales regulan la expresión de genes involucrados en procesos celulares como proliferación, migración y diferenciación (103, 111).

*Vía de PI3K/AKT.* La PI3K es una enzima dimérica compuesta por una subunidad reguladora p85, la cual interacciona con el EGFR fosforilado, y una subunidad catalítica p110 que genera el segundo mensajero fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). AKT se une a PIP3 en la membrana, donde es fosforilada y activada por PDK1. AKT activa puede regular genes implicados en metabolismo, proliferación, crecimiento, angiogénesis y apoptosis (112-115).

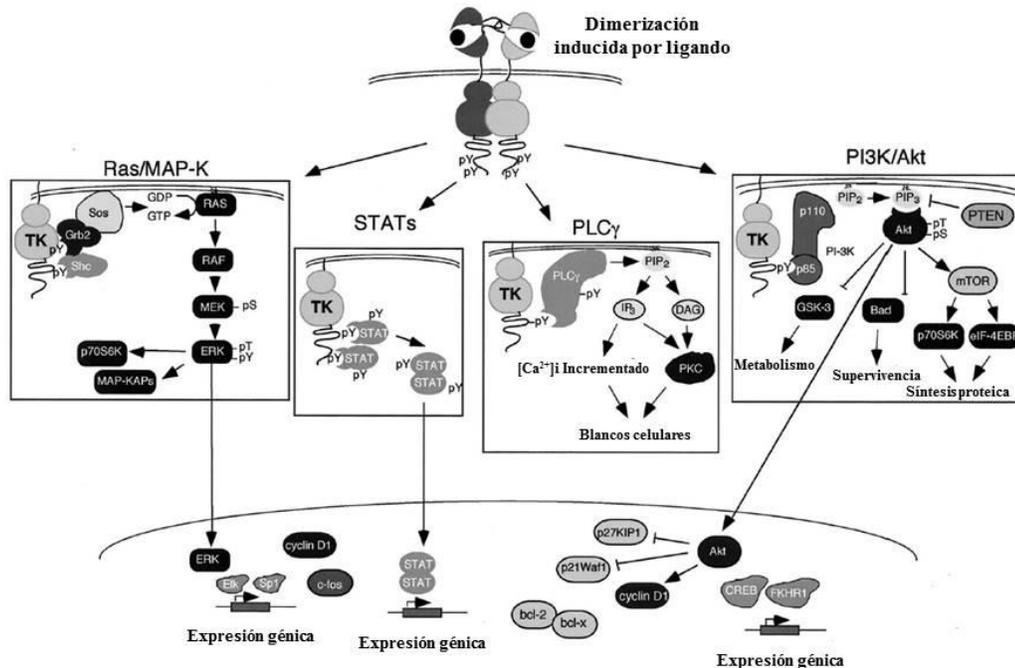


Figura 10. Vías de señalización activadas por el EGFR. El EGFR activado por diferentes factores de crecimiento puede inducir varias vías de transducción de señales río abajo. Entre ellas se encuentran las vías Ras/MAPK, PI3K/AKT, PLC $\gamma$ /PKC y STATs. Modificada de Marmor et al., 2004 (109).

La señalización del EGFR activo es modulada a través de la endocitosis, la cual puede ser dependiente e independiente (vía caveolas o macropinocitosis) de clatrina. La vía por la cual se lleva a cabo la endocitosis podría depender del tipo de ligando, su concentración, y la saturación de la vía dependiente de clatrina (116). Una vez endocitado el EGFR puede tener tres destinos diferentes: la degradación, a través de lisosomas; el reciclamiento a la membrana plasmática; y el transporte del receptor a otros organelos intracelulares, tales como la mitocondria, el trans-Golgi y el retículo endoplásmico. No está claro que determina el destino del receptor, pero se ha sugerido que podrían influir el tipo de ligando, la densidad del receptor y el tipo celular. Además, cada ruta endocítica tiene diferentes consecuencias en la señalización del EGFR. La degradación del EGFR resulta en atenuación de la señalización. Los receptores reciclados a la membrana plasmática pueden volver a ser activados por los ligandos presentes. Finalmente, el tráfico a otros organelos subcelulares puede favorecer la interacción del receptor con proteínas efectoras concentradas en éstos organelos (117).

## 2 ANTECEDENTES

En cultivos organotípicos de la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT, Barbaresi y colaboradores (118) observaron que E5 de VPH16 indujo alteraciones en la proliferación y la diferenciación celular. Las células HaCaT que expresaron la proteína E5 formaron un epitelio con características de displasia, con una membrana basal alterada y numerosas invaginaciones a la matriz de colágeno. Además, en las capas superiores del epitelio se encontraron áreas de hiperqueratinización y células nucleadas. Los marcadores de progresión del ciclo celular, mcm5 y Ki67, fueron sobre-expresados en la capa basal, así como en las capas suprabasales, incluyendo células entre los queratinocitos diferenciados y en la superficie epitelial. Esto demostró que algunas células fueron capaces de ingresar al ciclo celular aún en las capas superiores diferenciadas del epitelio. CK14 una citoqueratina específica de células indiferenciadas de la capa basal, fue expresada en zonas definidas en las capas superiores del epitelio, mientras que CK1, una citoqueratina específica de queratinocitos en diferenciación, no se encontró presente en estas zonas (118). Estos datos indican que la expresión de E5 altera el programa de diferenciación en los queratinocitos humanos HaCaT.

Los efectos de E5 también fueron analizados *in vivo* por Genter Williams (85) y colaboradores, en ratones transgénicos que expresaron el gen E5 de VPH16 en la capa basal del epitelio escamoso estratificado. En estos ratones la epidermis presentó hiperplasia y alteraciones en su patrón de diferenciación. Se observó síntesis del DNA incrementada en las capas suprabasales del epitelio y la CK14 se expresó a través de todas las capas de la epidermis. En contraste, se observó un patrón de expresión normal de CK10, un marcador

de las etapas tempranas de la diferenciación epitelial. Estos ratones transgénicos desarrollaron tumores espontáneos de piel, y la severidad de los fenotipos que presentaron correlacionó con el nivel de expresión del transgén E5. Además, estos fenotipos inducidos por E5 fueron dependientes del EGFR funcional (85); lo que demuestra que E5 de VPH16 también es capaz de alterar los procesos de proliferación y diferenciación celulares en un modelo *in vivo*.

La proteína p63 es un factor de transcripción importante en los procesos de proliferación y diferenciación de los queratinocitos (119, 120); además, su expresión se encuentra elevada en células epidermales con características troncales, y su participación es fundamental en el mantenimiento del potencial proliferativo de estas células (54, 55). En células HaCaT que expresaron E5 de VPH16 durante diferentes periodos, se observaron fluctuaciones en la expresión de la proteína p63. En algunos tiempos los niveles de esta proteína se encontraron incrementados, mientras que en otros se observó una disminución. Conjuntamente, se sugirió que los cambios en la expresión de p63 podrían estar relacionados con modificaciones en la expresión del microRNA mi-R230, ya que éste regula negativamente a p63 (121). Posteriormente, el mismo grupo realizó ensayos en cultivos en balsa de colágeno de células HaCaT con un genoma completo de VPH16 o con un genoma desprovisto de E5. En los cultivos que contenían el genoma completo de VPH16 la expresión de p63 fue restringida a las células de la capa basal, mientras que en aquellos cultivos con un genoma carente de E5, la expresión de p63 se extendió hasta los dos tercios inferiores del epitelio; lo que indica que E5 regula negativamente la expresión de p63 en el contexto de la infección por VPH (122). Estas observaciones demuestran que E5 es capaz de alterar la expresión de p63, un regulador del potencial proliferativo de las SC, y de los procesos de proliferación y diferenciación del epitelio.

En nuestro grupo de trabajo recientemente se demostró que la línea celular HaCaT contiene células con características troncales, las cuales tienen la capacidad de auto-renovarse y de expresar los factores de troncalidad OCT4, SOX2 y NANOG (123). Por lo que es de nuestro interés analizar los efectos de E5 de VPH16 sobre la troncalidad, la proliferación y la diferenciación temprana de éstos queratinocitos humanos inmortalizados.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

La proteína E5 de VPH16 es capaz de alterar los procesos de proliferación y diferenciación en las células epiteliales. Estos procesos podrían estar siendo alterados a nivel de las células troncales. Debido a que se ha propuesto que estas células tienen un papel importante en el desarrollo tumoral, el conocer el efecto de la proteína E5 de VPH16 en su auto-renovación y diferenciación, así como los mecanismos involucrados, permitirá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el cáncer cervical y otros tipos de cáncer asociados con la infección por VPH.

## **4 HIPÓTESIS**

La proteína E5 de VPH16 altera los procesos de auto-renovación y diferenciación temprana en queratinocitos humanos inmortalizados a través de la vía del EGFR.

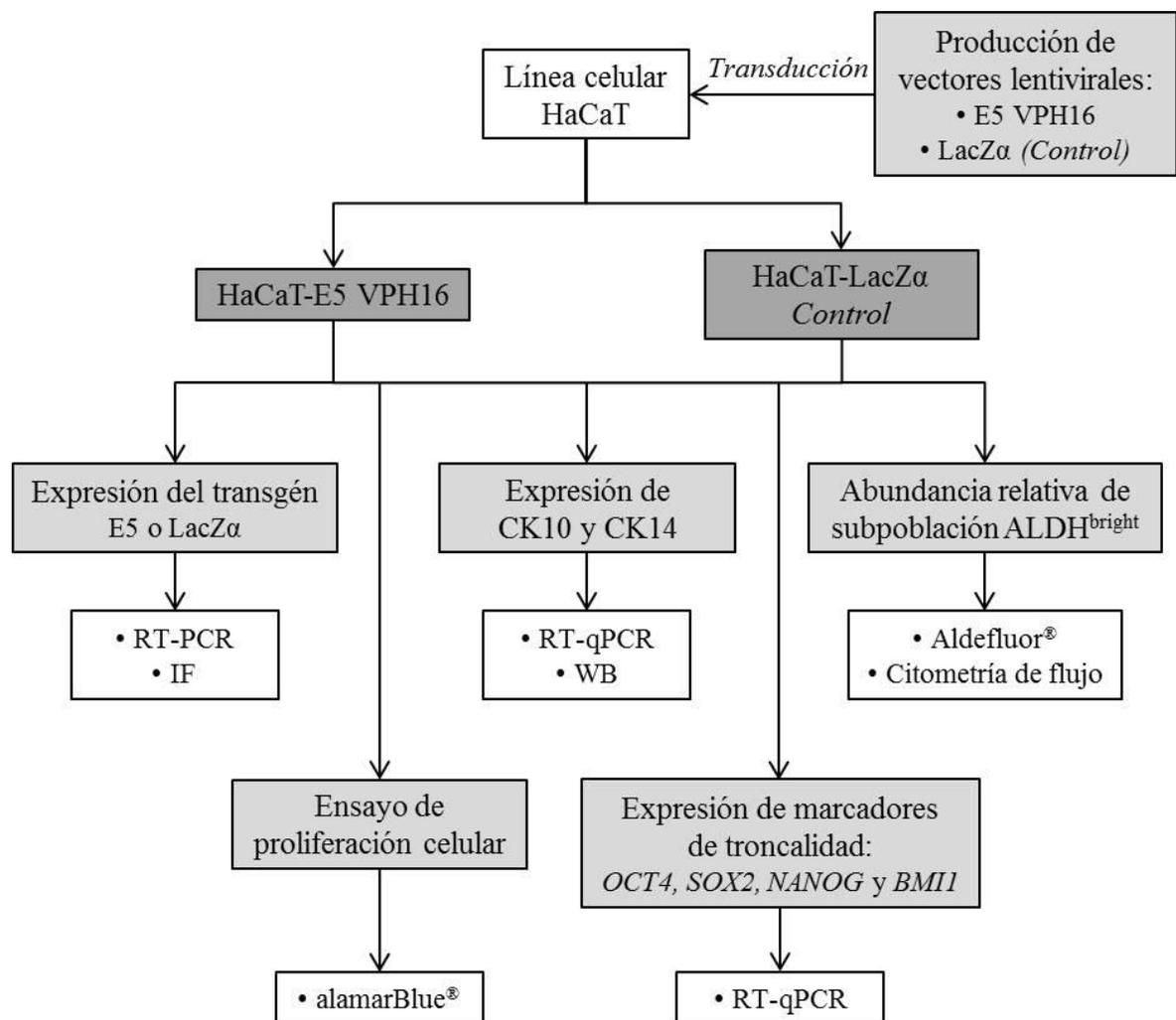
## **5 OBJETIVO GENERAL**

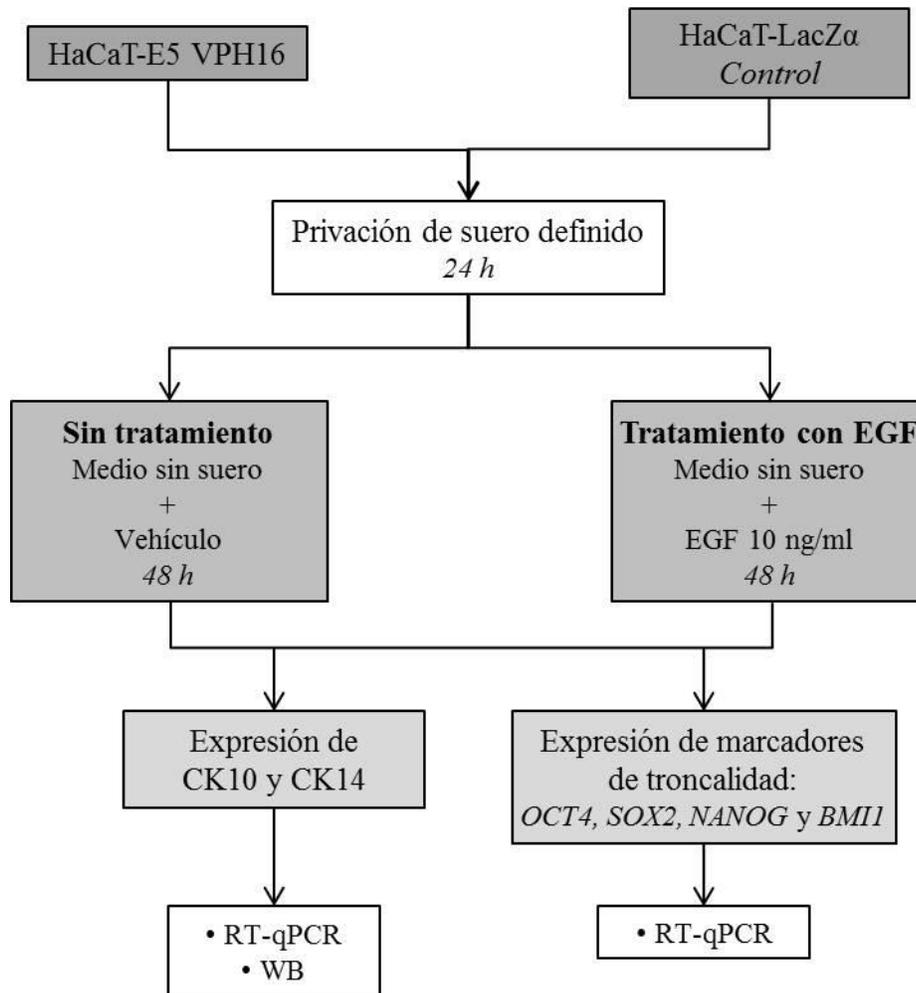
Analizar los efectos de la proteína E5 de VPH16 en la auto-renovación y la diferenciación temprana en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT, así como la participación de la vía del EGFR en estos procesos.

## **6 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Expresar de manera estable el gen E5 de VPH16 en la línea celular HaCaT.
2. Analizar los efectos de E5 VPH16 sobre la proliferación y la diferenciación temprana de las células HaCaT.
3. Determinar la abundancia relativa de células con características de troncalidad en las células HaCaT que expresan E5 VPH16.
4. Examinar la participación del EGF en la diferenciación temprana de las células HaCaT-E5 VPH16.
5. Evaluar el efecto del EGF sobre la expresión de marcadores de troncalidad en las células HaCaT-E5 VPH16.

## 7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





## **8 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Modelo de estudio**

El modelo de estudio utilizado en el presente trabajo fue la línea celular HaCaT, la cual fue donada por el Dr. Norbert E. Fusenig. Ésta es una línea celular de queratinocitos humanos obtenidos a partir de piel adulta considerada normal por criterios histológicos. Dentro de sus principales características destacan que es inmortalizada, no es tumorigénica, no contiene secuencias de VPH y tiene la capacidad de diferenciarse para formar un epitelio escamoso estratificado similar a la epidermis. Su nombre se debe a que fue obtenida de un humano adulto (Ha), en bajas concentraciones de calcio (Ca) y a temperatura elevada (38.5 °C) (T) (124, 125).

En nuestro grupo de trabajo se demostró que la línea celular HaCaT tiene una subpoblación celular con características de troncales (123). Además, estas células expresan varios miembros de la familia del receptor del EGF, tales como EGFR, ErbB2 y ErbB3, los cuales pueden formar heterodímeros y activarse en la presencia de ligandos como el EGF y el TGF- $\alpha$  (126). Por otro lado, esta línea celular ha sido utilizada ampliamente en el análisis de las funciones de E5 en múltiples estudios. Por lo que todas las características de esta línea celular la convierten en un buen modelo para los objetivos del presente trabajo.

### **8.2 Cultivo celular**

Las células HaCaT fueron adaptadas gradualmente al KnockOut Serum Replacement (KO SR, Gibco, 10828-028), un sustituto de suero fetal bovino (SFB) más definido, el cual fue diseñado para el crecimiento y mantenimiento de células troncales

embrionarias humanas y de otros mamíferos. Posteriormente, estas células se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12 (Ham) (1:1) (DMEM/F-12) (Gibco, 12500-062) suplementado con KO SR al 10 %, bicarbonato de sodio 29 mM, HEPES 10 mM, L-glutamina 2 mM (SIGMA-ALDRICH, G7513), piruvato de sodio 1 mM (SIGMA-ALDRICH, P5280), penicilina 50 U/ml y estreptomina 50 µg/ml (Gibco, 15140-122).

Las células HEK293-FT fueron adquiridas de la ATCC y se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) alto en glucosa (Gibco, 12100-046), suplementado con SFB (Gibco, 16000-044) al 10 %, bicarbonato de sodio 44 mM, HEPES 10 mM, L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, MEM aminoácidos no esenciales 10 mM (Gibco, 11140-050), penicilina 50 U/ml, estreptomina 50 µg/ml y geneticina 50 µg/ml.

Ambas líneas celulares se incubaron en atmósfera húmeda a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y se mantuvieron en fase de crecimiento exponencial. El subcultivo celular se realizó empleando tripsina al 0.5% con EDTA al 0.2% (SIGMA-ALDRICH, 59418C) a 37 °C para disociar las células en la monocapa. La viabilidad celular se determinó mediante una solución de azul de tripano (SIGMA-ALDRICH, T-6146) al 4 % en PBS.

### **8.3 Síntesis génica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

El gen E5 de VPH16 fue construido a partir de oligonucleótidos sintéticos mediante PCR como fue descrito por Disbrow y colaboradores (78), con algunas modificaciones. Se utilizaron seis oligonucleótidos correspondientes a la cadena sentido y seis correspondientes a la cadena antisentido del gen E5 de VPH16 (Tabla 1). Los oligonucleótidos sentido comenzaron en el codón de inicio y continuaron de manera contigua hasta terminar 18 bases antes del final del gen. Mientras que los oligonucleótidos antisentido comenzaron en el codón de paro y continuaron de manera contigua hasta terminar 18 bases antes del inicio del gen. De esta forma, los oligonucleótidos se sobrelaparon y actuaron como cebadores para la cadena opuesta. Al final de una ronda de PCR se obtuvo el gen completamente sintetizado sin necesidad de ligación.

Los oligonucleótidos se diluyeron a una concentración 100  $\mu$ M en agua desionizada estéril y se realizó una mezcla con 2  $\mu$ l de cada uno de ellos. Se llevó a cabo una primera PCR con 1  $\mu$ l de la mezcla de oligonucleótidos, GoTaq Flexi DNA Polymerase 5 U (Promega, M8295), 5X Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega) a 1X, mezcla de desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) 160  $\mu$ M, cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) 1 mM y la cantidad necesaria de agua desionizada estéril para un volumen final de 50  $\mu$ l. Bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos a 94°C por 45 s, 55°C por 45 s y 72°C por 30 s.

Orientación	Nombre	Secuencia (5'→3')
Sentido	ARE1-39E5-16wtFw	ATGACAAATCTTGATACTGCATCCACAACATTACTGGCG
	ARE40-78E5-16wtFw	TGCTTTTTGCTTTGCTTTTGTGTGCTTTTGTGTGTCTGC
	ARE79-117E5-16wtFw	CTATTAATACGTCCGCTGCTTTTGTCTGTGTCTACATAC
	ARE118-156E5-16wtFw	ACATCATTAAATAATATTGGTATTACTATTGTGGATAACA
	ARE157-195E5-16wtFw	GCAGCCTCTGCGTTTAGGTGTTTTATTGTATATATTATA
	ARE196-234E5-16wtFw	TTTGTTTATATACCATTATTTTAAATACATACACATGCA
Antisentido	ARE1-39E5-16wtRv	TTATGTAATTA AAAAGCGTGCATGTGTATGTATTA AAAA
	ARE40-78E5-16wtRv	TAATGGTATATAAACAATATAATATATACAATAAAAACA
	ARE79-117E5-16wtRv	CCTAAACGCAGAGGCTGCTGTTATCCACAATAGTAATAC
	ARE118-156E5-16wtRv	CAATATTATTAATGATGTGTATGTAGACACAGACAAAAG
	ARE157-195E5-16wtRv	CAGCGGACGTATTAATAGGCAGACACACAAAAGCACACA
	ARE196-234E5-16wtRv	AAAGCAAAGCAAAAAGCACGCCAGTAATGTTGTGGATGC

*Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la síntesis del gen E5 de VPH16.*

Enseguida se realizó una segunda PCR con el oligonucleótido sentido ARE<sub>Eco</sub>RIAUIE516wtFw: 5'-TTACATGAATTCATTGCCACCATGGACACCTATCGCTATATAACAAATCTTGATACTGC-3', el cual contiene el sitio de restricción EcoRI, una secuencia consenso Kozak y el epítipo AU1; y con el oligonucleótido antisentido ARE<sub>Bam</sub>HIE516wtRv: 5'-ATGTAAGGATCCTTATGTAATTA AAAAGCG-3', el cual contiene el sitio de restricción BamHI. Para esta PCR se mezclaron 1  $\mu$ l del producto de la

PCR anterior, GoTaq Flexi DNA Polymerase 5 U, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTPs 160 μM, 5X Colorless GoTaq Flexi Buffer a 1X, oligonucleótidos sentido y antisentido 1 μM, y el volumen de agua bidestilada estéril necesario para completar 50 μl. Las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 3 min; 30 ciclos a 94°C por 45 s, 48°C por 45 s y 72°C por 30 s, y un ciclo final a 72°C por 30 s. Posterior a esto se obtuvo un amplicón de 303 pb.

## 8.4 Clonaciones en el plásmido de transferencia pSin-EF2-Pur

Un fragmento del gen LacZα se obtuvo a partir del plásmido RSV-betaGal (Addgene, 24085) (127), mediante PCR con el oligonucleótido sentido ARELacZaEco02Fw: 5'-GAGAGAATTCATGGACACCTATCGCTATATAGTCGTTTT ACAACGTCGTGACT-3', el cual contiene el sitio de restricción EcoRI y el epítipo AU1; y con el oligonucleótido antisentido ARELacZaBam02Rv: 5'-GAGAGGATCCTTAGTG CATCTGCCAGTTT GAGG-3', que contiene el sitio de restricción BamHI. La PCR se llevó a cabo con la polimerasa de alta fidelidad Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen, 11708-013), para lo cual se realizó la siguiente mezcla: RSV-betaGal 100 ng, Platinum Pfx DNA Polymerase 2.5 U, 10X Pfx amplification buffer a 2X, sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) 1.5 mM, 10X PCRx Enhancer solution a 1X, dNTPs 1.2 mM, oligonucleótidos sentido y antisentido 800 nM y la cantidad necesaria de agua desionizada estéril para un volumen final de 25 μl. Y se utilizaron las siguientes condiciones: 94°C por 4 min, 1 ciclo; 94°C por 45 s, 60°C por 45 s y 72°C por 1 min, 35 ciclos; y 72°C por 5 min, 1 ciclo. El amplicón resultante tuvo un tamaño de 299 pb.

De manera paralela, el gen E5 de VPH16 y el fragmento génico LacZα se clonaron en el vector de tránsito pGEM-T Easy (Promega, A1360), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las ligaciones se transformaron en bacterias competentes JM109 (Promega, L2001) por el método de choque térmico. Se analizaron colonias candidatas por PCR (las condiciones de esta se indican en el apartado “PCR punto final”) y por reacciones de restricción con las enzimas EcoRI y BamHI (Thermo Scientific, ER0271 y ER0051) a 37°C durante 1.5 h.

Enseguida, E5 VPH16 y LacZ $\alpha$  se liberaron del pGEM-T Easy mediante reacciones de restricción con las enzimas EcoRI y BamHI, y se clonaron en el vector de transferencia pSin-EF2-Pur (Addgene, 16557) (128), a través de estos sitios de restricción, para obtener los plásmidos pSin-EF2-E5VPH16-Pur y pSin-EF2-LacZ $\alpha$ -Pur. Estos plásmidos se transformaron en bacterias competentes DH5 $\alpha$ . Las colonias candidatas se analizaron por PCR y reacciones de restricción como se indicó arriba. Finalmente, los plásmidos obtenidos se mandaron a secuenciar para determinar la ausencia de mutaciones y la posición correcta del transgén.

## 8.5 Generación de vectores lentivirales

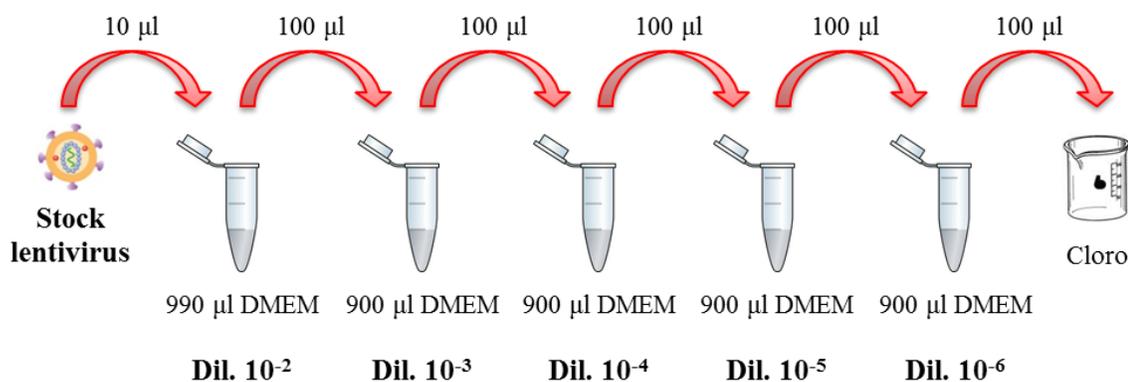
Para la producción de los vectores lentivirales Lenti-E5 VPH16 y Lenti-LacZ $\alpha$ , se sembraron células HEK293-FT en medio DMEM suplementado sin geneticina, a una densidad aproximada de 65,000 células/cm<sup>2</sup> en placas Petri de 100 mm. Al día siguiente las células presentaban una confluencia alrededor del 80 %. Éstas células fueron co-transfectadas con 3.0  $\mu$ g del plásmido de envoltura pMD2.G (Addgene, 12259), 2.5  $\mu$ g del plásmido de empaquetamiento psPAX2 (Addgene, 12260), 7.5  $\mu$ g del plásmido de transferencia pSin-EF2-E5VPH16-Pur (para la generación del Lenti-E5 VPH16) o pSin-EF2-LacZ $\alpha$ -Pur (para la producción del lentivirus control Lenti-LacZ $\alpha$ ), y 36  $\mu$ l de Lipofectamine Reagent (Invitrogen, 18324-020) en medio Opti-MEM (Gibco, 22600-050). Las células se incubaron con la mezcla de transfección a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Enseguida la mezcla de transfección se reemplazó por 5 ml de medio DMEM suplementado con butirato de sodio 4 mM (SIGMA-ALDRICH, B5887) sin geneticina, y las células se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> por 48 h, para permitir la producción de las partículas lentivirales.

Transcurridas las 48 h de incubación, el medio condicionado de las células HEK-293-FT se recolectó y se centrifugó a 500 g a 4 °C durante 15 min, para separar los restos celulares. A continuación, el sobrenadante se filtró a través de una membrana con poros de 0.45  $\mu$ m, se colocó en tubos y se centrifugó a 25,000 rpm por 2 h a 4 °C con aceleración y desaceleración máximas, en el rotor de columpio SW 41 Ti (BECKMAN COULTER) y la ultracentrífuga XL-90 (BECKMAN). En seguida, el sobrenadante se decantó en hipoclorito

de sodio al 10 % y se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de albúmina sérica bovina (BSA) al 0.01% en buffer salino de fosfatos (PBS, *Phosphate-buffered saline*) por cada placa utilizada. Los tubos se sellaron y se mantuvieron a 4 °C toda la noche para permitir la resuspensión de las partículas lentivirales. Al día siguiente, se realizaron alícuotas de trabajo y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

## 8.6 Titulación de vectores lentivirales

La concentración e infectividad de los stocks de vectores lentivirales se determinaron por el método de dilución limitante como se describe a continuación. Se sembraron células HaCaT a una densidad de 6,000 células/cm<sup>2</sup>, aproximadamente 57,600 células por pozo en una placa de 6 pozos, y se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Se prepararon diluciones seriadas del stock lentiviral desde 10<sup>-2</sup> hasta 10<sup>-6</sup>, en un volumen final de 900  $\mu\text{l}$  de medio DMEM suplementado con 10% de SFB, como se muestra en la Fig. 11. A continuación, se lavaron las células HaCaT con 1.5 ml de PBS y se adicionaron las diluciones de lentivirus a cada uno de los pozos. Se tuvo un pozo control al cual se le agregaron 900  $\mu\text{l}$  de medio DMEM con 10% de SFB sin lentivirus. Además, a cada pozo se le adicionó polybrene (bromuro de hexadimetrina, SIGMA-ALDRICH, H9268) a una concentración final de 8  $\mu\text{g/ml}$  para permitir la adsorción viral, y se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. La concentración utilizada de polybrene se determinó mediante una curva con concentraciones diferentes de éste (datos no mostrados), y se eligió aquella concentración que no ocasionó daño a las células en 24 h y que fue la más frecuentemente reportada en la literatura.



*Figura 11. Titulación de los vectores lentivirales por el método de dilución limitante. Se preparan diluciones seriadas del stock lentiviral y con ella se infectan el mismo número de células. Después de la selección con puromicina se cuentan las colonias de células presentes en las diluciones mayores, para calcular el título viral.*

Pasadas las 24 h, se retiró el medio de cultivo de las células HaCaT, se lavaron con 1.5 ml de PBS y se les adicionaron 2 ml de medio DMEM suplementado. Nuevamente se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. El día siguiente se añadió a las células el antibiótico de selección puromicina (SIGMA-ALDRICH, P8833) a una concentración final de 0.4 µg/ml, para eliminar aquellas células que no fueron infectadas. Para continuar con la selección de las células transducidas, cada 2 días se lavaron con PBS y se les adicionó medio fresco con puromicina. La concentración de puromicina se determinó a través de una curva con concentraciones diferentes de ésta (datos no mostrados), y se seleccionó la concentración con la cual las células sin infectar se murieron en un periodo de 3 a 5 días.

Después de 8 días de selección en presencia de puromicina, las células HaCaT se lavaron dos veces con 2 ml de PBS, se fijaron y tiñeron con 700 µl de cristal violeta al 1 % en etanol al 70 % durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el cristal violeta, se dieron 3 lavados con 2 ml de PBS y un lavado final con 2 ml de agua bidestilada, para eliminar restos de cristal violeta y sales.

Para determinar el título del stock lentiviral, se identificaron los 2 pozos de las diluciones más altas en los cuales había colonias de células. En estos pozos se contaron las colonias conformadas por 4 células o más, las cuales en teoría fueron generadas a partir de una célula transducida por una partícula viral. Mediante la siguiente fórmula se calcularon las unidades de transducción (TU) por ml en cada dilución y se promediaron para obtener el título final (129):

$$\frac{TU}{ml} = \frac{\text{Número de colonias}}{(\text{Factor de dilución})(\text{Volumen de dilución adicionado})}$$

## 8.7 Transducción y selección celular

Las células HaCaT se sembraron en medio DMEM suplementado con 10% de KO SR y se incubaron alrededor de 24 h. Enseguida se lavaron una vez con PBS y se infectaron con 1 MOI (*multiplicity of infection*, multiplicidad de infección) del Lenti-E5 VPH16 o del Lenti-LacZ $\alpha$  en presencia de polybrene a 8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  durante 24 h. Además, se tuvo un control de células sin infectar. Para calcular el volumen de stock lentiviral que se utilizaría para la infección se emplearon las siguientes ecuaciones (129):

$$TU \text{ necesarias} = (\text{Número de células sembradas})(MOI)$$
$$ml \text{ de stock lentiviral} = \frac{TU \text{ necesarias}}{\text{Título del stock lentiviral en TU/ml}}$$

Transcurridas las 24 h de infección, para retirar las partículas lentivirales, las células se lavaron una vez con PBS y se les adicionó medio fresco. El día siguiente se inició la selección de las células infectadas con puromicina a una concentración de 0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La selección se mantuvo hasta el día 7 post-infección, ya que para este día en el control sin infectar todas las células habían muerto, por lo que se consideró que el cultivo celular tenía únicamente células que expresaban el transgén.

## 8.8 Tratamiento con EGF

Para sobre-activar la vía del EGFR, las células HaCaT, HaCaT-E5 VPH16 y HaCaT-LacZ $\alpha$  se sembraron por duplicado en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de KO SR y 0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de puromicina (en el caso de las células HaCaT se utilizó medio sin puromicina), y se incubaron de 20 a 24 h en las condiciones previamente descritas. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS y se les adicionó medio DMEM-F12 sin KO SR con puromicina, para mantenerlas en privación de suero durante 24 h. Transcurrido el periodo de privación, las células se lavaron una vez con PBS y se les adicionó medio de cultivo sin KO SR con puromicina suplementado con EGF humano recombinante (SIGMA-ALDRICH, E9644) a una concentración de 10  $\text{ng}/\text{ml}$ . Como control sin tratamiento se tuvieron células a las que se les adicionó medio sin KO SR con puromicina suplementado únicamente con el vehículo en el cual se encontraba disuelto el EGF (ácido acético 0.1  $\mu\text{M}$

y albúmina sérica bovina 4.9x10<sup>5</sup>%). Enseguida, las células se incubaron durante 15 min o 48 h en las condiciones especificadas.

## **8.9 Extracción de RNA y síntesis de cDNA**

El RNA se obtuvo de células HaCaT-E5 VPH16 y HaCaT-LacZ $\alpha$  sembradas en cajas Petri de 60 mm que se encontraban alrededor del 80% de confluencia. Estas se lavaron 2 veces con 2 ml de PBS, se les adicionaron 500  $\mu$ l de TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, 15596-018) y se rasparon con un gendarme. Los lisados se transfirieron a tubos para microcentrífuga y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Enseguida se les adicionaron 100  $\mu$ l de cloroformo, se agitaron vigorosamente para mezclar las fases y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Se centrifugaron a 13,000 rpm a 4 °C por 15 min, después de lo cual se obtuvieron dos fases, y se recolectó la fase acuosa (superior) en tubos nuevos. Para precipitar el RNA, se adicionaron 2 volúmenes de isopropanol frío, se mezclaron e incubaron a -20 °C por 20 min. Posteriormente, se centrifugaron a 13,000 rpm a 4 °C durante 30 min y se desechó el sobrenadante. Se dió un lavado con etanol, para lo cual se adicionaron 700  $\mu$ l de etanol al 70%, nuevamente se centrifugaron a 13,000 rpm a 4 °C por 10 min y se desechó el sobrenadante. Después de dejar secar las pastillas de RNA aproximadamente 10 min a temperatura ambiente, se resuspendieron en 12.5  $\mu$ l de agua desionizada estéril.

Para eliminar el DNA presente en las soluciones de RNA, se les adicionaron 2.5  $\mu$ l de RQ1 DNase 10X Reaction Buffer (Promega) y 10  $\mu$ l (10 U) de RQ1 RNase-Free DNase (Promega, M6101), y se incubaron a 37 °C durante 2 h. Después de esto se añadieron 2.5  $\mu$ l de Stop Solution (Promega) y se incubaron a 65 °C por 15 min. Los RNAs obtenidos se cuantificaron por espectrofotometría con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se almacenaron a -70 °C.

El cDNA se sintetizó a partir de 2  $\mu$ g de RNA, para lo cual en tubos nuevos y estériles se colocaron: el volumen requerido de RNA, Oligo(dT)15 Primer (Promega, C1101) 0.5  $\mu$ g y la cantidad necesaria de agua MilliQ estéril para completar un volumen de 13.5  $\mu$ l. Esta mezcla se homogenizó e incubó a 70 °C durante 5 min, y después a 4 °C por 5 min. En hielo se adicionaron: M-MLV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer a 1 X,

dNTPs 2 mM, RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, N211A) 20 U y M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, 1701) 200 U, en un volumen final de 25  $\mu$ l. La mezcla se homogenizó perfectamente, se incubó a 42 °C durante 1.5 h y después a 4 °C durante 5 min. Los cDNAs obtenidos se guardaron a -20 °C.

## 8.10 PCR punto final

Para los ensayos de PCR punto final se realizó la siguiente mezcla de reacción: cDNA aproximadamente 80 ng, GoTaq Flexi DNA Polymerase 1 U, 5X Colorless GoTaq Flexi Buffer a 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTPs 400  $\mu$ M, oligonucleótidos sentido y antisentido 400 nM, y la cantidad necesaria de agua desionizada estéril para un volumen final de 15  $\mu$ l. Las características de los oligonucleótidos empleados se presentan en la Tabla 2.

Las condiciones de reacción para determinar la expresión de E5 VPH16 y LacZ $\alpha$  fueron las siguientes: desnaturalización inicial 94°C por 3 min, 1 ciclo; desnaturalización 94°C por 45 s, alineamiento 60°C por 45 s y extensión 72°C por 45 s, 30 ciclos; y extensión final 72°C por 5 min, 1 ciclo. El perfil para determinar la expresión de  $\beta$ -actina fue como sigue: desnaturalización inicial 94°C por 5 min, 1 ciclo; desnaturalización 94°C por 30 s, alineamiento 60°C por 45 s y extensión 72°C por 45 s, 25 ciclos; y extensión final 72°C por 7 min, 1 ciclo. La amplificación de  $\beta$ 2-microglobulina (*B2M*) se llevó a cabo para descartar la posible contaminación con DNA genómico, y el perfil térmico empleado fue el siguiente: desnaturalización inicial 96°C por 5 min, 1 ciclo; desnaturalización 96°C por 30s, alineamiento 60°C por 45 s y extensión 72°C por 1 min, 35 ciclos; y extensión final 72°C por 10 min, 1 ciclo.

Los productos de PCR se mezclaron con buffer de carga (ver apéndice), se separaron por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio a aproximadamente 0.4  $\mu$ g/ml y se observaron con una lámpara de luz ultravioleta. El tamaño de los amplicones obtenidos se presenta en la Tabla 2.

## 8.11 PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR) se realizó con el estuche comercial Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, K0222) en el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para la mezcla de reacción se utilizaron 80 ng de cDNA, 7.5  $\mu$ l de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), oligonucleótidos sentido y antisentido específicos (sus características y concentraciones finales se indican en la Tabla 2), y la cantidad necesaria de agua desionizada estéril para un volumen final de 15  $\mu$ l. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 1 ciclo de 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 45 s y la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) específica para cada par de oligos (Tabla 2) por 1 min. Como control de un gen endógeno constitutivo, se analizó la expresión de  $\beta$ -Actina.

La expresión génica relativa se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (130, 131). Los ciclos umbral (CTs, *cycle thresholds*) para el gen de interés y el gen constitutivo ( $\beta$ -Actina) fueron determinados para cada muestra. Subsecuentemente se determinó el  $\Delta CT$  de cada muestra, para normalizar las diferencias en la cantidad de ácidos nucleicos en cada reacción, mediante la fórmula:

$$\Delta CT = CT_{gen\ interés} - CT_{gen\ constitutivo}$$

Enseguida, se calculó el  $\Delta\Delta CT$  como sigue:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{muestra} - \Delta CT_{control}$$

Finalmente, la expresión relativa del gen de interés en cada una de las muestras con respecto a la condición control se calculó con la fórmula:

$$Expresión\ relativa = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Gen	Nombre	Secuencia (5'→3')	$T_m$ (°C)	Conc. final	Tamaño amplicón (pb)
$\beta$ -Actina	AREActinqPCRfw	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	60	400 nM	184
	AREActinqPCRRv	AGCACTGTGTTGGCGTACAG			

<i>B2M</i>	B2MG2Fw	ACCCCACTGAAAAAGATGAGTAT	60	400 nM	100 (727 DNA genómico)
	B2MG2Rv	ATGATGCTGCTTACATGTCTCGAT			
<i>CK10</i>	VDCRTCK10Fw	TGATGTGAATGTGGAAATGAATGC	60	400 nM	147
	VDCRTCK10Rv	GTAGTCAGTTCCTTGCTCTTTTCAT			
<i>CK14</i>	ARERTck14Fw	GATGATTGGCAGCGTGGAG	60	400 nM	168
	ARERTck14Rv	AACTGGGAGGAGGAGAGGT			
E5 VPH16	AREEcoRIAU1E5 16wtFw	TTACATGAATTCATTGCCACCATG GACACCTATCGCTATATAACAAAT CTTGATACTGC	60	400 nM	303
	AREBamHIE516 wtRv	ATGTAAGGATCCTTATGTAATTAA AAAGCG			
<i>LacZα</i>	ARELacZαEco02 Fw	GAGAGAATTCATGGACACCTATCG CTATATAGTCGTTTTACAACGTCGT GACT	60	400 nM	299
	ARELacZαBam02 Rv	GAGAGGATCCTTAGTGCATCTGCC AGTTTGAGG			
<i>NANOG</i>	VDCRTNanFw	GCAATGGTGTGACGCAGAAG	63	200 nM	100
	VDCRTNanRv	ATTGGAAGGTTCCCAGTCGG			
<i>OCT4</i>	VDCRTOct4Fw	CTTCGCAAGCCCTCATTTCACC	63	200 nM	155
	VDCRTOct4Rv	GGTCCGAGGATCAACCCAG			
<i>SOX2</i>	VDCRTSox2Fw	TCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG	60	400 nM	231
	VDCRTSox2Rv	AGAGGCAAACCTGGAATCAGGA			

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para PCR punto final y qPCR.

## 8.12 Inmunofluorescencia indirecta

Las células HaCaT, HaCaT-E5 VPH16 y HaCaT-LacZα se sembraron en placas de 6 pozos sobre cubreobjetos limpios y estériles, y se cultivaron bajo las condiciones previamente descritas por al menos 48 h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS a 37 °C, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS atemperado a 37 °C durante 30 min y se lavaron 2 veces con PBS en agitación a 75 rpm por 5 min. Se realizó recuperación de

antígeno con citrato de sodio 10 mM pH 6 en baño María a ebullición durante 15 min. Enseguida, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.25% en PBS a temperatura ambiente por 30 min y se lavaron 3 veces con PBS en agitación por 5 min.

Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, las células se bloquearon con suero de cerdo al 5% en PBS durante 2.5 h. A continuación se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón contra el epítipo AU1 (AU1 Monoclonal Antibody, COVANCE, MMS-130R) a una dilución 1:1,000, o con un anticuerpo inespecífico con características similares al anterior, como control de isotipo (normal mouse IgG, Santra Cruz Biotechnology, sc-2025), a una concentración equivalente, en suero de cerdo al 1.5% en PBS en cámara húmeda a 4 °C toda la noche. Para retirar los anticuerpos unidos inespecíficamente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 (PBST) al 0.1% en agitación por 10 min y un lavado rápido con PBS. Después, las células se incubaron con un anticuerpo secundario contra IgG de ratón acoplado a FITC (*Fluorescein isothiocyanate*, Isotiocianato de fluoresceína) [Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch, 115-095-062] a una dilución 1:200 en PBS a temperatura ambiente por 2 h. Trascurrido el tiempo de incubación, se dieron 3 lavados con PBST al 0.3% en agitación durante 15 min y un lavado rápido con PBS. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a una concentración de 1 µg/ml en agua desionizada durante 3 min y enseguida se dieron 2 lavados con PBS por 5 min con agitación.

Finalmente, los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos utilizando la resina Vectashield Mounting Medium (Vector, H-100). Las imágenes de fluorescencia fueron adquiridas con el microscopio confocal Leica TCS SP8 equipado con un objetivo de 63.0x1.40 y el software Leica LAS AF Versión: 2.6.3 build 8173 (Leica Microsystems). Se escanearon 10 planos sagitales abarcando la altura total de la muestra y se obtuvo la proyección máxima de estos. Las imágenes fueron editadas con el software Image-Pro Plus Versión 6.0.0.260 (Media Cybernetics, Inc.).

### 8.13 Ensayo de proliferación celular

La proliferación celular se analizó en células HaCaT-E5, a partir de 8 días de ser infectadas con el lentivirus, y en células HaCaT-LacZα mediante el reactivo alamarBlue (BIO-RAD, BUF012B). Para lo cual se sembraron por cuadruplicado 2,000 células por pozo en placas de 24 pozos los días 1, 3, 4 y 5 previos a la lectura del ensayo, se cultivaron bajo condiciones estándar y se les cambió el medio cada tercer día. Transcurrido el tiempo indicado de cultivo, se retiró el medio a cada uno de los pozos, se lavaron con 500 µl de PBS una vez y se les añadieron 450 µl de Opti-MEM más 50 µl de alamarBlue, para tener una concentración final del 10%. Enseguida, las placas se oscilaron para homogenizar perfectamente el alamarBlue y se incubaron durante 5 h a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>.

Se tuvieron dos condiciones control: el blanco, para el cual se incubaron en un pozo limpio 500 µl de Opti-MEM suplementado con 10% de alamarBlue durante 5 h, juntamente con el resto de las células; y la forma 100% reducida de alamarBlue, que se obtuvo incubando células confluentes con 500 µl de Opti-MEM suplementado con 10% de alamarBlue por aproximadamente 24 h, ésta se guardó a 4 °C y para cada ensayo se atemperó una alícuota a 37 °C con el resto de las muestras.

Pasado el tiempo de incubación con el alamarBlue, se transfirieron 150 µl de medio de cada pozo y de los controles a una placa de 96 pozos. La fluorescencia emitida por el alamarBlue reducido por las células fue medida en el fluorímetro y luminómetro de microplacas Fluoroskan Ascent FL (Labsystems), utilizando un filtro de excitación de 544 nm y un filtro de emisión de 590 nm. El porcentaje de reducción de alamarBlue para cada pozo se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción de alamarBlue} = \frac{S^x - S^{blanco}}{S^{100\% \text{ reducido}} - S^{blanco}} (100)$$

En donde  $S^x$  es la señal de fluorescencia de alamarBlue en la muestra,  $S^{100\% \text{ reducido}}$  es la señal de la forma 100 % reducida de alamarBlue y  $S^{blanco}$  es la señal del blanco. Asimismo se calculó el valor promedio de los 4 pozos correspondientes a cada condición (132).

## **8.14 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) e inmunodetección en fase sólida (Western blot)**

Extractos totales de proteínas se obtuvieron a partir de células HaCaT-E5 y HaCaT-LacZα sembradas en cajas Petri de 100 mm con una confluencia de alrededor del 80%. Para esto las células se lavaron dos veces con 3 ml de buffer salino de Tris (TBS) frío, se les adicionaron 150 µl de buffer RIPA (*radioimmunoprecipitation assay*) Bolen-modificado suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas (revisar apéndice) y se incubaron sobre hielo durante 5 min. Enseguida se rasparon con un gendarme y los lisados se transfirieron a tubos para microcentrífuga.

Los lisados fueron homogenizados mediante sonicación con un equipo BRANSON SONIFIER 450 (VWR Scientific), bajo las siguientes condiciones: *Duty Cycle* 10 %, *Output Control* 2, ciclos de 3 pulsos de 20 s y 20 s de reposo entre cada pulso, con descansos de 1 min entre ciclos. Se dieron 3 ciclos para obtener lisados sin restos celulares visibles, se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Lowry con el estuche comercial DC Protein Assay (BIO-RAD, 500-0112), siguiendo el protocolo para el ensayo en microplaca. Para lo cual se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina en buffer RIPA Bolen-modificado con concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 µg/µl de proteína. En una placa de 96 pozos para lector de ELISA se colocaron por triplicado 5 µl de cada dilución de la curva patrón y de las muestras, 25 µl del reactivo A' (el cual se preparó previamente mezclando 980 µl del reactivo A y 20 µl del reactivo S) y 200 µl del reactivo B. Se agitó la placa a 120 rpm durante 5 min y se analizó con el equipo Microplate Reader Benchmark (BIO-RAD) a una longitud de onda de 655 nm. Enseguida se realizaron alícuotas de trabajo de los extractos proteicos y se almacenaron a -70 °C.

Cantidades iguales de proteínas, 30 µg, se sometieron a SDS-PAGE a través de geles concentradores al 5% y geles separadores al 10 % (133). Las proteínas se mezclaron con buffer de carga a 1 X (ver apéndice) y se incubaron en agua en ebullición durante 5 min. Enseguida se cargaron en los geles, junto con el marcador de peso molecular

PageRuler Plus (Thermo Scientific, 26619), y se migraron electroforéticamente con amperaje constante de 35 mAmp por aproximadamente 2 h. Posteriormente, los geles se equilibraron por 30 min en buffer de transferencia (apéndice) y las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2  $\mu$ m (BIO-RAD, 162-0097), a 90 volts constantes por 90 min a 4 °C (134). La calidad de la transferencia se evaluó tiñendo las membranas con una solución de rojo de Ponceau (ver apéndice).

Después las membranas se bloquearon con leche baja en grasa al 5% en TBS durante una hora con agitación a temperatura ambiente. Las proteínas específicas fueron inmunodetectadas en estas membranas con los anticuerpos primarios mencionados en la Tabla 3 a las diluciones indicadas en TBS durante toda la noche a 4 °C. Para retirar los anticuerpos en exceso o unidos inespecíficamente se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 20 al 0.2% (TBST) y un lavado con TBS por 10 min con agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios contra IgG de ratón 1:3,000 [Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch, 115-035-003] o contra IgG de conejo 1:7,500 [Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch, 111-035-003] acoplados a peroxidasa de rábano picante (HRP), en leche al 5% en TBS durante 1 h con agitación a temperatura ambiente. A continuación se lavaron 3 veces con TBST y una vez con TBS por 10 min a temperatura ambiente en agitación.

<b>Antígeno</b>	<b>Anticuerpo</b>	<b>No. catálogo, compañía</b>	<b>Características</b>	<b>Dil.</b>	<b>PM de la proteína</b>
$\beta$ -Actina	Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin-Peroxidase antibody (AC-15)	A3854, SIGMA-ALDRICH	Monoclonal de ratón, IgG1, 2-4 mg/ml	1:75,000	42 kDa
CK10	Anti-Cytokeratin 10 antibody (EP1607IHCY)	ab76318, Abcam	Monoclonal de conejo, IgG	1:350	59 kDa
CK14	Cytokeratin 14 (LL001)	sc-53253, Santa Cruz Biotechnology	Monoclonal de ratón, IgG2a, 200 $\mu$ g/ml.	1:50	52 kDa

EGFR	EGFR (1005)	sc-03, Santa Cruz Biotechnology	Policlonal de conejo, IgG, 200 µg/ml	1:150	170 kDa
EGFR fosforilado	p-EGFR (Tyr 1173)	sc-101668, Santa Cruz Biotechnology	Policlonal de conejo, IgG, 100 µg/ml	1:150	170 kDa

*Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados para Western blot.*

Las proteínas inmunodetectadas fueron reveladas con el sustrato quimioluminiscente de la HRP SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34087). Para lo cual se mezclaron 500 µl de la solución Luminol/Enhancer y 500 µl de la solución Stable Peroxide, se colocaron sobre la membrana de nitrocelulosa e incubaron durante 5 min. Inmediatamente las membranas fueron expuestas a placas autoradiográficas por periodos diferentes. Enseguida estas se sumergieron en solución reveladora y solución fijadora (GBX, Carestream DENTAL) durante 5 min. Finalmente, las placas se fotografiaron y las bandas correspondientes a las proteínas se cuantificaron por densitometría con el software Image J (National Institutes of Health, USA).

## 8.15 Citometría de flujo

La actividad de la ALDH en las células HaCaT-E5 VPH16 y HaCaT-LacZα se evaluó con el kit ALDEFLUOR (STEMCELL Technologies, 01700). Las células fueron cosechadas con tripsina como se indicó anteriormente, se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en el ALDEFLUOR Assay Buffer a una concentración de  $1 \times 10^6$  de células/ml. A un ml de suspensión celular se le adicionaron 5 µl de ALDEFLUOR Reagent activado, se resuspendió y 500 µl se co-incubaron con 5 µl del inhibidor DEAB (Dietilaminobenzaldehído). Ambas condiciones se incubaron a 37°C en baño María durante 45 min. Enseguida, las células se centrifugaron a 3,500 rpm por 5 min a 4 °C, se les retiró el sobrenadante, se resuspendieron en 500 µl de ALDEFLUOR Assay Buffer y se mantuvieron en hielo. 20,000 eventos fueron capturados con el citómetro BD LSRFortessa

(BD Biosciences) y se analizaron con el software Summit V5.1.0.5563 (Beckman Coulter, Inc.).

## **8.16 Análisis estadístico**

Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  la desviación estándar (DE) de al menos 3 ensayos independientes. Los datos fueron analizados mediante una prueba T de Student pareada de dos colas con intervalos de confianza del 95%, para determinar la significancia estadística de las diferencias en los valores entre dos grupos. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.01 (GraphPad Software, Inc.). La significancia estadística fue definida como un valor de  $p < 0.05$ .

## **9 RESULTADOS**

### **9.1 Síntesis del gen E5 de VPH16**

La síntesis de secuencias de DNA permite producir genes sin la necesidad de utilizar un DNA templado. Además, ésta es una herramienta útil para modificar genes con el propósito de incrementar su nivel de expresión en sistemas heterólogos (135). Por lo cual en el presente trabajo se decidió obtener el gen E5 de VPH16 mediante síntesis basada en PCR a partir de oligonucleótidos.

Doce oligonucleótidos de 39 bases (b), que codifican para las cadenas sentido y antisentido del gen E5, fueron sometidos a una PCR para ensamblar el gen de 252 pares de bases (pb), sin necesidad de ligación (Fig. 12A). Como resultado de esta PCR se tuvieron amplicones de diversas longitudes menores a 300 pb, los cuales se pueden apreciar como un barrido en la Fig. 12B, carril 1. Estos podrían corresponder a moléculas del gen ensamblado total y parcialmente, y a oligonucleótidos sobrantes. Enseguida se realizó una segunda PCR con el producto de la PCR anterior y con un par de oligonucleótidos que permitieron añadir al gen E5 los sitios de restricción EcoRI y BamHI, para su clonación en un plásmido (descrita más adelante); una secuencia consenso Kozak, para incrementar la traducción de la proteína E5 (136); y el epítipo AU1 en el extremo 5', para la identificación de la proteína E5 (Fig. 12A). Después de esta segunda PCR se observó un amplicón que coincide con el tamaño esperado de 303 pb (Fig. 12B, carril 3), lo que indica que se obtuvo el gen E5 de VPH16 sintetizado completamente.



## 9.2 Clonación del gen E5 de VPH16 y del fragmento génico LacZ $\alpha$ en el plásmido de transferencia pSin-EF2-Pur

El gen E5 de VPH16 fue clonado en el vector de transferencia pSin-EF2-Pur para obtener el plásmido pSin-EF2-E5VPH16-Pur. Para esto, inicialmente el gen E5 se ligó en el vector de tránsito pGEM-T Easy. Enseguida, E5 fue liberado de este vector mediante reacciones de restricción con las enzimas EcoRI y BamHI, y fue clonado en el plásmido pSin-EF2-Pur a través de estos sitios de restricción. Se obtuvieron varias colonias de bacterias candidatas para la construcción pSin-EF2-E5VPH16-Pur, las cuales fueron analizadas mediante PCR y reacciones de restricción con EcoRI y BamHI. Como se puede observar en la Fig. 13, en las colonias 2, 3, y 5 se pudo corroborar por ambos métodos la presencia de un inserto correspondiente a E5 de VPH16. La colonia 2 fue seleccionada y se secuenció para corroborar la integridad y la localización correcta del gen E5. En la Fig. 14 se observa la secuencia del gen E5 con el epítipo AU1, la secuencia consenso Kozak y los sitios de restricción EcoRI y BamHI sin alteraciones en el plásmido pSin-EF2-E5VPH16-Pur.

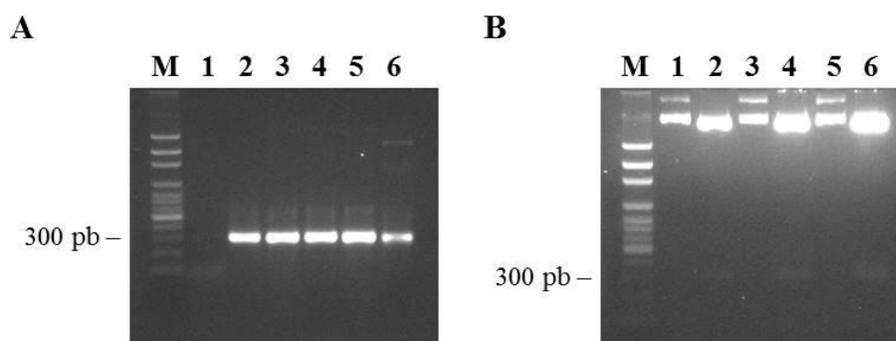


Figura 13. Clonación de E5 VPH16 en el plásmido pSin-EF2-Pur. A) PCR de colonias candidatas para el plásmido pSin-EF2-E5VPH16-Pur. M- Marcador de peso molecular, 1- Control negativo, 2- Colonia (Col.) 1, 3- Col. 2, 4- Col. 3, 5- Col. 5, 6- pGEMT-E5VPH16. B) Reacciones de restricción de plásmidos candidatos pSin-EF2-E5VPH16-Pur. M- Marcador de peso molecular, 1- Col. 2 sin restringir (S/R), 2- Col. 2 EcoRI/BamHI, 3- Col. 3 S/R, 4- Col. 3 EcoRI/BamHI, 5- Col. 5 S/R, 6- Col. 5 EcoRI/BamHI.

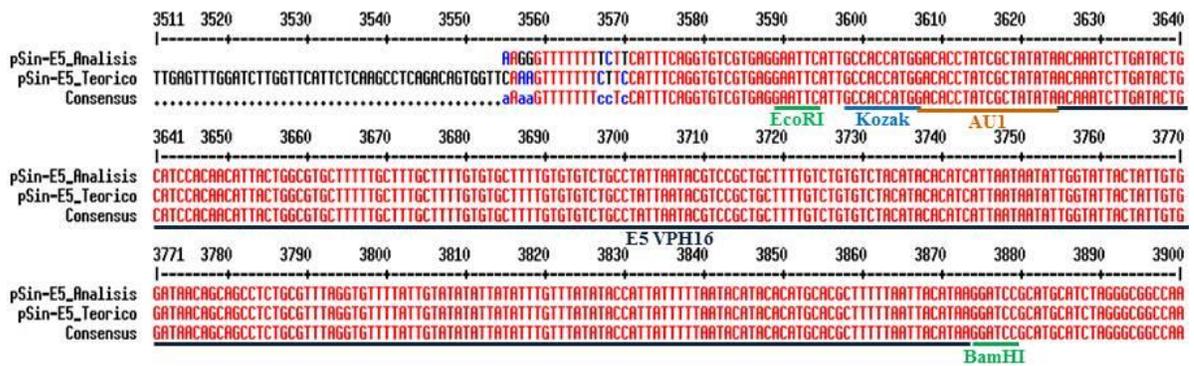


Figura 14. Secuencia de E5 VPH16 en el plásmido pSin-EF2-E5VPH16-Pur. En este alineamiento se muestra la comparación de la secuencia obtenida experimentalmente, pSin-E5\_Analisis, con la secuencia teórica, pSin-E5\_Teórico, del plásmido pSin-EF2-E5VPH16-Pur. Subrayados con diferentes colores se indican los sitios de restricción EcoRI y BamHI, la secuencia Kozak y el gen E5 de VPH16 con el epítipo AUI en su extremo 5'. Obtenida con el programa MultAlin (137).

El plásmido pSin-EF2-E5VPH16-Pur se utilizó para la producción del sistema lentiviral Lenti-E5 VPH16, como se describirá más adelante. Este plásmido codifica para un bicistrón que contiene el transgén E5 VPH16, un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES, *internal ribosome entry site*) del virus de la encefalomiocarditis, y un gen que confiere resistencia a la puromicina, cuyo producto es una N-acetiltransferasa de puromicina (Fig. 15) (Addgene, 16577). La expresión de este bicistrón es controlada por el promotor constitutivo para el factor de elongación-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) de humano (138).

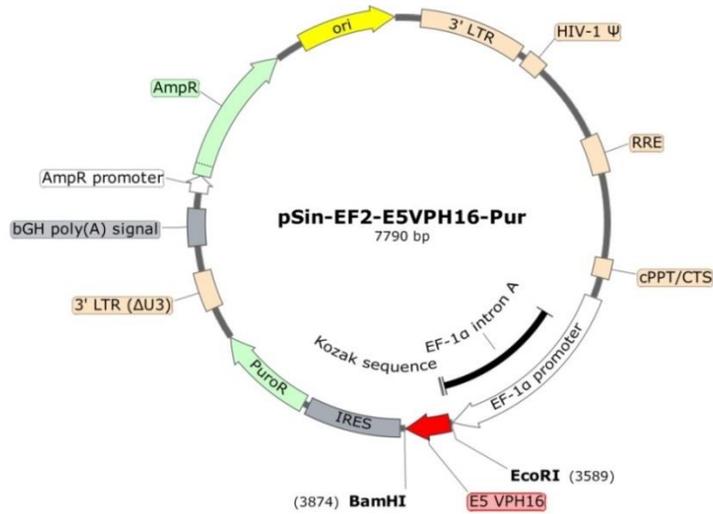


Figura 15. Mapa del plásmido pSin-EF2-E5VPH16-Pur. El gen E5 de VPH16 se encuentra ubicado entre los sitios de restricción EcoRI y BamHI, río abajo de éste se localizan el IRES y el gen de resistencia a la puomicina (PuroR), mientras que río arriba se ubica el promotor para el EF-1 $\alpha$ . Elaborado con SnapGene V.4.0.5.

Para la producción de un sistema lentiviral control, se construyó el plásmido pSin-EF2-LacZ $\alpha$ -Pur. Con este fin, un fragmento del gen LacZ de *E. coli*, denominado LacZ $\alpha$  (139), con tamaño similar al del gen E5 de VPH16 (261 pb) fue amplificado por PCR a partir del plásmido RSV-betaGal. En esta PCR se utilizaron oligonucleótidos que contenían los sitios de restricción EcoRI y BamHI, así como el epítipo AU1, y se obtuvo un amplicón de 299 pb, como se observa en la Fig. 16A.

Posteriormente, el fragmento LacZ $\alpha$  fue clonado en el vector de tránsito pGEM-T Easy, y a partir de éste fue liberado con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI para subclonarlo en el plásmido pSin-EF2-Pur a través de estos sitios de restricción. Se tuvieron varias colonias candidatas para el plásmido pSin-EF2-LacZ $\alpha$ -Pur, las cuales fueron analizadas por PCR y reacciones de restricción con las enzimas EcoRI y BamHI. Las colonias 1, 2, 3, y 4 contenían el inserto LacZ $\alpha$ , como se determinó por ambos métodos (Fig. 16), por lo que la colonia 1 fue seleccionada para continuar trabajando con ella. El fragmento LacZ $\alpha$  fue secuenciado en el pGEM-T y, como se observa en la Fig. 17, no se presentaron mutaciones en su secuencia.

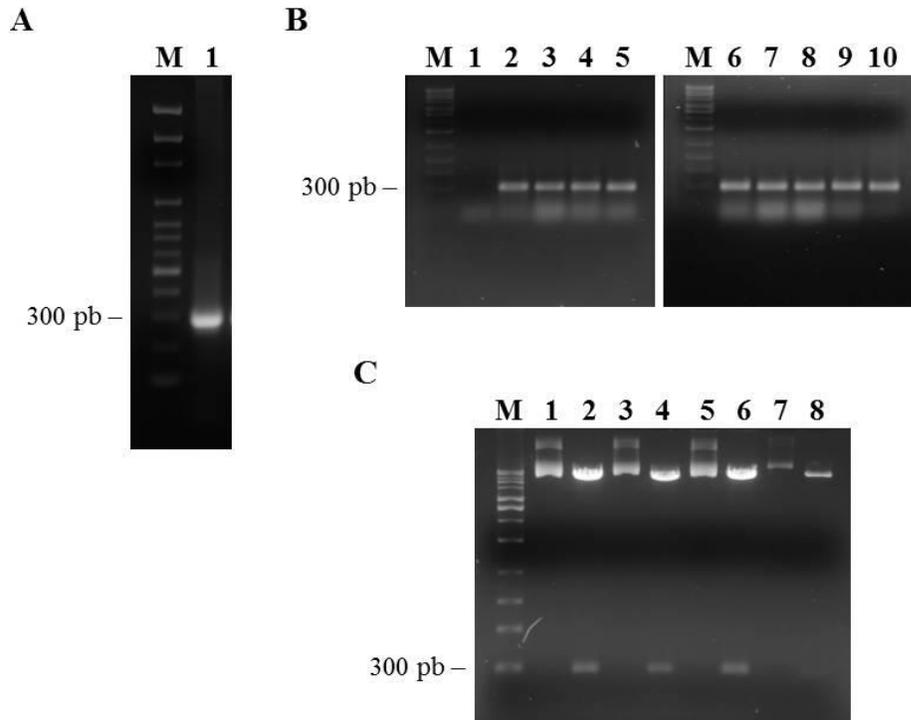


Figura 16. Clonación de *LacZα* en el plásmido *pSin-EF2-Pur*. A) PCR para obtener el fragmento génico *LacZα* a partir del plásmido *RSV-betaGal*. M– Marcador de peso molecular, 1– *LacZα*. B) PCR de colonias candidatas para el plásmido *pSin-EF2-LacZα-Pur*. M– Marcador de peso molecular, 1– Control negativo, 2– Col. 1, 3– Col. 2, 4– Col. 3, 5– Col. 4, 6– Col. 5, 7– Col. 6, 8– Col. 7, 9– Col. 8, 10– *pRSV-betaGal*. C) Reacciones de restricción de plásmidos candidatos *pSin-EF2-LacZα-Pur*. M– Marcador de peso molecular, 1– Col. 1 S/R, 2– Col. 1 *EcoRI/BamHI*, 3– Col. 2 S/R, 4– Col. 2 *EcoRI/BamHI*, 5– Col. 3 S/R, 6– Col. 3 *EcoRI/BamHI*, 7– Col. 4 S/R, 8– Col. 4 *EcoRI/BamHI*.

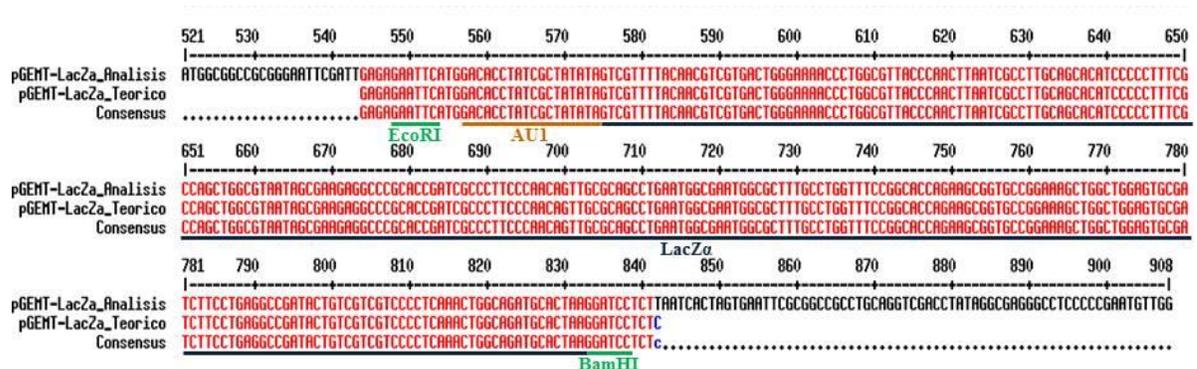


Figura 17. Secuencia de LacZα en el plásmido pGEMT-LacZα. En este alineamiento se presenta la comparación de la secuencia obtenida experimentalmente, pGEMT-LacZα\_Analisis, con la secuencia teórica, pGEMT-LacZα\_Teorico. Subrayados con diferentes colores se indican los sitios de restricción EcoRI y BamHI, el fragmento génico LacZα y el epítipo AU1 en su extremo 5'. Elaborada con el programa MultAlin (137).

En la Fig. 18 se muestra el mapa del plásmido pSin-EF2-LacZα-Pur. Al igual que el plásmido pSin-EF2-E5VPH16-Pur, éste codifica para un bicistrón, que contiene el fragmento LacZα, un IRES y el gen de resistencia a la puromicina, bajo el control del promotor para el EF-1α.

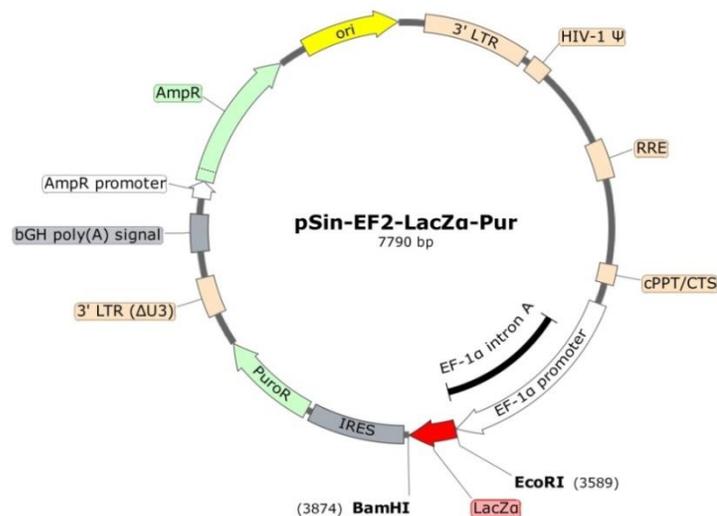


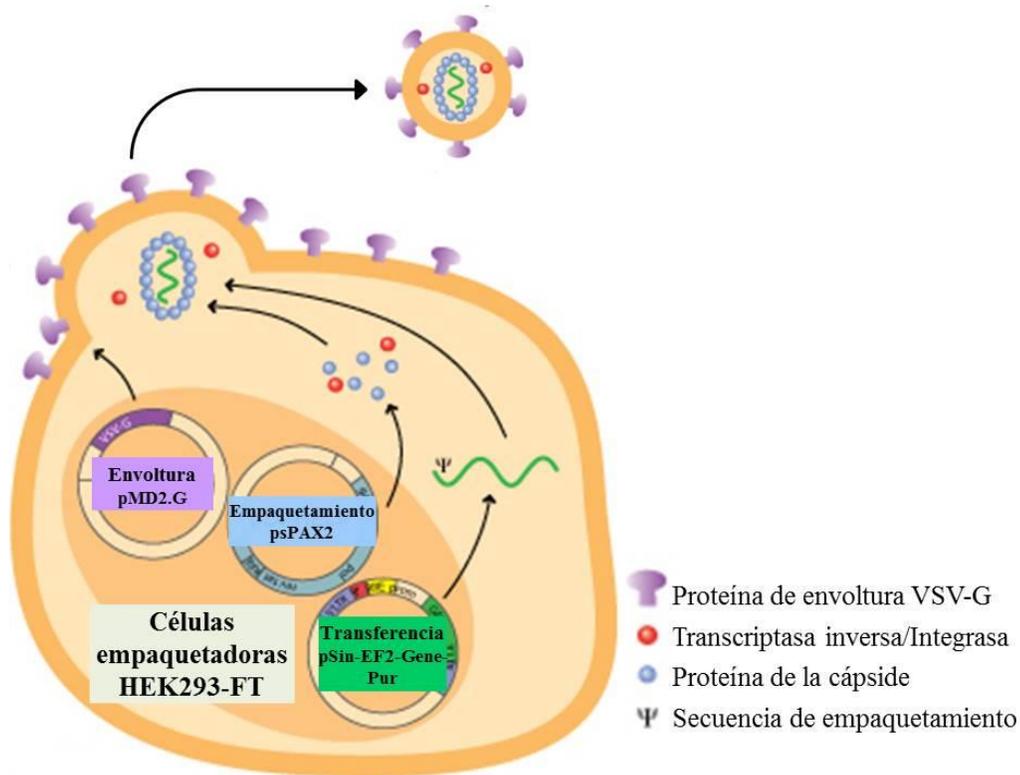
Figura 18. Mapa del plásmido pSin-EF2-LacZα-Pur. El fragmento génico LacZα se encuentra entre los sitios de restricción EcoRI y BamHI, río abajo de éste se localizan el IRES y el gen de resistencia a la puromicina (PuroR), mientras que río arriba se ubica el promotor para el EF-1α. Elaborado con SnapGene V.4.0.5.

### 9.3 Producción y titulación de los vectores lentivirales E5 VPH16 y LacZα

Un sistema lentiviral fue empleado para expresar el gen E5 de VPH16 y el fragmento LacZα en las células HaCaT. Los vectores lentivirales presentan múltiples ventajas para la entrega de moléculas de DNA recombinante (transgenes) en las células

huésped. Éstos pueden transducir células en división y células quiescentes (140), como las células troncales, las cuales han sido descritas que se dividen esporádicamente (33, 40). Así mismo, el transgén es integrado en el genoma de la célula huésped, lo que resulta en su expresión a largo plazo, ya que es transcrito durante toda la vida de la célula infectada y es transferido a las células hijas. Además, el uso de los vectores lentivirales es seguro, ya que son incapaces de replicarse, inducen mutagénesis por inserción con una frecuencia menor que sus contrapartes retrovirales, y las secuencias necesarias para su generación han sido segregadas en múltiples plásmidos (140).

Para la generación de las partículas lentivirales Lenti-E5 VPH16 y Lenti-LacZ $\alpha$ , tres plásmidos fueron co-transfectados en las células empaquetadoras HEK293-FT: un plásmido de empaquetamiento (psPAX2), un plásmido de envoltura (pMD2.G) y un plásmido de transferencia (pSin-EF2-E5VPH16-Pur para el Lenti-E5 VPH16, y pSin-EF2-LacZ $\alpha$ -Pur en el caso del Lenti-LacZ $\alpha$ ) (Fig. 19). El plásmido de empaquetamiento contiene las secuencias necesarias para las proteínas de la cápside y la matriz, una transcriptasa inversa y una integrasa. El plásmido de envoltura codifica para la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), la cual interactúa con un receptor ubicuo en las células o con un fosfolípido de la membrana celular. De tal manera que esta pseudotipificación de las partículas virales les permite transducir un rango más amplio de células huésped y les confiere una mayor estabilidad. Finalmente, el plásmido de transferencia comprende la secuencia del transgén y las secuencias requeridas para la encapsidación, la transcripción reversa, la integración y la expresión (140, 141).



*Figura 19. Producción de las partículas lentivirales. Los plásmidos de empaquetamiento, envoltura y transferencia fueron co-transfectados en las células empaquetadoras HEK293-FT. En estas células las partículas lentivirales fueron ensambladas y enseguida liberadas en el sobrenadante, a partir del cual se purificaron. Adaptada de InvivoGen (142).*

Las partículas lentivirales fueron ensambladas por las células HEK293-FT y liberadas en el medio de cultivo. A partir de éste, se purificaron y concentraron por ultracentrifugación. Posteriormente, los stocks lentivirales fueron titulados mediante el método de dilución limitante (Fig. 20). Este método fue seleccionado porque permite determinar únicamente las partículas con capacidad infectiva (unidades de transducción, TU) presentes en los stocks lentivirales. Los títulos que tuvieron los lentivirus fueron entre  $10^5$  y  $10^6$  TU/ml en un volumen final de alrededor de 250  $\mu$ l.

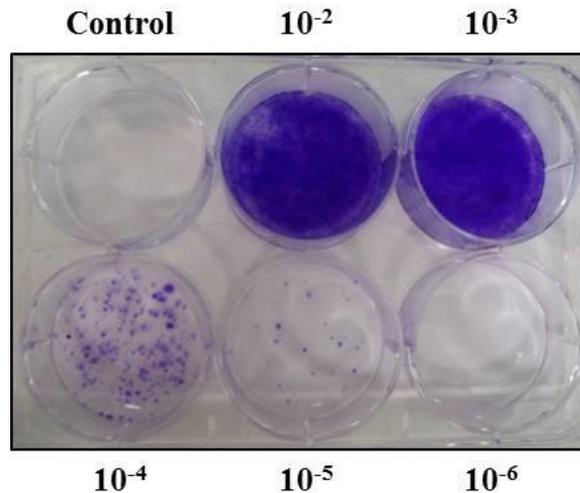


Figura 20. Titulación de los stocks lentivirales por el método de dilución limitante. Se realizaron diluciones seriadas del stock lentiviral ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) y con éstas se infectaron células HaCaT en los diferentes pozos, como control se tuvieron células en un pozo sin infectar. Después de un periodo de selección con puromicina, las células se tiñeron con cristal violeta y las colonias celulares presentes en las diluciones mayores se contaron para calcular el título lentiviral.

#### 9.4 Transducción celular y expresión del transgén E5 de VPH16 en las células HaCaT

Las células HaCaT fueron transducidas con 1 MOI de los vectores Lenti-E5 VPH16 o Lenti-LacZ $\alpha$ , y fueron seleccionadas con el fármaco puromicina, por al menos 5 días, para tener cultivos puros de células HaCaT que expresaron el transgén E5 de VPH16 (HaCaT-E5 VPH16) o LacZ $\alpha$  (HaCaT-LacZ $\alpha$ ) (Fig. 21). Estas últimas células se utilizaron como control para corroborar que el tratamiento con puromicina no tuviera efectos sobre los procesos estudiados.

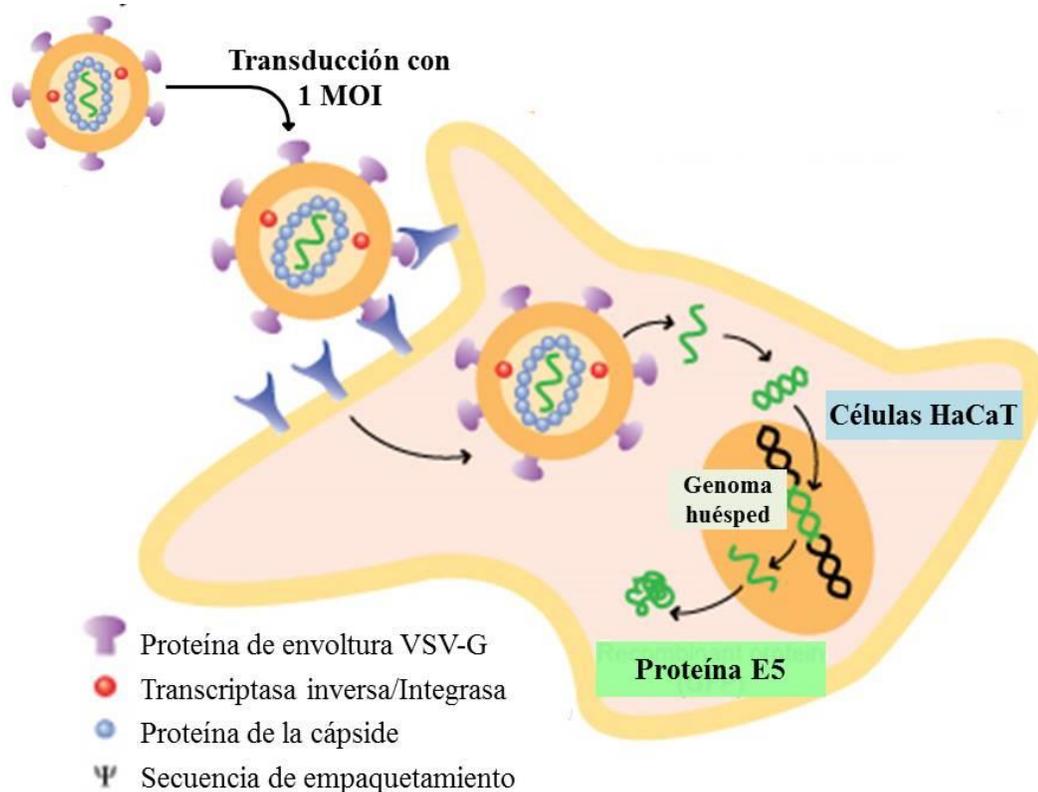


Figura 21. Transducción de las células HaCaT con los vectores lentivirales. Las células HaCaT fueron infectadas con 1 MOI de los lentivirus Lenti-E5 VPH16 o Lenti-LacZa y seleccionadas con puromicina para obtener las células HaCaT-E5 VPH16 y HaCaT-LacZa, respectivamente. Adaptada de InvivoGen (142).

Después de la transducción de las células HaCaT con los lentivirus y la selección con puromicina, la expresión de E5 de VPH16 se analizó a nivel de mRNA mediante RT-PCR y a nivel de proteína por inmunofluorescencia indirecta, a los 7, 9, 12 y 15 días post-infección. La expresión del gen E5 a nivel de mRNA se pudo corroborar en las células HaCaT-E5 VPH16 en todos los tiempos analizados (Fig. 22A). Además, en las células control se observó la expresión del mRNA correspondiente a LacZa. Mientras que en las células HaCaT-wild type (wt) no se detectó el mRNA de E5 ni el de LacZa. Por otro lado, se pudo corroborar que no hubo contaminación entre las líneas celulares, pues en aquellas células transducidas con el Lenti-E5 VPH16 no se detectó el mRNA de LacZa, y viceversa, en las células infectadas con el Lenti-LacZa no se observó el mRNA de E5.

La expresión de la proteína E5 se detectó mediante inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo dirigido contra el epítipo AU1. Ya que como se mencionó anteriormente, la secuencia de ésta bandera de 6 aminoácidos se incorporó en el extremo 5' del gen E5 de VPH16, de tal manera que en la proteína E5 se localizó en el extremo amino terminal. El epítipo AU1 fue seleccionado porque es pequeño y previamente se ha sugerido que no altera las funciones de la proteína E5 de VPH16 (78). La proteína E5 se detectó en las células HaCaT-E5 VPH16 a los 7, 9, 12 y 15 días post-infección y presentó una localización perinuclear (Fig. 22B), lo que sugiere que podría estar situada en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, como se ha reportado anteriormente (78, 143). La expresión de esta proteína no fue homogénea en todas las células del cultivo, ya que en éstas se pudieron observar diferentes intensidades de fluorescencia, e incluso algunas presentaron una fluorescencia muy marcada. Además, en algunas células se apreciaron regiones puntuales con una mayor intensidad de fluorescencia, lo cual podría sugerir la presencia de cúmulos de múltiples moléculas de E5. Sin embargo, la expresión de la proteína E5 comenzó a disminuir a partir de los 15 días post-infección, puesto que a este tiempo se observó una menor intensidad de fluorescencia en las células, en comparación con lo observado a los días 7, 9 y 12 días post-infección. Esta disminución en la expresión de E5 fue más notable a los 20 días post-infección (datos no mostrados), ya que a este tiempo sólo en algunas células se logró apreciar fluorescencia y con una distribución puntual, no obstante que mantuvieron la resistencia a puromicina, lo que sugiere que E5 se continúa expresando pero en bajas cantidades.

En las células control también se analizó la expresión de LacZ $\alpha$  con el anticuerpo contra AU1 por inmunofluorescencia indirecta, y se observó una expresión débil de esta proteína con una localización principalmente perinuclear (Fig. 22B). Mientras que en las células HaCaT-wt no se detectó expresión de proteínas con el anticuerpo contra AU1, ya que únicamente se observó un poco de fondo en la preparación (Fig. 22B), similar al detectado en aquellas células procesadas con un anticuerpo primario inespecífico (Control de isotipo. Cuadros insertados en la Fig. 22B).

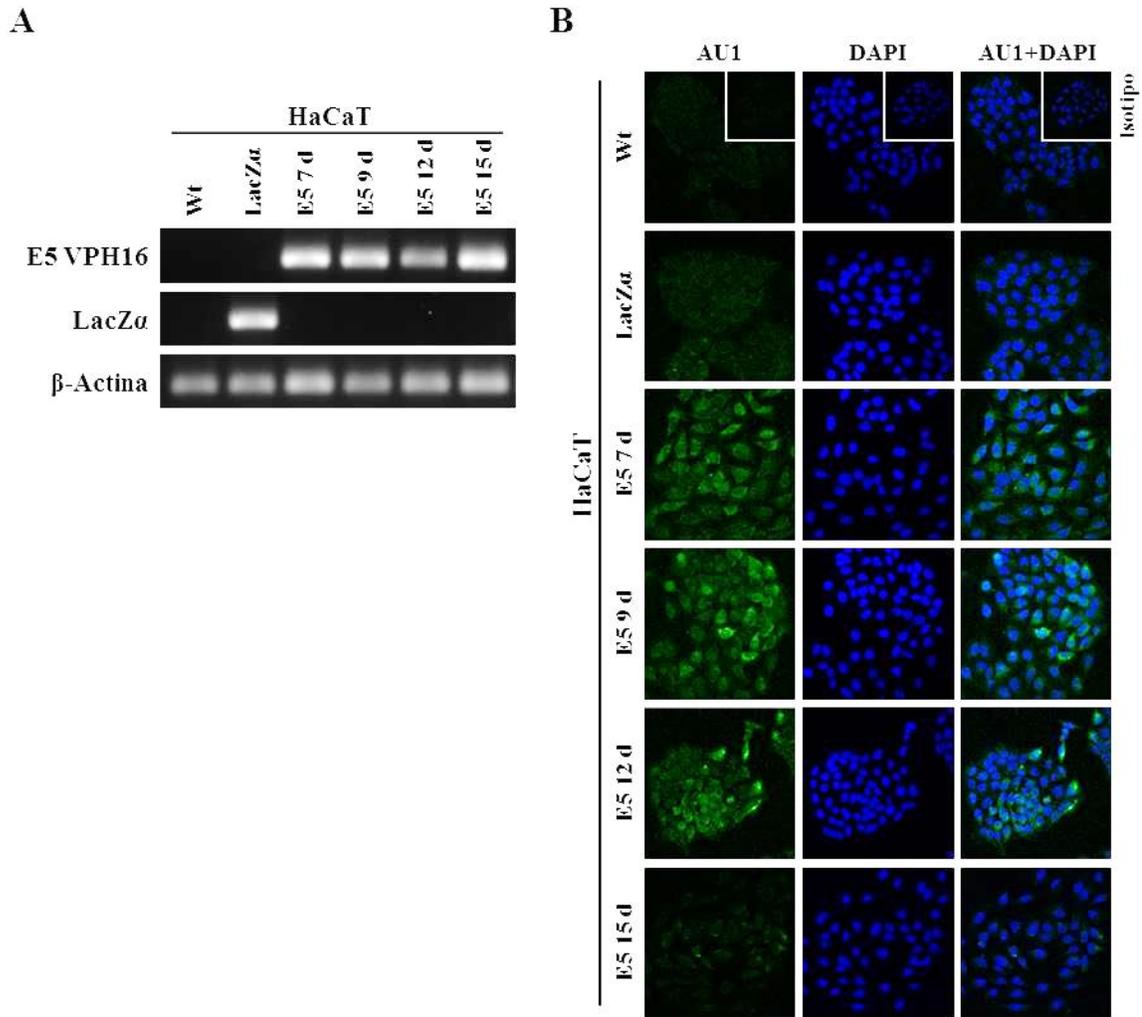


Figura 22. Expresión del gen E5 de VPH16 en las células HaCaT. A) La expresión de E5 VPH16 y de LacZ $\alpha$  a nivel de mRNA se analizó en las células HaCaT-wild type (wt), HaCaT-LacZ $\alpha$  y HaCaT-E5 VPH16, en éstas últimas a los 7, 9, 12 y 15 días post-infección (E5 7 d, E5 9 d, E5 12 d y E5 15 d), mediante RT-PCR con oligonucleótidos específicos. La expresión del gen  $\beta$ -Actina se determinó como control de carga. B) La expresión de las proteínas E5 VPH16 y LacZ $\alpha$  se evaluó en las células HaCaT-wt, HaCaT-LacZ $\alpha$  y HaCaT-E5 VPH16, en este último caso a los 7, 9, 12 y 15 días post-infección (E5 7 d, E5 9 d, E5 12 d y E5 15 d), por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo contra la bandera AU1 y un anticuerpo secundario marcado con FITC. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI y se presentan las imágenes con la doble tinción. En las imágenes insertadas se muestra el

*control de isotipo, el cual fue realizado con un anticuerpo primario inespecífico. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes.*

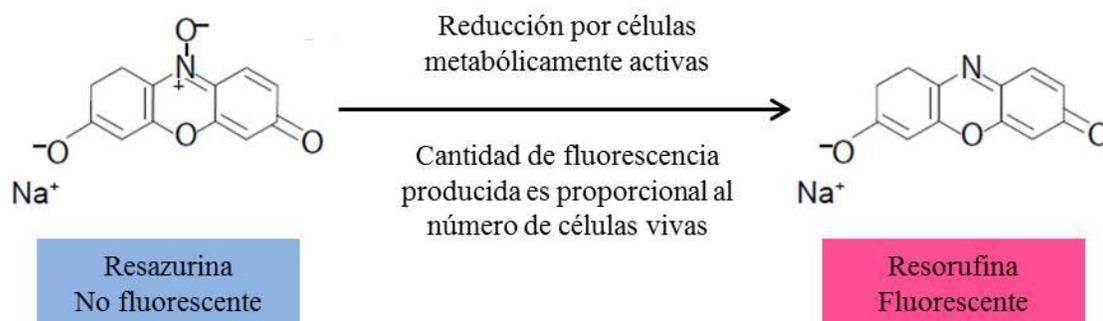
Las observaciones anteriores nos permitieron aseverar que se obtuvo un sistema en el cual se expresó el gen E5 de VPH16 en la línea celular HaCaT de manera estable y constante, por al menos 12 días. Por tal motivo, los efectos de E5 sobre las células HaCaT se evaluaron entre los días 7 y 12 posteriores a la infección. Igualmente, se establecieron células que expresaron de manera estable el fragmento génico LacZ $\alpha$  (HaCaT- LacZ $\alpha$ ), las cuales fueron utilizadas durante 10 pasajes aproximadamente, debido a que únicamente fueron empleadas como control y mantuvieron la resistencia al fármaco puromicina.

## **9.5 Proliferación de las células HaCaT que expresan E5 de VPH16**

Como se mencionó anteriormente en los antecedentes, la proteína E5 altera el proceso de proliferación en las células epiteliales (85, 118). Por lo cual se decidió analizar el efecto de E5 de VPH16 sobre la proliferación de las células HaCaT.

La proliferación celular se analizó en las células HaCaT-E5 VPH16, a partir del día 8 post-infección después de ser completamente seleccionadas con puromicina, y en las células HaCaT-LacZ $\alpha$  mediante un ensayo con alamarBlue. El ingrediente activo del alamarBlue es la resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-ona), un indicador redox permeable a las células, que exhibe cambios colorimétricos y fluorométricos relacionados con la actividad metabólica celular. La resazurina se encuentra en forma oxidada, es azul y no fluorescente, ésta es convertida por las células viables y metabólicamente activas en resorufina, la forma reducida, de color rosa o roja y fluorescente (Fig. 23). Esta conversión ocurre intracelularmente, mediante actividad enzimática mitocondrial y al aceptar electrones del NADPH, FADH, FMNH, NADH y de los citocromos. De esta forma, la tasa de reducción de la resazurina, y por tanto la cantidad de fluorescencia emitida, es proporcional al número de células vivas presentes en el cultivo (144-146). Por lo que es posible analizar la proliferación celular cuantificando la reducción de este indicador en diferentes tiempos del cultivo celular.

El ensayo con alamarBlue presenta varias ventajas sobre otros métodos para el análisis de la proliferación celular, entre las cuales se encuentran las siguientes: es sencillo y rápido de desarrollar, es relativamente barato, es más sensible que los ensayos de reducción con sales de tetrazolium y no es radiactivo; además, la resazurina es soluble en agua y en amortiguadores fisiológicos, es estable en el medio de cultivo y no es tóxica para las células (144-146).



*Figura 23. Principio del ensayo de alamarBlue. La resazurina se encuentra en forma oxidada, azul y no fluorescente, ésta es reducida por células metabólicamente activas en resorufina, rosa y fluorescente. La reducción, y por tanto la cantidad de fluorescencia producida es proporcional al número de células vivas en el cultivo. Adaptada de Markaki, 2009 (132).*

Para realizar el ensayo de proliferación celular, se sembraron el mismo número de células HaCaT-E5 VPH16 y HaCaT-LacZ $\alpha$ , se mantuvieron bajo condiciones estándar de cultivo, y el porcentaje de reducción de alamarBlue producido por éstas fue determinado a los días 1, 3, 4 y 5 de cultivo. Como se puede observar en la Fig. 24, las células HaCaT-E5 VPH16 presentaron una proliferación menor que las células HaCaT-LacZ $\alpha$ . Esta disminución en la proliferación fue significativa a los 4 y 5 días de cultivo, siendo más notable a los 5 días, cuando se observó una disminución de alrededor del 45%.

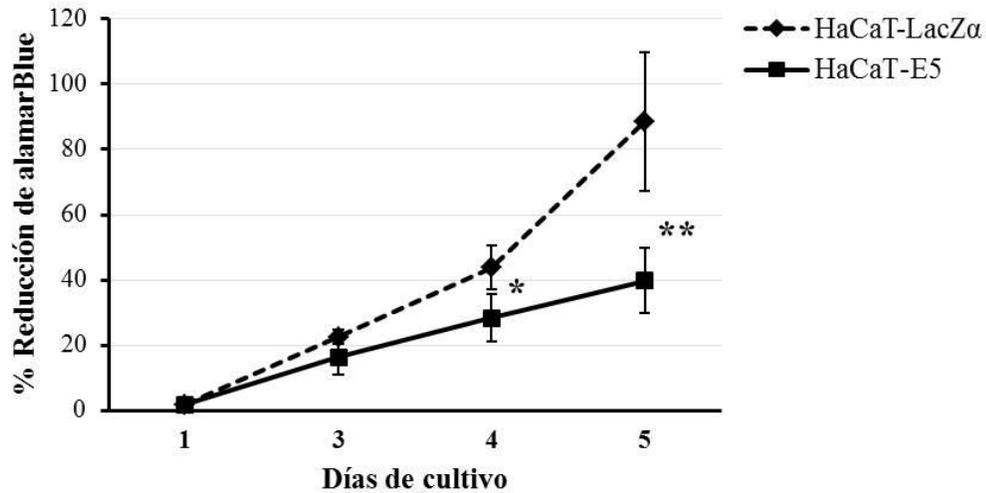


Figura 24. Efecto de E5 de VPH16 sobre la proliferación de las células HaCaT. Las células HaCaT-LacZα y HaCaT-E5 VPH16 fueron sembradas a la misma densidad, y el porcentaje de reducción de alamarBlue que generaron fue determinado a los días 1, 3, 4 y 5 de cultivo para construir las curvas de proliferación presentadas. Los valores son expresados como el promedio  $\pm$  DE de cuatro ensayos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

E5 de VPH16 provocó una disminución en la proliferación de las células HaCaT, esto podría ser debido a la inducción de muerte celular. Sin embargo, las células fueron teñidas y contadas con el colorante vital azul de tripano antes de ser sembradas para cada ensayo, y no se observaron diferencias importantes en el porcentaje de viabilidad entre ellas,  $85.4 \pm 7.9\%$  en las células HaCaT-E5 y  $83.4 \pm 8.8\%$  para las células HaCaT-LacZα. Por otro lado, la disminución observada en la proliferación podría deberse a que E5 podría estar activando un proceso de diferenciación en las células HaCaT.

## 9.6 Expresión de las citoqueratinas 10 y 14 en las células HaCaT-E5 VPH16

Con la finalidad de determinar si E5 de VPH16 estaba induciendo un proceso de diferenciación en las células HaCaT, la expresión de CK10 y CK14 fue analizada en las células HaCaT-E5 VPH16, a los 7 días post-infección, y HaCaT-LacZα a nivel de mRNA por RT-qPCR y a nivel de proteína mediante SDS-PAGE y Wester blot. La CK14 es

expresada específicamente por los queratinocitos indiferenciados de la capa basal del epitelio (33, 35). Mientras que la CK10 es considerada un marcador de diferenciación expresado por las células diferenciadas de las capas suprabasales del epitelio y por las células ED de la capa basal (33, 35, 45, 67).

Los niveles de expresión de CK14 fueron similares en las células HaCaT-E5 VPH16 y HaCaT-LacZ $\alpha$ , tanto a nivel de mRNA (Fig. 25A) como a nivel de proteína (Fig. 25B y C), ya que no se observaron diferencias significativas en ninguno de los casos. Por otro lado, en las células HaCaT-E5 VPH16 se observó un incremento significativo en la expresión de CK10. Dicho incremento fue de alrededor de 4 veces a nivel de mRNA (Fig. 26A) y de aproximadamente 3 veces a nivel de proteína (Fig. 26B y C), con respecto a la expresión presentada por las células HaCaT-LacZ $\alpha$ .

El incremento en la expresión de CK10 nos indica que E5 de VPH16 activó un proceso de diferenciación temprana en las células HaCaT.

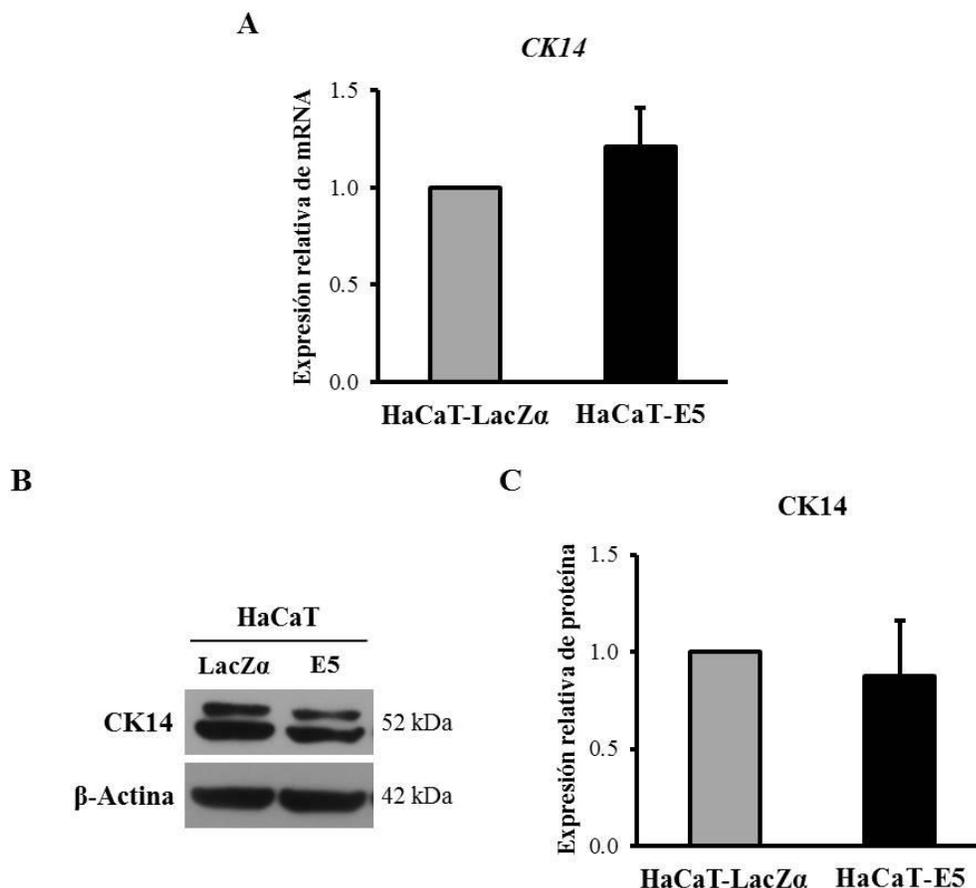


Figura 25. Efecto de E5 de VPH16 sobre la expresión de CK14 en las células HaCaT. A) Los niveles relativos de mRNA de CK14 se evaluaron en las células HaCaT-LacZα y HaCaT-E5 VPH16, mediante RT-qPCR a los 7 días post-infección. La expresión fue normalizada con los niveles de mRNA del gen constitutivo β-Actina. Los datos en la gráfica son expresados como el promedio ± DE de al menos tres ensayos independientes. B y C) Los niveles de proteína de CK14 se analizaron por SDS-PAGE y Western blot con un anticuerpo específico y se normalizaron con los niveles de la proteína β-Actina. En B) se muestra un Western blot representativo y en C) se presentan los resultados de las densitometrías como el promedio ± DE de al menos tres ensayos independientes.

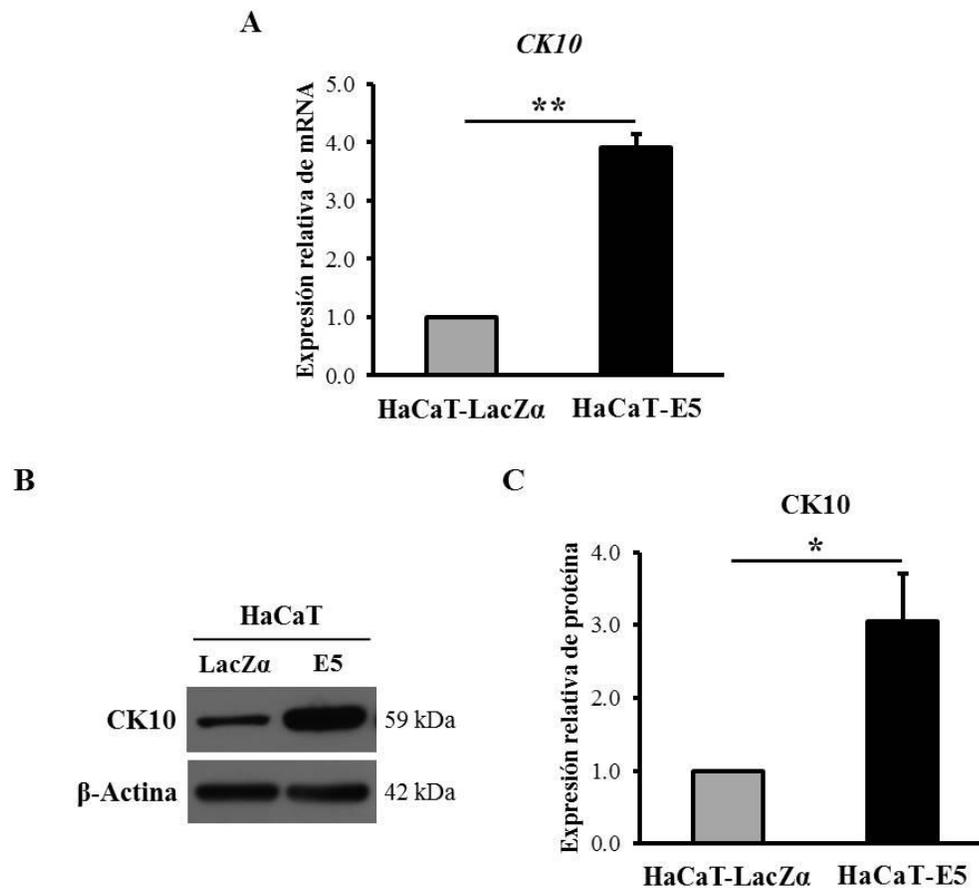


Figura 26. Efecto de E5 de VPH16 sobre la expresión de CK10 en las células HaCaT. A) Los niveles relativos de mRNA de CK10 fueron analizados en las células HaCaT-LacZα y HaCaT-E5 VPH16, por RT-qPCR a los 7 días post-infección. Éstos fueron normalizaron con los niveles de mRNA del gen constitutivo β-Actina. Los datos en la gráfica son

expresados como el promedio  $\pm$  DE de al menos tres ensayos independientes. B y C) Los niveles de proteína de CK10 fueron evaluados mediante SDS-PAGE y Western blot con un anticuerpo específico y fueron normalizados con los niveles de la proteína constitutiva  $\beta$ -Actina. En B) se muestra un Western blot representativo y en C) se presentan los resultados de las densitometrías como el promedio  $\pm$  DE de al menos tres ensayos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## **9.7 Expresión de los factores de troncalidad OCT4, SOX2, NANOG y BMI1 en células HaCaT-E5 VPH16**

Debido a que se encontró que E5 de VPH16 modifica los patrones de expresión de citoqueratinas sugiriendo que promueve la diferenciación temprana de las células HaCaT, se decidió analizar si este proceso inducido por E5 estaba teniendo efectos a nivel de la troncalidad de éstas células, por lo que se determinó la expresión de los marcadores de troncalidad OCT4, SOX2, NANOG y BMI1 en las células HaCaT-E5 VPH16 y HaCaT-LacZ $\alpha$ . Los factores de transcripción OCT4 (*Octamer-binding transcription factor 4*, también conocido como POU5F1, *POU class 5 homeobox 1*), SOX2 (*Sex determining region Y-box 2*) y NANOG (*Homeobox transcription factor NANOG*) son considerados los reguladores principales de la pluripotencia en las células troncales embrionarias, ya que constituyen el núcleo de una red de factores transcripción, modificadores epigenéticos y microRNAs encargada de regular la auto-renovación y la diferenciación de estas células (147-150). Además, la expresión de OCT4, SOX2 y NANOG ha sido identificada en grupos de células troncales con características pluripotentes presentes en diversos tejidos y fluidos humanos adultos (151, 152). Por otro lado, BMI1 forma parte de Polycomb, y es una proteína requerida para el mantenimiento y la auto-renovación de las células troncales de varios tejidos adultos (56-58).

La expresión de *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* y *BMI1* se analizó mediante RT-qPCR en las células HaCaT-E5 VPH16, a 7 días después de la transducción, y en las células HaCaT-LacZ $\alpha$ . Los niveles relativos de mRNA de todos los marcadores de troncalidad se encontraron disminuidos en las células HaCaT que expresaron E5 VPH16 (Fig. 27). La expresión de *OCT4* y *SOX2* disminuyó en un 50% aproximadamente (Fig. 27A y B),

mientras que la disminución en la expresión de NANOG fue más notable (Fig. 27C), siendo de alrededor del 70%, y la expresión de BMI1 únicamente presentó una disminución de un 30% aproximadamente (Fig. 27D).

La disminución en la expresión de los marcadores de troncalidad OCT4, SOX2, NANOG y BMI1 provocada por E5 en las células HaCaT nos sugiere que esta proteína podría estar induciendo la salida de las células troncales hacia un estado de mayor diferenciación.

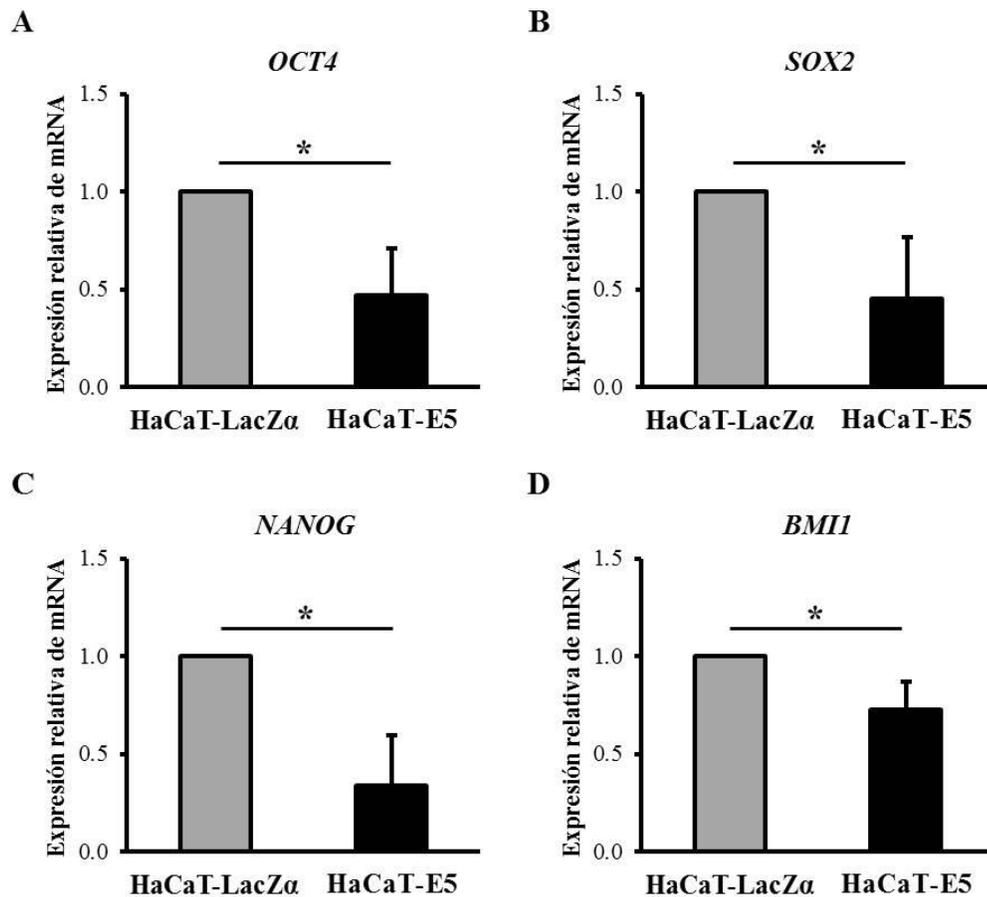


Figura 27. Expresión de OCT4, SOX2, NANOG y BMI1 en células HaCaT que expresan E5 de VPH16. La expresión relativa de A) OCT4, B) SOX2, C) NANOG y D) BMI1 fue analizada en las células HaCaT-LacZα y HaCaT-E5 VPH16 a nivel de mRNA mediante RT-qPCR. Dicha expresión fue normalizada con la expresión del gen constitutivo  $\beta$ -Actina. En las gráficas se muestran los promedios  $\pm$  DE de tres o cuatro ensayos independientes. \* $p < 0.05$ .

## 9.8 Abundancia relativa de las células ALDH<sup>bri</sup> de HaCaT-E5 VPH16

La disminución en la expresión de los marcadores de troncalidad inducida por E5 de VPH16 en las células HaCaT nos llevó a determinar si ésta proteína también afectaba la abundancia relativa de la subpoblación ALDH<sup>bri</sup>. La actividad elevada de la enzima ALDH ha sido utilizada para identificar subpoblaciones de células troncales y progenitoras (ALDH<sup>bri</sup>) de diversos tejidos adultos, de varios tipos de cáncer y de células cultivadas (68, 69).

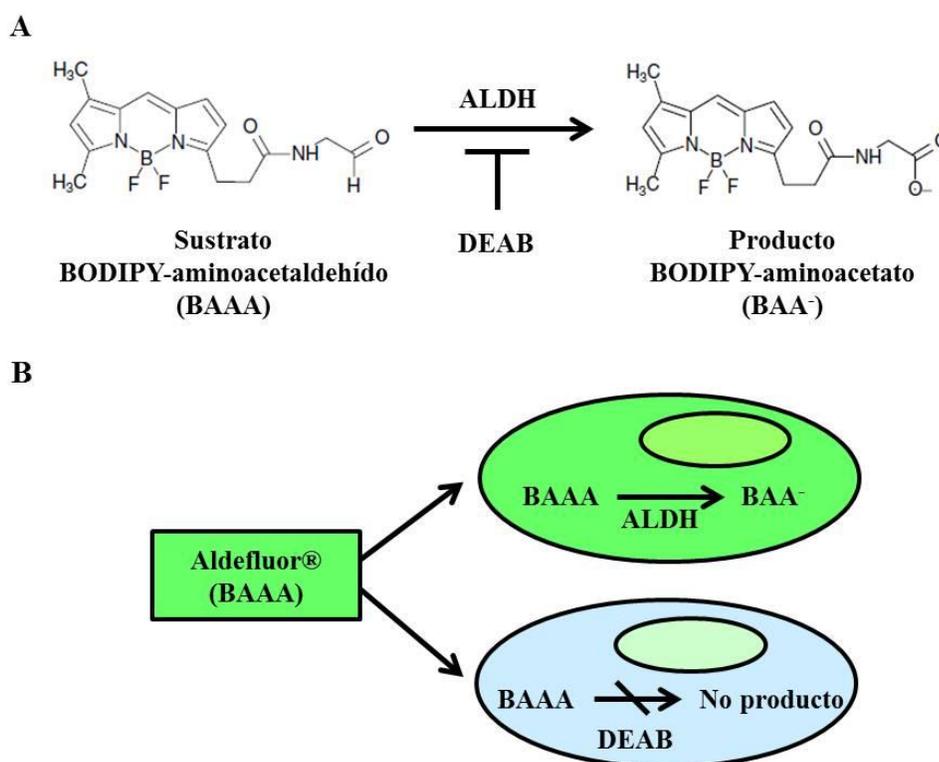
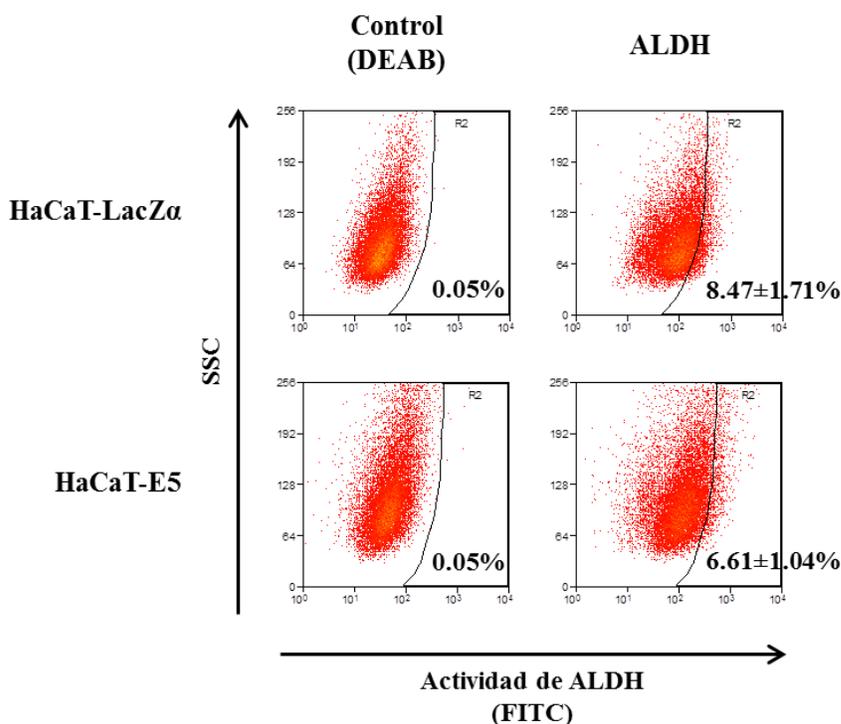


Figura 28. Ensayo de Aldefluor. A) La enzima ALDH oxida el sustrato BODIPY-aminoacetaldehído (BAAA) en BODIPY-aminoacetato (BAA<sup>-</sup>). Ésta reacción es inhibida por el Dietilaminobenzaldehído (DEAB), un inhibidor específico de la ALDH. B) El BAAA ingresa en las células por difusión pasiva y es metabolizado por la ALDH en BAA<sup>-</sup>, el cual es un compuesto fluorescente que se acumula en las células. En cambio en aquellas células incubadas con DEAB no se lleva a cabo la reacción y no se acumula el producto fluorescente en su interior. Adaptada de la hoja técnica de Aldagen para el Aldefluor.

La actividad de la ALDH se analizó en las células HaCaT-E5 VPH16, a los 7 días post-infección, y en las células HaCaT-LacZ $\alpha$  con el estuche comercial ALDEFLUOR, por citometría de flujo. El reactivo del ALDEFLUOR es el BODIPY-aminoacetaldehído (BAAA), este compuesto difunde pasivamente en las células y es oxidado por la ALDH en BODIPY-aminoacetato (BAA<sup>-</sup>), un compuesto fluorescente que se acumula dentro de las células. De tal manera que la cantidad de producto fluorescente acumulado en las células es proporcional a la actividad de la ALDH en éstas. Además, el porcentaje de células ALDH<sup>bri</sup> se establece en cada línea celular tomando como referencia un control negativo de células tratadas con Dietilaminobenzaldehído (DEAB), un inhibidor específico de la actividad de la ALDH (68, 69, 153) (Fig. 28).

En las células HaCaT-E5 VPH16, la abundancia de la subpoblación ALDH<sup>bri</sup> se encontró ligeramente disminuida en comparación con la abundancia de esta subpoblación en las células HaCaT-LacZ $\alpha$  ( $6.61 \pm 1.04\%$  vs  $8.47 \pm 1.71\%$ ), sin embargo esta disminución no fue estadísticamente significativa (Fig. 29). Esta observación indica que el efecto de E5 sobre el marcador ALDH es menos evidente que el observado en el caso de los marcadores OCT4, SOX2, NANOG y BMI1, cuya expresión fue claramente disminuida.

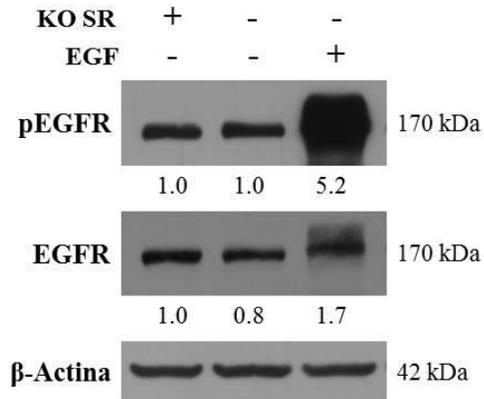


*Figura 29. Abundancia de la subpoblación ALDH<sup>bri</sup> en células HaCaT que expresan E5 de VPH16. La subpoblación celular ALDH<sup>bri</sup> fue determinada con el kit Aldefluor en las células HaCaT-LacZa y HaCaT-E5 VPH16 mediante citometría de flujo. Como control negativo de la actividad enzimática de la ALDH se tuvieron células tratadas con DEAB, un inhibidor de esta enzima. Se presenta un resultado representativo de por lo menos cuatro ensayos independientes y se indica el promedio  $\pm$  DE. SSC, side scatter, complejidad celular.*

## **9.9 Efectos del EGF sobre la expresión de las citoqueratinas 10 y 14 en células HaCaT-E5 VPH16**

Se ha demostrado que la proteína E5 de VPH16 ejerce varias de sus acciones en las células principalmente a través de la activación de la vía del EGFR (79, 85, 93, 96, 97, 99). Además, ésta vía de señalización modula múltiples funciones celulares, entre ellas la diferenciación y la proliferación de queratinocitos (103, 109). Por lo que la proteína E5 de VPH16 podría estar induciendo la diferenciación temprana de los queratinocitos inmortalizados HaCaT, descrita en el presente trabajo, a través de la vía de señalización del EGFR.

Para examinar la participación de la vía del EGFR en la diferenciación de las células HaCaT, las células fueron expuestas a EGF humano recombinante con una concentración de 10 ng/ml. Esta concentración del EGF fue seleccionada porque es la reportada más frecuentemente en la literatura para el tratamiento de las células HaCaT. En primer lugar, se corroboró la funcionalidad del EGF a dicha concentración por medio de su capacidad para activar a su receptor. Los niveles de EGFR fosforilado en la tirosina 1173 (pEGFR), que indica la activación del receptor, y de EGFR total fueron determinados en células HaCaT tratadas con EGF por 15 min en ausencia de KO SR y en células HaCaT no tratadas en presencia o ausencia de KO SR. Como podemos observar en la Fig. 30, la expresión del EGFR fue mayor en las células con EGF en comparación con aquellas células sin tratamiento mantenidas con o sin KO SR (1.7 vs 1 y 1.7 vs 0.8 veces, respectivamente). Así mismo, el EGF provocó un incremento en la fosforilación del EGFR de 5.2 veces con respecto a las otras dos condiciones.



*Figura 30. Activación del EGFR en células HaCaT tratadas con EGF. Los niveles relativos de proteína del EGFR fosforilado (pEGFR) y del EGFR total fueron determinados mediante SDS-PAGE y Western blot en células HaCaT en presencia o ausencia de KO SR, o en células tratadas con EGF a 10 ng/ml durante 15 min en ausencia de KO SR. Los niveles de la proteína constitutiva  $\beta$ -Actina se utilizaron para normalizar la expresión. En la parte inferior se muestran los resultados de la cuantificación.*

Estas observaciones nos aseguran que el EGF humano recombinante empleado fue funcional y capaz de activar al EGFR a la concentración utilizada, por lo que los resultados obtenidos en los ensayos posteriores se deberán a la actividad de este factor de crecimiento. En los ensayos posteriores, el tratamiento con EGF se dio durante 48 h debido a que los procesos analizados dependen de la división celular y las células HaCaT se duplican aproximadamente cada 24 h, por lo que se decidieron evaluar cuando las células hubieron sufrido alrededor de dos divisiones.

Con el objetivo de establecer el efecto del EGF sobre la diferenciación de las células HaCaT inducida por E5 de VPH16, se procedió a analizar la expresión de CK10 y CK14. Las células HaCaT-E5 VPH16 y HaCaT-LacZ $\alpha$  fueron privadas de KO SR durante 24 h para mantener la vía del EGFR en condiciones basales, y enseguida fueron tratadas con EGF a 10 ng/ml en medio libre de KO SR durante 48 h. Como control se tuvieron en paralelo células HaCaT-E5 VPH16 y HaCaT-LacZ $\alpha$  mantenidas en ausencia de KO SR durante 48 h (Privación). Al concluir el tratamiento con EGF las células HaCaT-E5 VPH16 se encontraban en el día 7 de transducción. Posteriormente, los niveles de CK10 y CK14

fueron determinados a nivel de mRNA por RT-qPCR y a nivel de proteína mediante SDS-PAGE y Western blot.

La expresión relativa del mRNA de *CK14* se observó ligeramente incrementada en las células HaCaT-E5 VPH16 y HaCaT-LacZ $\alpha$  tratadas con EGF, en comparación con sus respectivas células control sin tratamiento (Privación) (Fig. 31A). Por otro lado, en las células HaCaT-E5 VPH16 mantenidas en privación de KO SR, la expresión del mRNA de *CK14* se encontró disminuida (alrededor de un 40%) con respecto a la expresión observada en las células HaCaT-LacZ $\alpha$  también en privación.

En cuanto a la expresión relativa de la proteína CK14, en las células HaCaT-E5 VPH16 el EGF indujo un incremento de alrededor de dos veces con respecto a la expresión en las células HaCaT-E5 VPH16 sin estímulo (Privación) (Fig. 31B y C). En cambio, en las células HaCaT-LacZ $\alpha$  expuestas al EGF no se observó una diferencia significativa en comparación con sus respectivas células no tratadas. Al igual que lo observado con el mRNA, la expresión de la proteína CK14 disminuyó en las células HaCaT-E5 VPH16 en privación alrededor de un 50% con respecto a las células HaCaT-LacZ $\alpha$  que se encontraban bajo las mismas condiciones.

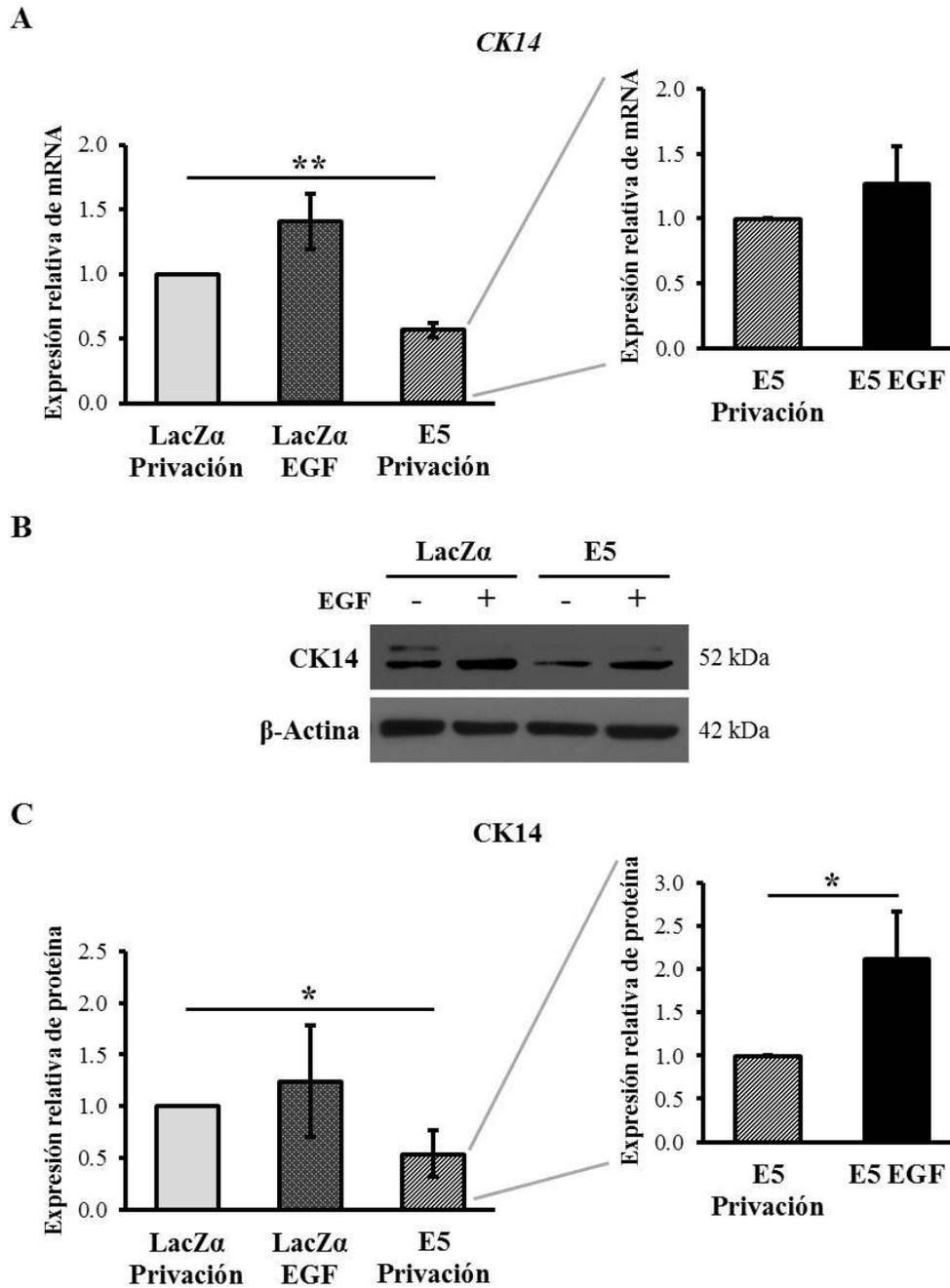


Figura 31. Efecto del EGF sobre la expresión de CK14 en las células HaCaT-E5 VPH16. A) La expresión relativa de mRNA de CK14 se analizó por RT-qPCR en las células HaCaT-LacZα y HaCaT-E5 VPH16 en presencia o ausencia (Privación) de EGF a 10 ng/ml durante 48 h. Esta expresión se normalizó con la expresión del gen constitutivo β-Actina. Los resultados mostrados representan el promedio ± DE de tres ensayos independientes. B y C) La expresión relativa de la proteína CK14 se determinó por SDS-

*PAGE y Western blot en las células HaCaT-LacZ $\alpha$  y HaCaT-E5 VPH16 sin tratamiento (Privación) o con EGF a 10 ng/ml por 48 h. La expresión de la proteína  $\beta$ -Actina fue empleada para normalizar la expresión de CK14. B) Se muestra un Western blot representativo. C) Se presentan los resultados de cuatro ensayos independientes como el promedio  $\pm$  DE. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .*

Respecto a la expresión de *CK10*, los niveles relativos de su mRNA se encontraron ligeramente incrementados en las células HaCaT-E5 VPH16 en presencia del EGF, en comparación con los niveles en las mismas células sin tratamiento (Privación) (Fig. 32A). Mientras que en las células HaCaT-LacZ $\alpha$  tratadas con EGF hubo un incremento notable (de alrededor de dos veces) en los niveles de mRNA de *CK10*, al ser comparadas con sus respectivas células en privación. Además, en las células HaCaT-E5 VPH16 sin tratamiento (Privación) los niveles de mRNA de *CK10* fueron mayores (un 50% aproximadamente) que en las células HaCaT- LacZ $\alpha$  sin tratamiento.

Al analizar la expresión de CK10 a nivel de proteína, en las células HaCaT-E5 VPH16 con EGF se observó únicamente una tendencia al incremento en comparación con las mismas células sin tratamiento (Fig. 32B y C). Mientras que en las células HaCaT-LacZ $\alpha$  el EGF provocó un incremento importante (de casi 4 veces) en la expresión de esta proteína. De igual manera, en las células HaCaT-E5 VPH16 en privación la proteína CK10 tuvo una expresión mayor que en las células HaCaT-LacZ $\alpha$  en privación.

En las células HaCaT-E5 VPH16 privadas de KO SR y sin tratamiento con EGF, la baja expresión de CK14 y el incremento en la expresión de CK10 indicaron que en estas células E5 activó un proceso de diferenciación temprana aún en ausencia del EGF y de otros factores que pudieran estar presentes en el KO SR. El EGF provocó en las células HaCaT que expresaron E5 un incremento en la expresión de CK14, una citoqueratina presente en los queratinocitos no diferenciados, lo que sugiere que este factor de crecimiento estimuló la proliferación de estas células. Por otro lado, el EGF indujo un incremento no significativo en la expresión de CK10 en las células con E5, lo que sugiere que este factor tiene una participación poco importante en la diferenciación temprana activada por E5. En cambio, en las células HaCaT-LacZ $\alpha$  tratadas con EFG, el marcado

incremento en la expresión de CK10 indicó que este factor estimuló la diferenciación temprana de las células HaCaT de manera similar a como lo hizo E5 de VPH16.

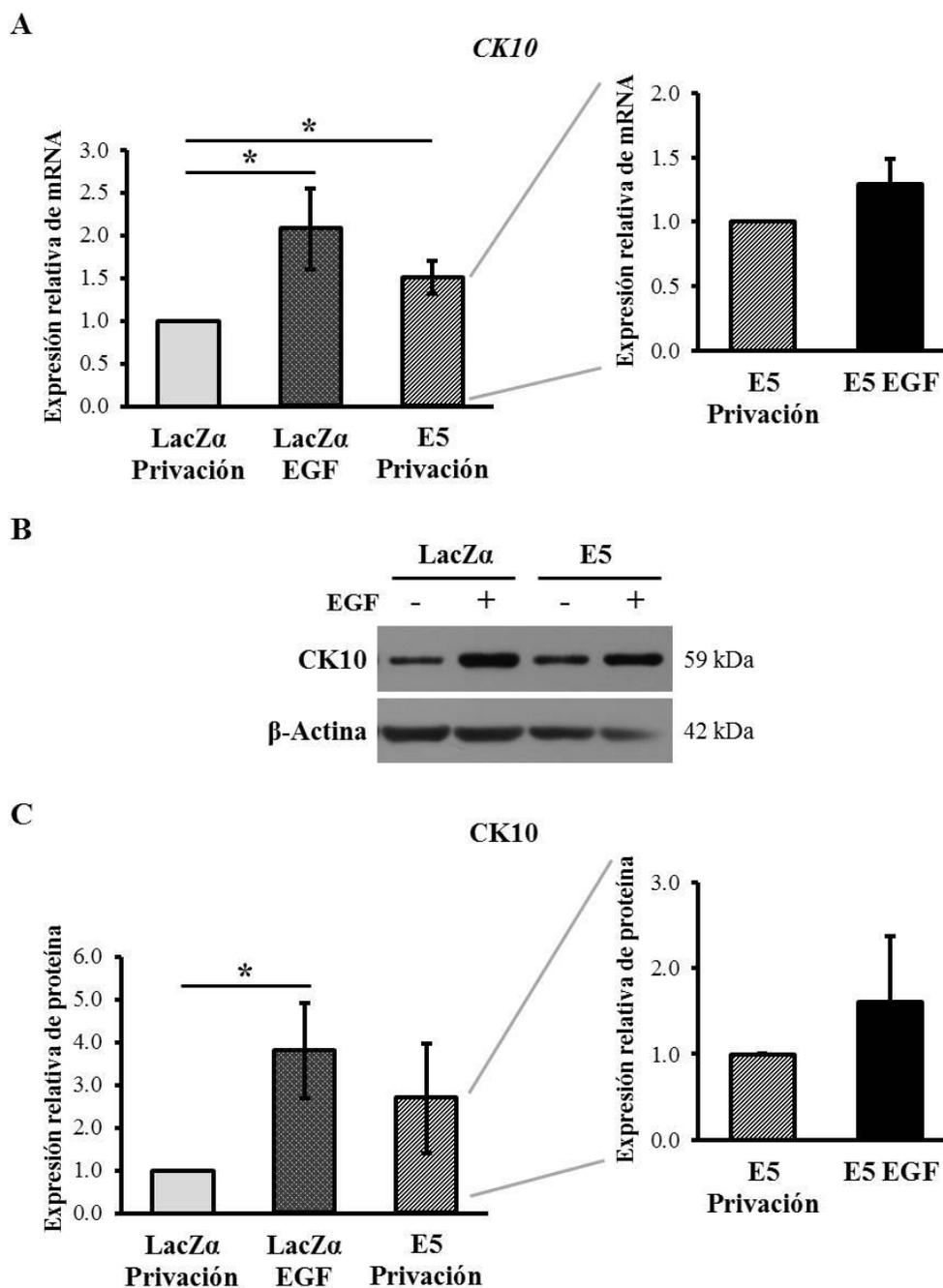


Figura 32. Efecto del EGF sobre la expresión de CK10 en las células HaCaT-E5 VPH16. A) La expresión relativa de CK10 a nivel de mRNA se determinó en células HaCaT-LacZa y HaCaT-E5 VPH16 sin tratamiento (Privación) o con EGF a una concentración de 10

ng/ml por 48 h, mediante RT-qPCR. Los datos obtenidos se normalizaron con la expresión de  $\beta$ -Actina y se presentan como el promedio  $\pm$  DE. B y C) La expresión relativa de la proteína CK10 se evaluó en las células HaCaT-LacZ $\alpha$  y HaCaT-E5 VPH16 con o sin (Privación) EGF a 10 ng/ml durante 48 h, por SDS-PAGE y Western blot. Ésta expresión fue normalizada con la expresión de la proteína constitutiva  $\beta$ -Actina. B) Se muestra el resultado de un ensayo representativo. C) Los resultados de tres ensayos independientes se presentan como el promedio  $\pm$  DE. \* $p < 0.05$ .

## 9.10 Efectos del EGF sobre la expresión de los factores de troncalidad en las células HaCaT-E5 VPH16

Como se observó anteriormente, la proteína E5 de VPH16 provocó la disminución de los marcadores de troncalidad OCT4, SOX2, NANOG y BMI1 en los queratinocitos HaCaT. Ésta acción de E5 podría ser a través de la vía de señalización del EGFR. Para evaluar esta posibilidad las células HaCaT-E5 VPH16 y HaCaT-LacZ $\alpha$  fueron tratadas con EGF humano recombinante a una concentración de 10 ng/ml durante 48 h, como se describió en el apartado anterior. Enseguida, los niveles de expresión de los cuatro marcadores fueron determinados a nivel de mRNA por RT-qPCR.

En las células HaCaT que expresaron E5 de VPH16 el EGF provocó un decremento en la expresión de los cuatro marcadores, *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* y *BMI1* (Fig. 33). Mientras que en las células HaCaT-LacZ $\alpha$  el EGF indujo una disminución en los niveles de *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* (Fig. 33A, B y C), siendo más marcada en el caso de *OCT4* y *NANOG*; pero provocó un incremento en los niveles de *BMI1* (Fig. 33D).

Por otro lado, en las células HaCaT-E5 VPH16 en privación de KO SR se observó una disminución en la expresión de *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* (Fig. A, B y C), con respecto a las células HaCaT-LacZ $\alpha$  que se encontraban en las mismas condiciones. Sin embargo, en el caso de *BMI1* se observó un incremento en su expresión en estas células (Fig. 33D).

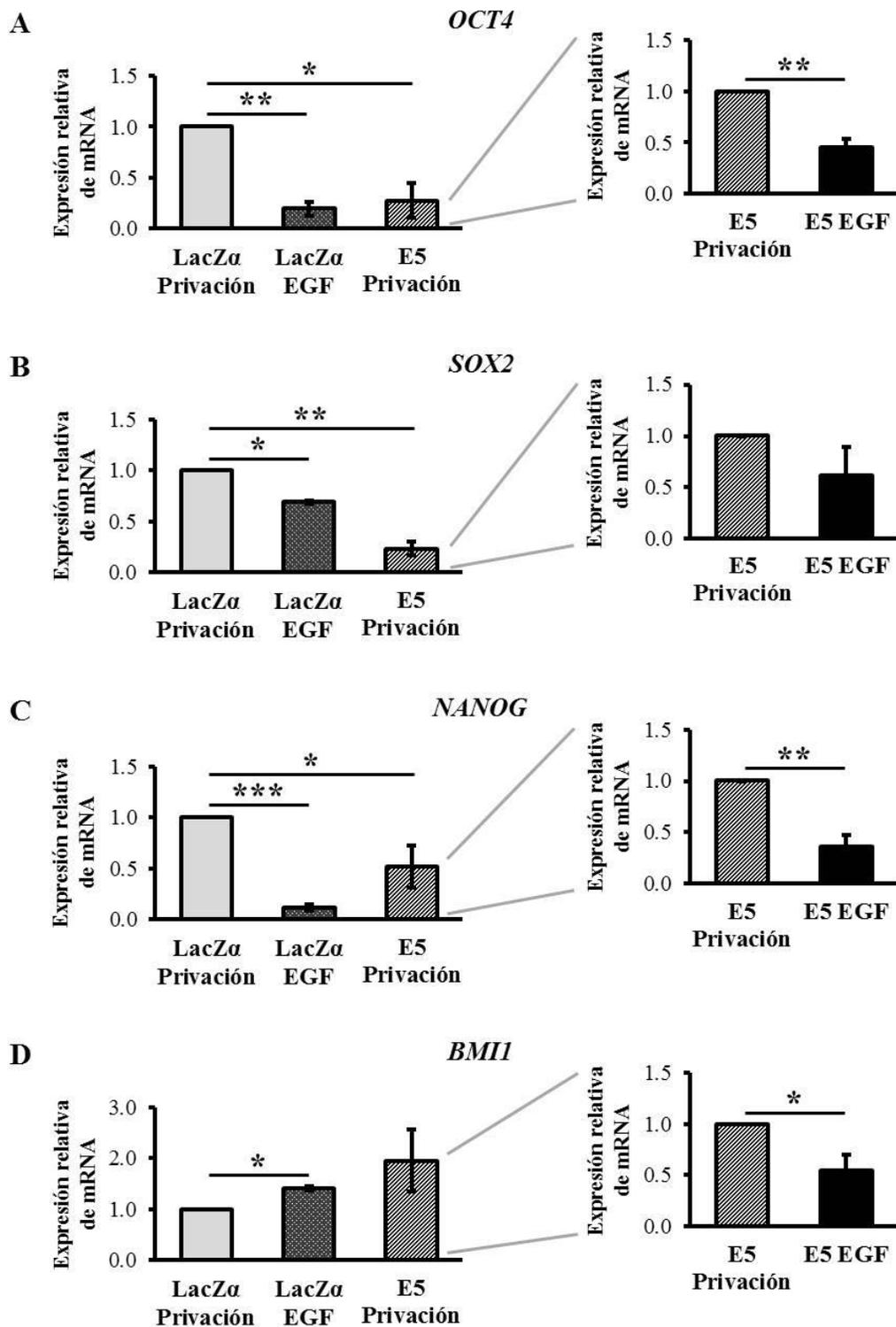


Figura 33. Efectos del EGF sobre la expresión de OCT4, SOX2, NANOG y BMI1 en células HaCaT que expresan E5 de VPH16. Los niveles relativos del mRNA de A) OCT4, B) SOX2, C) NANOG y D) BMI1 fueron determinados en las células HaCaT-LacZa y

*HaCaT-E5 VPH16 sin tratamiento (Privación) o tratadas con EGF a 10 ng/ml durante 48 h. Estos niveles de expresión se normalizaron con los niveles del gen constitutivo  $\beta$ -Actina. Los datos se presentan en las gráficas como el promedio  $\pm$  DE. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .*

La disminución en la expresión de *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* observada en las células HaCaT-E5 VPH16 que fueron mantenidas sin KO SR y sin EGF sugiere que la proteína E5 estimuló en ellas la salida de la troncalidad de manera independiente del EGF y otros factores presentes en el KO SR. Sin embargo, la expresión de *BMI1* se observó incrementada en estas células, quizá porque su expresión podría estar siendo regulada por otros mecanismos o por factores ausentes en el medio. Además, el EGF potenció el efecto de E5 sobre la expresión de los marcadores de troncalidad, ya que en las células HaCaT-E5 VPH16 éste factor de crecimiento acentuó la disminución en la expresión de *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*, e incluso provocó una disminución en los niveles de *BMI1*. También el EGF estimuló en las células HaCaT-LacZ $\alpha$  una disminución en los niveles de *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*, y un incremento en *BMI1*, de manera semejante al efecto observado con E5 de VPH16 sobre las células HaCaT.

## 10 DISCUSIÓN

La infección por VPH es la causa principal y necesaria para el desarrollo del cáncer cérvico-uterino (7), además se encuentra relacionada con el desarrollo de otros tipos de cáncer epitelial (13, 14). El VPH necesita infectar a las células de la capa basal del epitelio escamoso estratificado para llevar a cabo su ciclo replicativo (2). En esta región del epitelio se han identificado tres subpoblaciones celulares: SC, células TA y células ED (33, 35), y se ha sugerido que las células blanco del VPH podrían ser las SC (47-49). La infección de estas células le aseguraría al virus su permanencia en el epitelio (26), ya que son las más propensas a acumular alteraciones genéticas que conlleven al desarrollo tumoral (50, 51). Una de las proteínas virales que se expresa en la capa basal del epitelio (71), y que se ha sugerido participa en las etapas tempranas de la progresión maligna (28, 70), es la proteína E5. Se ha demostrado que esta proteína altera los procesos de proliferación y diferenciación de las células epiteliales (85, 118), por lo que en el presente trabajo quisimos analizar los efectos de E5 de VPH16 sobre la auto-renovación y la diferenciación temprana de la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT, la cual previamente en nuestro grupo se ha demostrado que contiene células con características troncales (123).

Para tener la expresión estable del gen E5 de VPH16 en las células HaCaT, desarrollamos un sistema lentiviral en el cual la expresión del transgén fue regulada por el promotor constitutivo del EF-1 $\alpha$  humano (138), lo que aseguró su expresión aún en las SC (154, 155). La detección de la proteína E5 ha sido muy difícil debido a su elevada hidrofobicidad, su localización en las membranas y sus bajos niveles de expresión. Por estas razones, la expresión de E5 es a menudo inferida de la presencia de su mRNA [25]. Sin embargo, en este trabajo fuimos capaces de demostrar la presencia de E5 de VPH16

tanto a nivel de mRNA como de proteína en las células HaCaT. Además, observamos a la proteína E5 en una localización perinuclear con un patrón similar al encontrado por otros autores (78), por lo que podría estar situada en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, como ha sido reportado previamente (78, 143). No obstante, son necesarios ensayos en los que se incluyan marcadores específicos de éstos organelos celulares para poder aseverar la localización de E5 en ellos.

La expresión de la proteína E5 de VPH16 no fue homogénea en todas las células del cultivo, ya que en algunas se observó una mayor intensidad de fluorescencia. Esto podría ser debido a la integración de diferente número de copias del transgén en el genoma de cada célula particular, o como consecuencia de una variegación (definida como la coexistencia de células que expresan niveles variables del transgén en un tejido), que podría ser ocasionada por regulación inducida por el sitio de integración o por regulación epigenética (156). Adicionalmente, en algunas células se apreciaron regiones puntuales con una intensidad de fluorescencia elevada, lo que sugiere que varias moléculas de la proteína E5 podrían estar interaccionando para formar oligómeros, ya que se ha demostrado que E5 de VPH16 puede auto-asociarse a través de interacciones no covalentes de sus dominios hidrofóbicos o mediante puentes disulfuro, para formar incluso canales hexaméricos (77, 78, 157, 158). Por otro lado, observamos que los niveles de la proteína E5 comenzaron a disminuir a partir de los 15 días post-infección, a pesar de que no se observó un decremento en sus niveles de mRNA y las células mantuvieron resistencia a la puromicina. Esto parece indicar que se está llevando a cabo una regulación negativa específica de E5, a nivel traduccional o post-traduccional. En algunas construcciones bicistrónicas se ha observado que la presencia de un IRES y un cistrón río abajo de éste pueden interferir con la traducción del cistrón que se encuentra río arriba (posición en la que está ubicado el gen E5); sin embargo, los mecanismos por los que esto sucede han sido poco definidos (159, 160). Asimismo, la proteína E5 podría estar siendo degradada a través del sistema ubiquitina-proteosoma, como un mecanismo de defensa de la célula huésped (161).

En este trabajo observamos que E5 de VPH16 es capaz de inducir un proceso de diferenciación temprana en las células HaCaT, ya que esta proteína interfirió con la proliferación celular; incrementó la expresión de CK10, una citoqueratina expresada *de*

*novo* por los queratinocitos comprometidos a diferenciación (33, 35, 45, 67); y en ausencia de KO SR, disminuyó la expresión de CK14, una citoqueratina expresada en las células indiferenciadas de la capa basal epitelial (33, 35). En varios estudios se han reportado efectos diferentes de E5 sobre los marcadores de diferenciación epitelial. En cultivos organotípicos de la línea celular de queratinocitos humanos NIKS que expresaron el genoma completo de VPH16, se observó que la presencia o ausencia del ORF de E5 no provocó cambios en la expresión y localización de CK10 (162). Asimismo, en cultivos en balsa de células HaCaT transfectadas con E5 de VPH16, no se observaron alteraciones en CK1 y CK10 (163). Estas dos citoqueratinas son marcadores de la diferenciación temprana epidermal y generalmente se encuentran asociadas (33). Otro grupo de investigación, también en cultivos organotípicos de células HaCaT que expresaron la proteína E5 de VPH16, encontró una disminución en la expresión de CK1 en parches en las capas superiores; además, en estos parches, observó la expresión de CK14, sugiriendo que algunas células no se habían diferenciado adecuadamente (118). Esto concuerda con lo reportado por Purpura y colaboradores (164) en células HaCaT en monocapa transfectadas transitoriamente con un plásmido de expresión para E5 de VPH16, quienes observaron un decremento en la expresión de CK1 inducido por E5. En la epidermis de ratones transgénicos que expresan E5 de VPH16, se presentó un patrón normal de CK10; mientras que CK14 fue expandida a través de todo el epitelio. Sin embargo, en este caso se observó un incremento en la expresión de filagrina, una proteína expresada en la capa granular del epitelio (85), por lo que E5 podría estar induciendo etapas más avanzadas de la diferenciación epitelial. Recientemente, en cultivos organotípicos de células HaCaT, Bergner y colaboradores (122) observaron que E5, en el contexto del genoma completo de VPH16, no provocó cambios en la expresión de CK1; por el contrario, incrementó la expresión de la proteína involucrina, un marcador de diferenciación sintetizado en la capa espinosa del epitelio (33, 35). Esto apoya la hipótesis de que E5 podría participar en la diferenciación epitelial.

Las discordancias respecto al efecto de E5 de VPH16 sobre la expresión de los marcadores de diferenciación epitelial encontradas en la literatura, así como con nuestros resultados, podrían deberse a diferencias en los modelos de estudio, las condiciones de cultivo de las células, el tiempo transcurrido de expresión de E5, entre otros factores.

Nosotros cultivamos las células HaCaT con el sustituto de suero KnockOut Serum Replacement, a diferencia de la mayoría de los reportes antes citados, en donde utilizaron SFB. El KO SR ha sido empleado en protocolos de diferenciación de células troncales embrionarias y de otros tipos celulares (165-167), pues se ha observado que su presencia en los medios de cultivo incrementa el rendimiento de células diferenciadas. Entonces, en nuestro sistema el KOSR podría estar favoreciendo la inducción de diferenciación temprana por la proteína E5 de VPH16. Por otro lado, E5 podría estar induciendo la diferenciación de las células HaCaT de manera gradual. Nosotros analizamos la expresión de CK10 y CK14 a los 7 días después de la transducción con el Lenti-E5 VPH16, pero quizá su expresión varía con respecto al tiempo que E5 se encuentra presente. Asimismo, podría cambiar la expresión de marcadores de etapas más avanzadas de la diferenciación epitelial, como involucrina, filagrina y loricrina, los cuales no fueron analizados en este estudio.

Nuestros resultados sugieren que el proceso de diferenciación activado por la proteína E5 de VPH16 en las células HaCaT podría estar presentando desde el nivel de las células troncales, pues encontramos una disminución en la expresión de los marcadores de troncalidad OCT4, SOX2, NANOG y BMI1 inducida por E5 en esta línea celular. En nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se reporta el efecto de E5 de VPH16 sobre dichos marcadores de troncalidad. Además, esto coincide con la observación de Bergner y colaboradores (122), quienes detectaron que E5 en conjunto con el genoma completo de VPH16 disminuye la expresión de p63, un factor de transcripción abundante en células epidermales con características troncales (54, 55). Los factores de transcripción OCT4, SOX2 y NANOG han sido identificados en células troncales con características pluripotentes presentes en diversos tejidos y fluidos adultos de humano (151, 152, 168). Asimismo, la expresión de OCT4 y SOX2 se ha observado en células troncales de piel humana (169). Otros trabajos también han reportado la expresión de OCT4, SOX2 y NANOG en la línea celular HaCaT (170, 171), y recientemente en nuestro grupo se demostró su expresión en una subpoblación de células con características troncales (123). El gen *OCT4* presenta tres variantes generadas por *splicing* alternativo. La variante OCT4A (Variante 1, NM\_002701) es la única que participa en la auto-renovación de las células troncales, por esta razón nosotros utilizamos oligonucleótidos específicos para identificar esta variante (172, 173). Por otra parte, BMI1 es integrante del PRC1 de Polycomb y es una

proteína que participa en el mantenimiento, así como en la auto-renovación de las SC de varios tejidos (56-58). Ésta proteína se expresa en células de piel de humano (59, 174); además, su expresión se ha encontrado incrementada en células troncales de queratinocitos humanos (60, 66). Mientras que los reportes sobre la expresión de BMI1 en las células HaCaT han sido contradictorios (174-176), nosotros hemos demostrado su expresión por RT-PCR, Western blot e inmunofluorescencia (datos no mostrados).

Se ha reportado que la subpoblación celular ALDH<sup>bri</sup> se encuentra enriquecida en SC y progenitoras en diversos tejidos y células en cultivo (68, 69). Nosotros no observamos diferencias importantes en la abundancia de esta subpoblación en las células HaCaT que contenían E5 de VPH16. Esto podría indicar que E5 está teniendo efectos únicamente sobre la expresión de los marcadores de troncalidad y no sobre el programa general de las células. Por otro lado, en el caso de las células HaCaT, la actividad elevada de ALDH podría estar identificando una subpoblación diferente de SC, o bien, podría no ser un marcador de SC. Por ejemplo, en queratinocitos de la mucosa oral, la subpoblación ALDH<sup>bri</sup> se encuentra conformada principalmente por células  $\alpha$ 6-integrina<sup>bri</sup>/CD71<sup>dim</sup> (consideradas como SC) y  $\alpha$ 6-integrina<sup>dim</sup> (células ED) en proporciones similares (177); además, en SC limbales y en SC mesenquimales de médula ósea y tejido adiposo ALDH se ha encontrado regulada negativamente (178, 179).

Los efectos de E5 de VPH16 y del EGF observados en este trabajo sobre la expresión de CK10, así como sobre la expresión de los marcadores de troncalidad OCT4, SOX2, NANOG y BMI1, en las células HaCaT privadas de KO SR fueron similares. Además, previamente se ha reportado que el EGF es capaz de inhibir la proliferación de queratinocitos humanos de manera dosis dependiente (180), así como de incrementar notablemente la expresión de CK1 e involucrina en cultivos organotípicos de HaCaT (181), y éste factor de crecimiento es un ligando específico del EGFR (104). Esto sugiere que E5 podría estar actuando a través de la vía del EGFR, ya que esta vía de transducción de señales participa en el proceso de diferenciación de los queratinocitos (109, 182, 183), y como mencionamos anteriormente, E5 de VPH16 ejerce varias de sus acciones mediante su activación (70). El EGFR puede inducir la diferenciación de los queratinocitos por medio de la vía de Raf/MEK/ERK (109), pues se ha encontrado que ésta interviene en las etapas

tempranas de la diferenciación por calcio (184). Además, la vía de Raf/MEK/ERK es capaz de inhibir a la vía de PI3K/AKT para inducir arresto celular (185), y se ha demostrado que PI3K regula negativamente la diferenciación temprana en queratinocitos humanos (186). Aunado a lo anterior, la vía de Raf/MEK/ERK, así como la vía de JNK, otra vía de MAPKs también activada por el EGFR, inducen la expresión y activación del factor de transcripción proteína activadora-1 (AP-1, *Activator protein-1*) (187-189). AP-1 es un conjunto heterogéneo de dímeros de proteínas miembros de las familias Jun, Fos, ATF y Maf (189). En diferentes tipos celulares, se ha observado que c-Jun es un regulador positivo de la proliferación celular, mientras que JunB, y posiblemente JunD, actúan como reguladores negativos del ciclo celular, favoreciendo la diferenciación (189, 190). Aunque, se ha sugerido que en la epidermis humana, todas las subunidades de AP-1 expresadas por los queratinocitos (c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2) se encuentran involucradas en la regulación del programa de diferenciación, más que en el control de la proliferación (190, 191). Por otro lado, JunB ha sido demostrado que regula el número de SC hematopoyéticas. Una expresión incrementada de JunB disminuye la frecuencia de SC hematopoyéticas de largo plazo, mientras que la inactivación de esta proteína expande el número de dichas células y de los progenitores de granulocitos/macrófagos (192). La proteína E5 de VPH16 también potencia la activación de la cascada Raf/MEK/ERK (94, 95) e incrementa la expresión de c-Jun, JunB y c-Fos (81, 95), sugiriendo que E5 podría estar induciendo la diferenciación temprana y la disminución de las SC de los queratinocitos HaCaT por medio de estos mecanismos. Adicionalmente, E5 de VPH16 podría estar ejerciendo sus efectos de manera independiente del EGF, pues como indicamos, los cambios en la expresión de CK10 y los marcadores de troncalidad se presentaron incluso en ausencia del EGF y de cualquier factor presente en el KO SR; asimismo, el EGF parece tener un efecto sinérgico con E5 sobre la expresión de estos genes.

Otro mecanismo por el cual E5 de VPH16 podría estar induciendo el proceso de diferenciación temprana es a través del receptor del factor de crecimiento de queratinocitos (KGFR/FGFR2b). Este receptor induce la expresión de CK1 en células HaCaT de manera dependiente de su ligando y por la vía de PI3K/AKT (193); sin embargo, ha sido reportado que E5 de VPH16 disminuye la expresión del KGFR y la consecuente expresión de CK1 en

éstas células (164). En este caso, a diferencia de nuestro sistema, las células HaCaT expresaron transitoriamente la proteína E5, se tuvo un cultivo heterogéneo de células con y sin E5, y éstas fueron mantenidas en SFB, lo que podría ocasionar efectos diferentes de E5.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, así como lo reportado en la literatura, nos permiten proponer un modelo sobre los efectos de E5 de VPH16 en la diferenciación temprana de los queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT (Fig. 34). La proteína E5 de VPH16 podría inducir la activación del EGFR, y río abajo de éste, a la vía de señalización de Raf/MEK/ERK (95-97). Ésta vía a su vez podría participar en la activación del factor de transcripción AP-1 (187-189), el cual se ha demostrado que se encuentra involucrado en el programa de diferenciación celular de los queratinocitos (190, 191). Por otro lado, E5 también podría promover la activación del KGFR, que a través de la cascada de señalización de PI3K/AKT se ha reportado que induce la diferenciación temprana de los queratinocitos (193). Los efectores de ambas vías de transducción de señales podrían fomentar la salida de las células troncales hacia un estado de mayor diferenciación (células transitoriamente amplificadas), provocando una disminución en su abundancia, e incluso eventualmente su agotamiento. Enseguida, en las células transitoriamente amplificadas también se podría estar disparando la transición hacia células diferenciadas tempranas, incrementando la abundancia de éstas últimas.

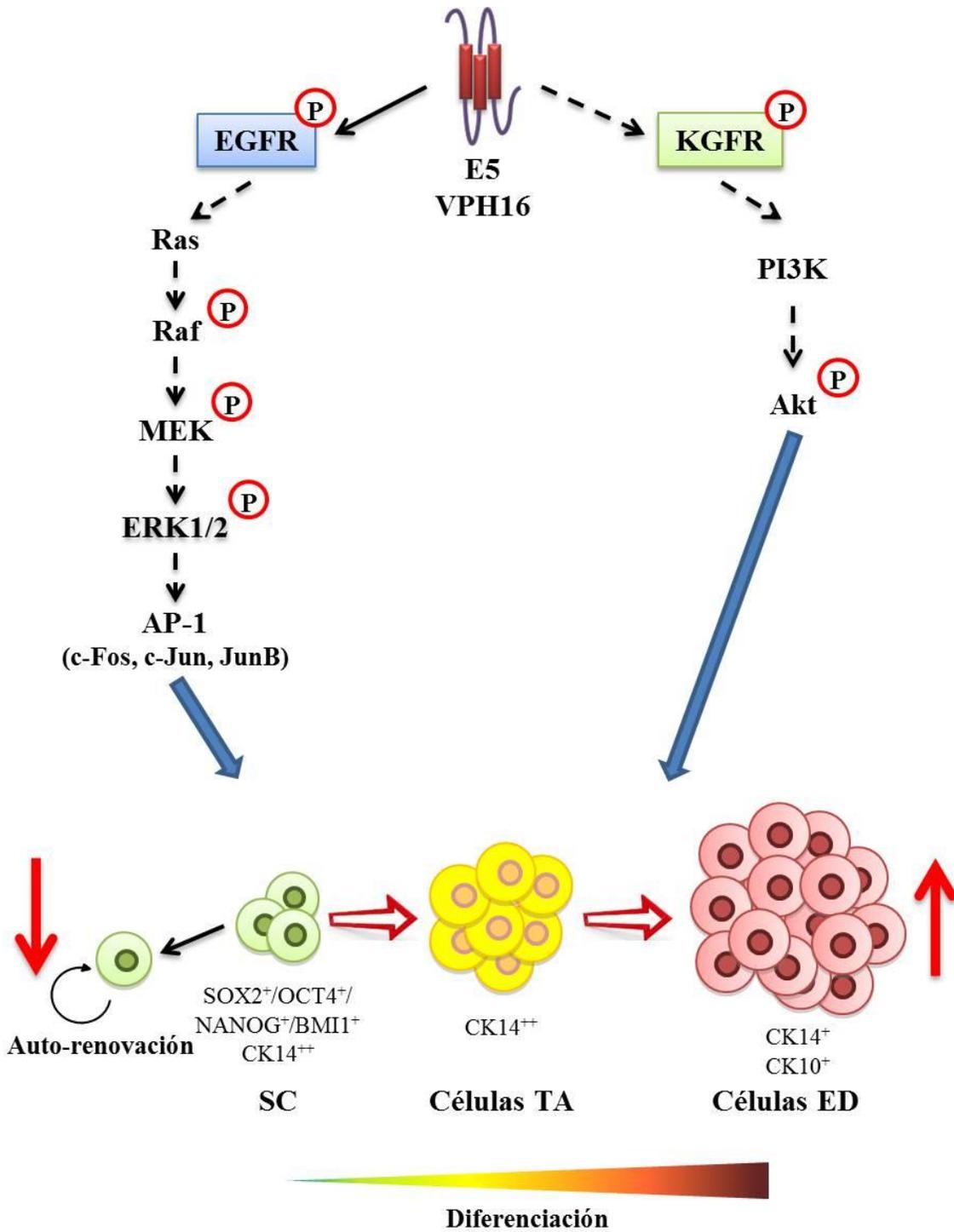


Figura 34. Mecanismos posibles por los cuales la proteína E5 de VPH16 podría inducir la diferenciación temprana de los queratinocitos humanos immortalizados HaCaT. P, fosforilación.

## 11 CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se logró tener un sistema que permitiera la expresión por tiempos prolongados (pero no estable) del gen E5 de VPH16 en la línea celular HaCaT, y se corroboró la expresión de este gen tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína.

La presencia de la proteína E5 en las células HaCaT provocó una disminución en su proliferación y un incremento en la expresión del marcador de diferenciación temprana CK10, lo que sugiere que ésta proteína viral induce un proceso de diferenciación temprana en los queratinocitos humanos.

E5 de VPH16 indujo la disminución de OCT4, SOX2 y NANOG, factores de transcripción encargados de regular la auto-renovación y la diferenciación de las SC (147-150), así como de BMI1, una proteína requerida para el mantenimiento y la auto-renovación de las SC (56-59); lo que indica que E5 podría estar induciendo la salida de las células con características troncales hacia un estado de mayor diferenciación.

Por otro lado, E5 de VPH16 únicamente indujo una ligera disminución en la abundancia de la subpoblación celular ALDH<sup>brn</sup>, la cual se encuentra enriquecida en SC y progenitoras en diversos tipos celulares; esto podría sugerir que E5 tiene efectos únicamente sobre los marcadores de troncalidad, pero no sobre el programa general de las células, o bien, que la actividad elevada de ALDH no permite identificar una subpoblación de SC en el caso de las células HaCaT.

Aún en ausencia de KO SR, E5 ocasionó un decremento en la expresión de CK14 y un incremento en la expresión de CK10, así como la disminución de OCT4, SOX2 y

NANOG, lo que demuestra que E5 de VPH16 puede inducir un proceso de diferenciación temprana independiente de los factores presentes en el KO SR.

El EGF presentó un efecto sinérgico con E5 de VH16 sobre la disminución de la expresión de los marcadores de troncalidad OCT4, SOX2 y NANOG, e incluso provocó la disminución de BMI1. Mientras que el efecto de este factor sobre el incremento de CK10 inducido por E5 no fue significativo.

En células HaCaT control (HaCaT-LacZ $\alpha$ ), el EGF estimuló un incremento en la expresión de CK10 y una disminución en los niveles de OCT4, SOX2 y NANOG, de manera similar a lo observado con la proteína E5. Esto sugiere que E5 puede inducir la diferenciación temprana a través de la activación de la vía del EGFR incluso de manera independiente del EGF.

## 12 PERSPECTIVAS

Como perspectivas del presente trabajo se sugieren las siguientes:

Corroborar si E5 de VPH16 induce la diferenciación temprana de las células HaCaT a través de la activación de la vía del EGFR de manera independiente del EGF, mediante el uso de fármacos inhibidores de esta vía, como lo es el AG1478.

Analizar la activación de la vía de Raf/MEK/ERK por E5 de VPH16 y determinar su participación en la diferenciación temprana en las células HaCaT.

Establecer los efectos de E5 sobre las etapas de diferenciación más avanzadas, a través del análisis de la expresión de marcadores como involucrina, que se encuentra en la capa espinosa del epitelio, así como loricrina y filagrina, que son localizadas en la capa granular.

Evaluar la expresión de CK10, de otros marcadores de diferenciación y de los marcadores de troncalidad SOX2, OCT4, NANOG y BMI1 a tiempos diferentes de la transducción de las células HaCaT con el Lenti-E5 VPH16.

Analizar la participación de otras vías de señalización en los efectos inducidos por E5 de VPH16 en las células HaCaT, como la vía del KGFR/FGFR2b.

Determinar el o los factores presentes en el KO SR que pudieran estar involucrados en la diferenciación temprana inducida por E5 de VPH16.

## 13 BIBLIOGRAFÍA

1. Burns A, Eckert LON, Hariri S, Jacob M. Control integral del cáncer cervicouterino: guía de prácticas esenciales. 2a ed. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud.; 2016. x, 420 p.
2. Blaustein A, Kurman RJ. Blaustein's pathology of the female genital tract. 6th ed. New York, NY: Springer; 2011. xv, 1246 p.
3. GLOBOCAN. Estimated crude rate of incident cases and deaths, females, worldwide (top 10 cancer sites) in 2012 International Agency for Research on Cancer. World Health Organization.; 2012 [2016 Nov 16]; Available from: <http://gco.iarc.fr/today/home>.
4. Shah SS, Senapati S, Klacsmann F, Miller DL, Johnson JJ, Chang HC, et al. Current Technologies and Recent Developments for Screening of HPV-Associated Cervical and Oropharyngeal Cancers. *Cancers*. 2016;8(9). Epub 2016/09/13.
5. SSA. Distribución de casos nuevos de enfermedad por grupos de edad. SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2015; 2015 [2016 Dec 16]; Available from: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/20150/morbilidad/nacional/distribucion\\_casos\\_nuevos\\_enfermedad\\_grupo\\_edad.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/20150/morbilidad/nacional/distribucion_casos_nuevos_enfermedad_grupo_edad.pdf).
6. SSA. El cáncer de cuello uterino #MásCercaDeLoQueParece. 2016 [2016 Dec 16]; Available from: <https://www.gob.mx/salud/articulos/semana-de-sensibilizacion-en-cancer-de-cuello-uterino-2016-con-el-lema-el-cancer-de-cuello-uterino-mascercadeloqueparece?idiom=es>.

7. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-9. Epub 1999/08/19.
8. Silva J, Cerqueira F, Medeiros R. Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;289(4):715-23. Epub 2013/12/19.
9. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 3:S3/1-10. Epub 2006/09/05.
10. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 1:S1-15. Epub 2006/01/13.
11. de Freitas AC, Gurgel AP, Chagas BS, Coimbra EC, do Amaral CM. Susceptibility to cervical cancer: an overview. *Gynecol Oncol.* 2012;126(2):304-11. Epub 2012/04/10.
12. Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol.* 2007;107(2 Suppl 1):S2-5. Epub 2007/11/22.
13. Wakeham K, Kavanagh K. The burden of HPV-associated anogenital cancers. *Current oncology reports.* 2014;16(9):402. Epub 2014/08/15.
14. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.* 2009;384(2):260-5. Epub 2009/01/13.
15. van Regenmortel MH, Fauquet C, Bishop D, Carstens E, Estes M, Lemon S, et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: Academic Press; 2000.
16. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17-27. Epub 2004/06/09.
17. Van Doorslaer K, Tan Q, Xirasagar S, Bandaru S, Gopalan V, Mohamoud Y, et al. The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D571-8. Epub 2012/10/25.
18. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology.* 2013;445(1-2):2-10. Epub 2013/05/21.
19. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010;401(1):70-9. Epub 2010/03/09.

20. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 5:F55-70. Epub 2012/12/05.
21. Lacey CJ, Lowndes CM, Shah KV. Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/35-41. Epub 2006/09/05.
22. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 10:K1-16. Epub 2008/10/14.
23. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology*. 2015;25 Suppl 1:2-23. Epub 2015/03/11.
24. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. 2006;11:2286-302. Epub 2006/05/25.
25. Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS*. 2010;118(6-7):422-49. Epub 2010/06/18.
26. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*. 2015;7(7):3863-90. Epub 2015/07/21.
27. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(8):550-60. Epub 2010/07/02.
28. Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer*. 2011;10(1):140. Epub 2011/11/15.
29. DiMaio D, Petti LM. The E5 proteins. *Virology*. 2013;445(1-2):99-114. Epub 2013/06/05.
30. Nguyen HP, Ramirez-Fort MK, Rady PL. The biology of human papillomaviruses. *Current problems in dermatology*. 2014;45:19-32. Epub 2014/03/20.
31. Mighty KK, Laimins LA. The role of human papillomaviruses in oncogenesis. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer*. 2014;193:135-48. Epub 2013/09/07.

32. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(1):11-22. Epub 2006/12/23.
33. Pasquariello N, Oddi S, Malaponti M, Maccarrone M. Regulation of gene transcription and keratinocyte differentiation by anandamide. *Vitam Horm*. 2009;81:441-67. Epub 2009/08/04.
34. Tortora GJ, Derrickson B. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 11a ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2006. xxi, 1154 p.
35. Fuchs E. *Epithelial Skin Biology: Three Decades of Developmental Biology, a Hundred Questions Answered and a Thousand New Ones to Address*. Current topics in developmental biology. 2016;116:357-74. Epub 2016/03/13.
36. Cardoso-Jaime VMJ. 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. México D. F.: CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL; 2015.
37. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(3):207-17. Epub 2009/02/12.
38. Potten CS. The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell and tissue kinetics*. 1974;7(1):77-88. Epub 1974/01/01.
39. Potten CS, Booth C. Keratinocyte stem cells: a commentary. *J Invest Dermatol*. 2002;119(4):888-99. Epub 2002/10/31.
40. Kaur P. Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential. *J Invest Dermatol*. 2006;126(7):1450-8. Epub 2006/03/18.
41. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11. Epub 2001/11/02.
42. McCulloch EA, Till JE. Perspectives on the properties of stem cells. *Nat Med*. 2005;11(10):1026-8. Epub 2005/10/08.
43. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006;441(7097):1068-74. Epub 2006/07/01.
44. Rangel-Huerta E, Maldonado E. Transit-Amplifying Cells in the Fast Lane from Stem Cells towards Differentiation. *Stem cells international*. 2017;2017:7602951. Epub 2017/08/25.

45. Kaur P, Li A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J Invest Dermatol.* 2000;114(3):413-20. Epub 2000/02/26.
46. Kaur P, Li A, Redvers R, Bertoncello I. Keratinocyte stem cell assays: an evolving science. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2004;9(3):238-47. Epub 2004/09/17.
47. Egawa K. Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology.* 2003;207(3):251-4. Epub 2003/10/23.
48. Martens JE, Arends J, Van der Linden PJ, De Boer BA, Helmerhorst TJ. Cytokeratin 17 and p63 are markers of the HPV target cell, the cervical stem cell. *Anticancer Res.* 2004;24(2B):771-5. Epub 2004/05/27.
49. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(26):10516-21. Epub 2012/06/13.
50. Alison MR, Murphy G, Leedham S. Stem cells and cancer: a deadly mix. *Cell Tissue Res.* 2008;331(1):109-24. Epub 2007/10/17.
51. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:675-99. Epub 2007/07/25.
52. Tani H, Morris RJ, Kaur P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(20):10960-5. Epub 2000/09/27.
53. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(8):2302-6. Epub 1987/04/01.
54. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(6):3156-61. Epub 2001/03/15.
55. Senoo M, Pinto F, Crum CP, McKeon F. p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell.* 2007;129(3):523-36. Epub 2007/05/08.
56. Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest.* 2004;113(2):175-9. Epub 2004/01/15.
57. Siddique HR, Saleem M. Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: preclinical and clinical evidences. *Stem Cells.* 2012;30(3):372-8. Epub 2012/01/19.

58. Lin X, Ojo D, Wei F, Wong N, Gu Y, Tang D. A Novel Aspect of Tumorigenesis-BMI1 Functions in Regulating DNA Damage Response. *Biomolecules*. 2015;5(4):3396-415. Epub 2015/12/04.
59. Reinisch CM, Uthman A, Erovic BM, Pammer J. Expression of BMI-1 in normal skin and inflammatory and neoplastic skin lesions. *Journal of cutaneous pathology*. 2007;34(2):174-80. Epub 2007/01/25.
60. Szabo AZ, Fong S, Yue L, Zhang K, Strachan LR, Scalapino K, et al. The CD44+ ALDH+ population of human keratinocytes is enriched for epidermal stem cells with long-term repopulating ability. *Stem Cells*. 2013;31(4):786-99. Epub 2013/01/22.
61. Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*. 1993;73(4):713-24. Epub 1993/05/21.
62. Jones PH, Harper S, Watt FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell*. 1995;80(1):83-93. Epub 1995/01/13.
63. Wan H, Yuan M, Simpson C, Allen K, Gavins FN, Ikram MS, et al. Stem/progenitor cell-like properties of desmoglein 3dim cells in primary and immortalized keratinocyte lines. *Stem Cells*. 2007;25(5):1286-97. Epub 2007/01/27.
64. Wan H, Stone MG, Simpson C, Reynolds LE, Marshall JF, Hart IR, et al. Desmosomal proteins, including desmoglein 3, serve as novel negative markers for epidermal stem cell-containing population of keratinocytes. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 20):4239-48. Epub 2003/09/04.
65. Webb A, Li A, Kaur P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation*. 2004;72(8):387-95. Epub 2004/12/21.
66. Schluter H, Paquet-Fifield S, Gangatirkar P, Li J, Kaur P. Functional characterization of quiescent keratinocyte stem cells and their progeny reveals a hierarchical organization in human skin epidermis. *Stem Cells*. 2011;29(8):1256-68. Epub 2011/06/16.
67. Li A, Simmons PJ, Kaur P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(7):3902-7. Epub 1998/05/09.

68. Balber AE. Concise review: aldehyde dehydrogenase bright stem and progenitor cell populations from normal tissues: characteristics, activities, and emerging uses in regenerative medicine. *Stem Cells*. 2011;29(4):570-5. Epub 2011/02/11.
69. Ma I, Allan AL. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev*. 2011;7(2):292-306. Epub 2010/11/26.
70. Kim MK, Kim HS, Kim SH, Oh JM, Han JY, Lim JM, et al. Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(12):1930-5. Epub 2010/07/21.
71. Chang JL, Tsao YP, Liu DW, Huang SJ, Lee WH, Chen SL. The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. *J Biomed Sci*. 2001;8(2):206-13. Epub 2001/04/05.
72. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(2):362-72. Epub 2004/06/10.
73. Bubb V, McCance DJ, Schlegel R. DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation of its encoded protein. *Virology*. 1988;163(1):243-6. Epub 1988/03/01.
74. Nath R, Mant CA, Kell B, Cason J, Bible JM. Analyses of variant human papillomavirus type-16 E5 proteins for their ability to induce mitogenesis of murine fibroblasts. *Cancer Cell Int*. 2006;6:19. Epub 2006/08/11.
75. Ullman CG, Haris PI, Kell B, Cason J, Jewers RJ, Best JM, et al. Hypothetical structure of the membrane-associated E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *Biochem Soc Trans*. 1994;22(4):439S. Epub 1994/11/01.
76. Lewis C, Baro MF, Marques M, Gruner M, Alonso A, Bravo IG. The first hydrophobic region of the HPV16 E5 protein determines protein cellular location and facilitates anchorage-independent growth. *Virol J*. 2008;5:30. Epub 2008/02/28.
77. 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. *J Virol*. 2012;86(9):5341-51. Epub 2012/02/24.
78. Disbrow GL, Sunitha I, Baker CC, Hanover J, Schlegel R. Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression. *Virology*. 2003;311(1):105-14. Epub 2003/07/02.

79. 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. Epub 1993/08/01.
80. Leptak C, Ramon y Cajal S, Kulke R, Horwitz BH, Riese DJ, 2nd, Dotto GP, et al. Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *J Virol.* 1991;65(12):7078-83. Epub 1991/12/01.
81. Chen SL, Huang CH, Tsai TC, Lu KY, Tsao YP. The regulation mechanism of c-jun and junB by human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *Arch Virol.* 1996;141(5):791-800. Epub 1996/01/01.
82. Stoppler MC, Straight SW, Tsao G, Schlegel R, McCance DJ. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology.* 1996;223(1):251-4. Epub 1996/09/01.
83. Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM, Storey A, Banks L. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology.* 1994;203(1):73-80. Epub 1994/08/15.
84. Valle GF, Banks L. The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *J Gen Virol.* 1995;76 ( Pt 5):1239-45. Epub 1995/05/01.
85. Genter Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, Lee D, Threadgill DW, Lambert PF. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Res.* 2005;65(15):6534-42. Epub 2005/08/03.
86. Maufort JP, Williams SM, Pitot HC, Lambert PF. Human papillomavirus 16 E5 oncogene contributes to two stages of skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 2007;67(13):6106-12. Epub 2007/07/10.
87. Maufort JP, Shai A, Pitot HC, Lambert PF. A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res.* 2010;70(7):2924-31. Epub 2010/03/25.

88. Campo MS, Graham SV, Cortese MS, Ashrafi GH, Araibi EH, Dornan ES, et al. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology*. 2010;407(1):137-42. Epub 2010/09/04.
89. Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer*. 2006;119(9):2105-12. Epub 2006/07/11.
90. Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer*. 2005;113(2):276-83. Epub 2004/09/24.
91. Zhang B, Li P, Wang E, Brahmi Z, Dunn KW, Blum JS, et al. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology*. 2003;310(1):100-8. Epub 2003/06/06.
92. 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;241(1):76-83. Epub 1998/06/20.
93. Pim D, Collins M, Banks L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene*. 1992;7(1):27-32. Epub 1992/01/01.
94. Crusius K, Rodriguez I, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. *Virus Genes*. 2000;20(1):65-9. Epub 2000/04/15.
95. Crusius K, Auvinen E, Alonso A. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene*. 1997;15(12):1437-44. Epub 1997/10/23.
96. Zhang B, Spandau DF, Roman A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *J Virol*. 2002;76(1):220-31. Epub 2001/12/12.
97. Kim SH, Juhn YS, Kang S, Park SW, Sung MW, Bang YJ, et al. Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor

through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ ERK1,2 and PI3K/Akt. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(7-8):930-8. Epub 2006/04/06.

98. Tsao YP, Li LY, Tsai TC, Chen SL. Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21(Waf1/Sdi1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. *J Virol.* 1996;70(11):7535-9. Epub 1996/11/01.

99. Pedroza-Saavedra A, Lam EW, Esquivel-Guadarrama F, Gutierrez-Xicotencatl L. The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-receptor signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27(Kip1). *Virology.* 2010;400(1):44-52. Epub 2010/02/11.

100. Venuti A, Salani D, Poggiali F, Manni V, Bagnato A. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 enhances endothelin-1-induced keratinocyte growth. *Virology.* 1998;248(1):1-5. Epub 1998/08/15.

101. Bogdan S, Klambt C. Epidermal growth factor receptor signaling. *Curr Biol.* 2001;11(8):R292-5. Epub 2001/05/23.

102. Linggi B, Carpenter G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol.* 2006;16(12):649-56. Epub 2006/11/07.

103. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res.* 2006;12(18):5268-72. Epub 2006/09/27.

104. Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(10):1566-84. Epub 2008/02/09.

105. Reiter J, Maihle NJ. Characterization and expression of novel 60-kDa and 110-kDa EGFR isoforms in human placenta. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;995:39-47. Epub 2003/06/20.

106. Sorkin A, Helin K, Waters CM, Carpenter G, Beguinot L. Multiple autophosphorylation sites of the epidermal growth factor receptor are essential for receptor kinase activity and internalization. Contrasting significance of tyrosine 992 in the native and truncated receptors. *J Biol Chem.* 1992;267(12):8672-8. Epub 1992/04/25.

107. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer.* 2001;37 Suppl 4:S3-8. Epub 2001/10/13.

108. Sweeney C, Carraway KL, 3rd. Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. *Oncogene*. 2000;19(49):5568-73. Epub 2000/12/15.
109. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58(3):903-13. Epub 2004/02/18.
110. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, et al. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*. 1992;70(3):431-42. Epub 1992/08/07.
111. Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1161-76. Epub 2007/02/20.
112. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002;296(5573):1655-7. Epub 2002/06/01.
113. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*. 2004;30(2):193-204. Epub 2004/03/17.
114. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261-74. Epub 2007/07/03.
115. Hemmings BA, Restuccia DF. The PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7(4). Epub 2015/04/04.
116. Tomas A, Futter CE, Eden ER. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol*. 2014;24(1):26-34. Epub 2013/12/04.
117. Ceresa BP. Spatial regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis. *International journal of molecular sciences*. 2012;14(1):72-87. Epub 2013/01/25.
118. Barbaresi S, Cortese MS, Quinn J, Ashrafi GH, Graham SV, Campo MS. Effects of human papillomavirus type 16 E5 deletion mutants on epithelial morphology: functional characterization of each transmembrane domain. *J Gen Virol*. 2010;91(Pt 2):521-30. Epub 2009/10/09.
119. Truong AB, Kretz M, Ridky TW, Kimmel R, Khavari PA. p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. *Genes Dev*. 2006;20(22):3185-97. Epub 2006/11/23.

120. Truong AB, Khavari PA. Control of keratinocyte proliferation and differentiation by p63. *Cell Cycle*. 2007;6(3):295-9. Epub 2007/02/01.
121. Greco D, Kivi N, Qian K, Leivonen SK, Auvinen P, Auvinen E. Human Papillomavirus 16 E5 Modulates the Expression of Host MicroRNAs. *PLoS One*. 2011;6(7):e21646. Epub 2011/07/13.
122. Bergner S, Halec G, Schmitt M, Aubin F, Alonso A, Auvinen E. Individual and Complementary Effects of Human Papillomavirus Oncogenes on Epithelial Cell Proliferation and Differentiation. *Cells Tissues Organs*. 2016;201(2):97-108. Epub 2015/12/05.
123. Dominguez-Catzin V, Reveles-Espinoza AM, Sanchez-Ramos J, Cruz-Cadena R, Lemus-Hernandez D, Garrido E. HPV16-E2 protein modifies self-renewal and differentiation rate in progenitor cells of human immortalized keratinocytes. *Viol J*. 2017;14(1):65. Epub 2017/04/05.
124. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*. 1988;106(3):761-71. Epub 1988/03/01.
125. Borchers AH, Steinbauer H, Schafer BS, Kramer M, Bowden GT, Fusenig NE. Fibroblast-directed expression and localization of 92-kDa type IV collagenase along the tumor-stroma interface in an in vitro three-dimensional model of human squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog*. 1997;19(4):258-66. Epub 1997/08/01.
126. Marques MM, Martinez N, Rodriguez-Garcia I, Alonso A. EGFR family-mediated signal transduction in the human keratinocyte cell line HaCaT. *Exp Cell Res*. 1999;252(2):432-8. Epub 1999/10/21.
127. Flug F, Copp RP, Casanova J, Horowitz ZD, Janocko L, Plotnick M, et al. cis-acting elements of the rat growth hormone gene which mediate basal and regulated expression by thyroid hormone. *J Biol Chem*. 1987;262(13):6373-82. Epub 1987/05/05.
128. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20. Epub 2007/11/22.
129. Yu H, Kwon YJ. Preparation and quantification of pseudotyped retroviral vector. *Methods Mol Biol*. 2008;433:1-16. Epub 2008/08/06.

130. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45. Epub 2001/05/09.
131. Helmig S, Hadzaad B, Dohrel J, Schneider J. Relative quantification of Cytochrome P450 1B1 gene expression in peripheral leukocytes using lightcycler. *Cancer genomics & proteomics.* 2009;6(1):13-7. Epub 2009/05/20.
132. Markaki AE. alamarBlue® Assay for Assessment of Cell Proliferation using the FLUOstar OPTIMA. 2009 2016 Feb 16. Available from: <https://bmglabtech.us/app/uploads/alamarblue-assay-for-assessment-of-cell-proliferation-using-the-fluostar-optima-bmg-labtech.pdf>.
133. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5. Epub 1970/08/15.
134. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4. Epub 1979/09/01.
135. Xiong AS, Yao QH, Peng RH, Duan H, Li X, Fan HQ, et al. PCR-based accurate synthesis of long DNA sequences. *Nat Protoc.* 2006;1(2):791-7. Epub 2007/04/05.
136. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(20):8125-48. Epub 1987/10/26.
137. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(22):10881-90. Epub 1988/11/25.
138. Kim DW, Uetsuki T, Kaziro Y, Yamaguchi N, Sugano S. Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene.* 1990;91(2):217-23. Epub 1990/07/16.
139. Moosmann P, Rusconi S. Alpha complementation of LacZ in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(6):1171-2. Epub 1996/03/15.
140. Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis.* 2010;58(2):107-19. Epub 2010/02/10.
141. Federico M. From lentiviruses to lentivirus vectors. *Methods Mol Biol.* 2003;229:3-15. Epub 2003/06/26.

142. InvivoGen. Lentiviral production. [2012 Jan 29]; Available from: [http://www.invivogen.com/images/Lentiviral\\_production.jpg](http://www.invivogen.com/images/Lentiviral_production.jpg).
143. Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol*. 1993;67(10):6170-8. Epub 1993/10/01.
144. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*. 2012;12(9):12347-60. Epub 2012/11/01.
145. Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 2011;54:10-4. Epub 2011/01/01.
146. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD)2004.
147. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005;122(6):947-56. Epub 2005/09/13.
148. Chambers I, Tomlinson SR. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development*. 2009;136(14):2311-22. Epub 2009/06/23.
149. Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, Shaffer SM, Persson JL, Gudas LJ, et al. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem cells and development*. 2009;18(7):1093-108. Epub 2009/06/02.
150. Heng JC, Orlov YL, Ng HH. Transcription factors for the modulation of pluripotency and reprogramming. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2010;75:237-44. Epub 2010/11/05.
151. Kim Y, Jeong J, Kang H, Lim J, Heo J, Ratajczak J, et al. The molecular nature of very small embryonic-like stem cells in adult tissues. *International journal of stem cells*. 2014;7(2):55-62. Epub 2014/12/05.

152. Seymour T, Twigger AJ, Kakulas F. Pluripotency Genes and Their Functions in the Normal and Aberrant Breast and Brain. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(11):27288-301. Epub 2015/11/19.
153. Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(16):9118-23. Epub 1999/08/04.
154. Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG. Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2000;2(5):458-69. Epub 2000/11/18.
155. Hong S, Hwang DY, Yoon S, Isacson O, Ramezani A, Hawley RG, et al. Functional analysis of various promoters in lentiviral vectors at different stages of in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2007;15(9):1630-9. Epub 2007/07/05.
156. Baup D, Fraga L, Pernot E, Van Acker A, Vanherck AS, Breckpot K, et al. Variegation and silencing in a lentiviral-based murine transgenic model. *Transgenic research*. 2010;19(3):399-414. Epub 2009/08/25.
157. Gieswein CE, Sharom FJ, Wildeman AG. Oligomerization of the E5 protein of human papillomavirus type 16 occurs through multiple hydrophobic regions. *Virology*. 2003;313(2):415-26. Epub 2003/09/05.
158. Yang DH, Wildeman AG, Sharom FJ. Overexpression, purification, and structural analysis of the hydrophobic E5 protein from human papillomavirus type 16. *Protein Expr Purif*. 2003;30(1):1-10. Epub 2003/06/25.
159. Mansha M, Wasim M, Ploner C, Hussain A, Latif AA, Tariq M, et al. Problems encountered in bicistronic IRES-GFP expression vectors employed in functional analyses of GC-induced genes. *Mol Biol Rep*. 2012;39(12):10227-34. Epub 2012/10/19.
160. Bochkov YA, Palmenberg AC. Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *Biotechniques*. 2006;41(3):283-4, 6, 8 passim. Epub 2006/09/23.

161. Choi AG, Wong J, Marchant D, Luo H. The ubiquitin-proteasome system in positive-strand RNA virus infection. *Reviews in medical virology*. 2013;23(2):85-96. Epub 2012/07/12.
162. Genter SM, Sterling S, Duensing S, Munger K, Sattler C, Lambert PF. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J Virol*. 2003;77(5):2832-42. Epub 2003/02/14.
163. 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. Epub 2000/08/06.
164. Purpura V, Belleudi F, Caputo S, Torrisi MR. HPV16 E5 and KGFR/FGFR2b interplay in differentiating epithelial cells. *Oncotarget*. 2013;4(2):192-205. Epub 2013/04/03.
165. Dhara SK, Hasneen K, Machacek DW, Boyd NL, Rao RR, Stice SL. Human neural progenitor cells derived from embryonic stem cells in feeder-free cultures. *Differentiation*. 2008;76(5):454-64. Epub 2008/01/08.
166. Preda MB, Burlacu A, Simionescu M. Defined-size embryoid bodies formed in the presence of serum replacement increases the efficiency of the cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells. *Tissue & cell*. 2013;45(1):54-60. Epub 2012/10/31.
167. Reda A, Albalushi H, Montalvo SC, Nurmio M, Sahin Z, Hou M, et al. Knock-Out Serum Replacement and Melatonin Effects on Germ Cell Differentiation in Murine Testicular Explant Cultures. *Annals of biomedical engineering*. 2017;45(7):1783-94. Epub 2017/05/11.
168. Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2005;26(2):495-502. Epub 2004/10/30.
169. Balaji AB, Jamil K, Ram GM, Raju GS. Pluripotent lineage of CD133 stem cells isolated from human skin samples. *Indian journal of experimental biology*. 2013;51(2):107-15. Epub 2013/08/09.
170. Ortiz-Sanchez E, Santiago-Lopez L, Cruz-Dominguez VB, Toledo-Guzman ME, Hernandez-Cueto D, Muniz-Hernandez S, et al. Characterization of cervical cancer stem

cell-like cells: phenotyping, stemness, and Human Papilloma Virus co-receptor expression. *Oncotarget*. 2016. Epub 2016/03/24.

171. Feng D, Yan K, Zhou Y, Liang H, Liang J, Zhao W, et al. Piwil2 is reactivated by HPV oncoproteins and initiates cell reprogramming via epigenetic regulation during cervical cancer tumorigenesis. *Oncotarget*. 2016;7(40):64575-88. Epub 2016/09/08.

172. Wang X, Dai J. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells*. 2010;28(5):885-93. Epub 2010/03/25.

173. Bernhardt M, Galach M, Novak D, Utikal J. Mediators of induced pluripotency and their role in cancer cells - current scientific knowledge and future perspectives. *Biotechnology journal*. 2012;7(6):810-21. Epub 2012/05/17.

174. Lee K, Adhikary G, Balasubramanian S, Gopalakrishnan R, McCormick T, Dimri GP, et al. Expression of Bmi-1 in epidermis enhances cell survival by altering cell cycle regulatory protein expression and inhibiting apoptosis. *J Invest Dermatol*. 2008;128(1):9-17. Epub 2007/07/13.

175. Wang Q, Li WL, You P, Su J, Zhu MH, Xie DF, et al. Oncoprotein BMI-1 induces the malignant transformation of HaCaT cells. *J Cell Biochem*. 2009;106(1):16-24. Epub 2008/11/21.

176. Qiao B, Chen Z, Hu F, Tao Q, Lam AK. BMI-1 activation is crucial in hTERT-induced epithelial-mesenchymal transition of oral epithelial cells. *Experimental and molecular pathology*. 2013;95(1):57-61. Epub 2013/05/29.

177. Kato H, Izumi K, Saito T, Ohnuki H, Terada M, Kawano Y, et al. Distinct expression patterns and roles of aldehyde dehydrogenases in normal oral mucosa keratinocytes: differential inhibitory effects of a pharmacological inhibitor and RNAi-mediated knockdown on cellular phenotype and epithelial morphology. *Histochem Cell Biol*. 2013;139(6):847-62. Epub 2012/12/20.

178. Ahmad S, Kolli S, Li DQ, de Paiva CS, Pryzborski S, Dimmick I, et al. A putative role for RHAMM/HMMR as a negative marker of stem cell-containing population of human limbal epithelial cells. *Stem Cells*. 2008;26(6):1609-19. Epub 2008/03/22.

179. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005;33(11):1402-16. Epub 2005/11/03.

180. Chen TC, Persons K, Liu WW, Chen ML, Holick MF. The antiproliferative and differentiative activities of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> are potentiated by epidermal growth factor and attenuated by insulin in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1995;104(1):113-7. Epub 1995/01/01.
181. Okugawa Y, Hirai Y. Extracellular epimorphin modulates epidermal differentiation signals mediated by epidermal growth factor receptor. *Journal of dermatological science.* 2013;69(3):236-42. Epub 2012/12/12.
182. Saeki Y, Nagashima T, Kimura S, Okada-Hatakeyama M. An ErbB receptor-mediated AP-1 regulatory network is modulated by STAT3 and c-MYC during calcium-dependent keratinocyte differentiation. *Exp Dermatol.* 2012;21(4):293-8. Epub 2012/03/16.
183. Denning MF, Dlugosz AA, Cheng C, Dempsey PJ, Coffey RJ, Jr., Threadgill DW, et al. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and protein kinase C during calcium-induced differentiation of keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2000;9(3):192-9. Epub 2000/06/06.
184. Schmidt M, Goebeler M, Posern G, Feller SM, Seitz CS, Brocker EB, et al. Ras-independent activation of the Raf/MEK/ERK pathway upon calcium-induced differentiation of keratinocytes. *J Biol Chem.* 2000;275(52):41011-7. Epub 2000/10/06.
185. Menges CW, McCance DJ. Constitutive activation of the Raf-MAPK pathway causes negative feedback inhibition of Ras-PI3K-AKT and cellular arrest through the EphA2 receptor. *Oncogene.* 2008;27(20):2934-40. Epub 2007/12/07.
186. Sayama K, Yamasaki K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Ijuin T, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes. *J Biol Chem.* 2002;277(43):40390-6. Epub 2002/08/17.
187. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med (Berl).* 1996;74(10):589-607. Epub 1996/10/01.
188. Gupta P, Prywes R. ATF1 phosphorylation by the ERK MAPK pathway is required for epidermal growth factor-induced c-jun expression. *J Biol Chem.* 2002;277(52):50550-6. Epub 2002/11/05.
189. Zenz R, Wagner EF. Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(7):1043-9. Epub 2006/01/21.

190. Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*. 2001;20(19):2413-23. Epub 2001/06/13.
191. Han B, Rorke EA, Adhikary G, Chew YC, Xu W, Eckert RL. Suppression of AP1 transcription factor function in keratinocyte suppresses differentiation. *PLoS One*. 2012;7(5):e36941. Epub 2012/06/01.
192. Passegue E, Wagner EF, Weissman IL. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell*. 2004;119(3):431-43. Epub 2004/10/28.
193. Belleudi F, Purpura V, Torrisi MR. The receptor tyrosine kinase FGFR2b/KGFR controls early differentiation of human keratinocytes. *PLoS One*. 2011;6(9):e24194. Epub 2011/10/01.

# APÉNDICE

## **Buffer Bolen-modificado RIPA (*Bolen-modified radioimmunoprecipitation assay*)**

MOPS-NaOH pH 7.0	20 mM
Cloruro de sodio	150 mM
EDTA	1 mM
Nonidet P-40	1%
Deoxicolato de sodio	1%
SDS	0.1%

Preparar con agua bidestilada o desionizada.

Ajustar el pH a 7.0.

Al momento de utilizarlo se suplementa con inhibidores de proteasas y de fosfatasa:

Complete (50 X)	1 X
Ortovanadato de sodio	2 mM
Fluoruro de sodio	25 mM
Molibdato de sodio	10 mM

## **Buffer de carga (*Laemmli loading buffer*)**

Tris base (pH 6.8)	50 mM
Glicerol	10%
SDS	2%
Azul Bromofenol	0.1%
$\beta$ – Mercaptoetanol	100 mM

Preparar con agua desionizada.

### **Buffer de carga para DNA en geles de agarosa**

Glicerol	30%
Xileno cianol	0.6%
Azul de bromofenol	0.6%

Preparar con agua desionizada estéril.

### **Buffer de corrida (*Laemmli electrophoresis running buffer*)**

Glicina	191.8 mM
Tris-Base	24.8 mM
SDS	0.1%

Preparar con agua bidestilada o desionizada.

El pH debe ser cercano a 8.3, no ajustarlo.

### **Buffer de transferencia**

Glicina	190 mM
Tris-Base	25 mM
Metanol	20%

Preparar con agua bidestilada o desionizada.

### **Buffer salino de fosfatos de Dulbecco (DPBS, *Dulbecco's phosphate-buffered saline*)**

Cloruro de sodio	137 mM
Cloruro de potasio	2.7 mM
Fosfato de sodio dibásico	8.1 mM
Fosfato de potasio monobásico	1.5 mM

Preparar con agua desionizada o bidestilada.

Ajustar el pH a 7.4.

### **Buffer salino de Tris (TBS, *Tris-buffered saline*)**

Tris base	20 mM
Cloruro de sodio	137 mM

Preparar con agua desionizada o bidestilada.

Ajustar el pH a 7.6 con ácido clorhídrico.

### **Reconstitución del EGF humano recombinante (SIGMA-ALDRICH, E9644)**

El contenido del vial se encontraba liofilizado, por lo que fue reconstituido a una concentración de 1 mg/ml en ácido acético 10 mM preparado con agua desionizada y filtrado por 0.2  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, una porción del EGF reconstituido fue diluida a 20 ng/ $\mu\text{l}$  en BSA al 0.1% preparada con DPBS y filtrada por 0.2  $\mu\text{m}$ .

Finalmente se hicieron alícuotas de trabajo y se almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **RGB 4X (*Running gel buffer*)**

Tris Base	1.5 M
SDS	0.4%

Preparar con agua bidestilada o desionizada.

Ajustar el pH a 8.8 con ácido clorhídrico.

### **SGB 4X (*Stacking gel buffer*)**

Tris Base	0.5 M
SDS	0.4%

Preparar con agua bidestilada o desionizada.

Ajustar el pH a 6.8 con ácido clorhídrico.

### **Solución de rojo de Ponceau**

Rojo de Ponceau	0.1%
Ácido acético glacial	1%

Preparar con agua bidestilada o desionizada.