CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

"Participación de la oncoproteína E5 de VPH16 en el *splicing* alternativo de genes implicados en la Transición Epitelio-Mesénquima"

T E S I S

Que presenta

BIOL. MARICARMEN OLVERA VAZQUEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

en la especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de tesis

DR. JOSÉ EFRAÍN GARRIDO GUERRERO

Ciudad de México **Noviembre, 2021**

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

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), Unidad Zacatenco, 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 CB-256514.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante mis estudios de maestría, ya que me otorgaron una beca con el número de registro 997723, esto me permitió llevarla a cabo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al **Dr. José Efraín Garrido Guerrero** por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por sus consejos y asesoría constante durante el desarrollo de la tesis y por su amistad.

Al **Dr. Glustein Pozo Molina** por ser parte de mi comité, por la asesoría y consejos dados en el presente trabajo.

Al **Dr. Bulmaro Cisneros Vega** por su participación y asesoramiento durante el desarrollo del presente trabajo.

Al **Biol. Pedro Chávez Olmos** por su asesoría, apoyo y recomendaciones dadas en el presente trabajo y por su amistad.

A mis amigas y compañeras del Laboratorio No. 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular, por tener la oportunidad de vivir diferentes experiencias junto a ellas, por su amistad, por sus consejos y el apoyo dado durante mi estancia: **Mariana, Lily, Paty, Diana y Angeles.**

A mis **amigos y compañeros de la maestría**, por siempre motivarme, por su ayuda, por los buenos momentos pasados durante los cursos y por su bonita amistad.

A la **Sria. Gabriela Mora Macías** por siempre apoyarme en trámites administrativos durante mi estancia.

Y a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente para que este trabajo se desarrollara.

DEDICATORIA

A mis padres, **Yolanda Vázquez y Abundio Olvera** por ser mis pilares y ejemplo de inspiración, motivación, trabajo, dedicación y perseverancia, por todo su apoyo dado durante esta etapa, por su cariño y amor incondicional.

A mis hermanos **Sindy, Israel, Dulce y Luis Ángel** por sus consejos, apoyo y ayuda incondicional, por ser mis ejemplos de esfuerzo y persistencia para continuar esforzándome para alcanzar mis metas.

A mis abuelitos **Catalina, Estefanía, José Isabel y José Carmen** porque siempre me demostraron su amor y confianza absoluta, por ser mis grandes ejemplos de trabajo.

A mis Sobrinos **Santi, Alan y Lia** y a mi cuñada **Liz** por el gran cariño que les tengo, por los momentos de alegría que me motiva a continuar.

A **Alejandra Selayes** por la oportunidad de haber conocido a una persona con un alma noble, y tenaz, por compartir momentos agradables a tu lado, bonitos recuerdos que siempre estarán en mi memoria.

RESUMEN

El virus del papiloma humano (VPH) es causante de infecciones genitales en humanos, la mayoría de estas infecciones son transitorias y desaparecen sin tratamiento, sin embargo, hay diferentes tipos de VPH que causan infecciones de diferentes patologías tanto cutáneas como mucosas. Los VPH's de bajo riego provocan la aparición de verrugas genitales, y los VPH's de alto riesgo provocan lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL), precursoras de la aparición del cáncer cérvico-uterino (CaCu).

Las proteínas virales tienen diferentes funciones que contribuyen en la infección, siendo E5 una de las proteínas que se expresa en las primeras etapas de la infección y en la progresión maligna, participando en el bloqueo al sistema inmune y en la activación de diferentes vías de señalización como la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), promoviendo el reciclamiento del receptor y aumentando la proliferación celular. Recientemente se ha observado su participación en la activación del cambio de isoformas del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2). Aparentemente, el procesamiento del pre-RNAm de otros genes además del de este receptor, están siendo modulados por E5, afectando la expresión de sus isoformas. Dichos genes están involucrados en la transición epitelio-mesénquima (EMT), un programa que en células tumorigénicas es activado para favorecer la progresión del cáncer y la metástasis.

Para conocer si E5 puede estar modulando el cambio de isoformas en otros genes, en el presente trabajo se evaluó la expresión de isoformas epiteliales y mesenquimales de tres genes: FGFR2, ENAH y CD44, los cuales son alterados durante la EMT.

El análisis semicuantitativo nos dio una primera aproximación sobre el efecto que tiene la presencia de E5 sobre la expresión de ambos tipos de isoformas (epiteliales y mesenquimales) de los tres genes evaluados, siendo las isoformas epiteliales reguladas negativamente, mientras que las isoformas mesenquimales aumentaron, pero no significativamente. Nuestros resultados indican que E5 puede estar participando en el cambio de isoformas en genes que llevan a la transición epitelio-mesénquima.

SUMMARY

Human papillomavirus (HPV) causes genital infections in humans, most of these are transient and disappear without treatment, however there are different types of HPV's that cause infections of different pathologies both cutaneous and mucosal. Low-risk HPV's cause genital warts, but high-risk HPVs cause high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL), precursors of cervical cancer (CaCU).

Viral proteins have different functions that contribute to infection, being E5 one of the proteins that is expressed in the early stages of infection and malignant progression, participating in blocking the immune system and activating different signaling pathways, such as the epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway, promoting the recycling of the receptor and increasing cell proliferation. Recently, its involvement in the activation of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) isoform switching has been observed. Apparently, the pre-mRNA processing of other genes besides this receptor is being modulated by E5, affecting the expression of its isoforms. These genes are involved in the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), a program that in tumorigenic cells is activated to favor cancer progression and metastasis.

In order to know if E5 may be modulating the change of isoforms in other genes altered during EMT, in the present work we evaluated the expression of epithelial and mesenchymal isoforms of three genes: FGFR2, ENAH and CD44.

Semiquantitative analysis gave us a first approximation of the effect that the presence of E5 has on the expression of both types of isoforms (epithelial and mesenchymal) of the three genes evaluated, being the epithelial isoforms negatively regulated, while the mesenchymal isoforms increased slightly. Our results indicate that E5 may be involved in isoform switching in genes leading to epithelial-mesenchymal transition.

INDICE

1. INTRODUCCION 8

1.1 Virus del papiloma humano 8

1.1.1 Infección y ciclo replicativo del VPH 9

1.1.2 Oncoproteína E5 de VPH16 12

1.2 Cáncer cervical 13

1.2.1 Importancia clínica y epidemiológica 13

1.3 Programa EMT 14

1.3.1 Marcadores importantes en la EMT 15

1.3.2 EMT en la progresión del cáncer 17

1.4 *Splicing* alternativo 19

1.4.1 *Splicing* y su importancia en el procesamiento del RNA mensajero 19

1.4.2 Reguladores de empalme alternativo 22

1.4.3 Funciones de las proteínas reguladores de empalme epitelial (ESRPs) 23

1.4.4 *Splicing* alternativo en el cáncer y en la EMT 24

2. ANTECEDENTES 25

3. JUSTIFICACIÓN 27

4. HIPÓTESIS 28

5. OBJETIVO GENERAL 29

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 30

8. MATERIALES Y MÉTODOS 31

8.1 Modelo celular 31

8.2 Cultivo celular 31

8.3 Extracción de RNA 32

8.4 PCR en punto final 33

8.5 PCR cuantitativa (qPCR) 35

8.6 Purificación y precipitación de DNA 35

8.7 Digestión de DNA utilizando enzimas de restricción 36

8.8 Análisis estadístico 37

9. RESULTADOS 38

9.1 La línea celular HaCaT-E5 expresa el transcrito de E5 de VPH16 38

9.2 Las dos líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5 presentan la variante de *splicing* epitelial de FGFR2 (FGFR2b) 38

9.3 Las líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5 expresan las variantes de *splicing* epitelial y mesenquimal del gen ENAH 43

9.4 Las líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5 expresan las variantes de *splicing* epitelial y mesenquimal del gen CD44 45

10. DISCUSIÓN 47

11. CONCLUSION 52

12. PERSPECTIVAS 53

13. BIBLIOGRAFÍA 54

14. APENDICE 60

1. INTRODUCCION

1.1 Virus del papiloma humano

El virus del papiloma humano (VPH) es un agente infeccioso de transmisión sexual que se encuentra entre los factores de riesgo más importantes para el cáncer cervical, ya que afecta al 50-80% de la población humana sexualmente activa (Estêvão *et. al.*, 2019). Los VPH's se agrupan según el tropismo tisular y la patología que provocan y se han clasificado en cinco géneros: alfa (α), beta (β), gamma (γ), mu (μ) y un (ν); el grupo α uno de los más importantes, ha sido foco de investigación debido a su capacidad para causar patología tanto cutánea como mucosa. Es un grupo amplio que comprende 64 VPH's diferentes, se subdivide en alto riesgo y de bajo riesgo; los VPH's de bajo riesgo como el 6, 11, 5 y 8 se asocian con el desarrollo de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL), como las verrugas anogenitales benignas, mientras que VPH de alto riesgo como el 16, 18, 31 y 33 son los principales impulsores de lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL) y precursores de cáncer (De la Fuente-Villareal *et. al.*, 2010; Burd y Dean, 2016; Estêvão *et. al.*, 2019).

El VPH pertenece a la familia Papillomaviridae; los viriones son icosahedricos de aproximadamente 55 nm. Su genoma es DNA circular bicatenario de 8 kilobases (kb) que contiene tres regiones funcionales: Una región reguladora rio arriba no codificante llamada región larga de control (LCR); esta región es la de mayor grado de variación en el genoma viral y contiene al promotor central p97 y secuencias potenciadoras y silenciadoras que controlan la transcripción. Una región temprana (E) que consta de los ORF no estructurales E1, E2, E4, E5, E6 y E7, que participan en la replicación viral y la tumorigénesis. Y una región tardía (L) que tiene al promotor tardío p670 que codifica los ORF estructurales L1 y L2 presentes en la cápside viral (Figura 1) (De la Fuente-Villareal *et. al.*, 2010; Burd y Dean, 2016; Okunade, 2020).

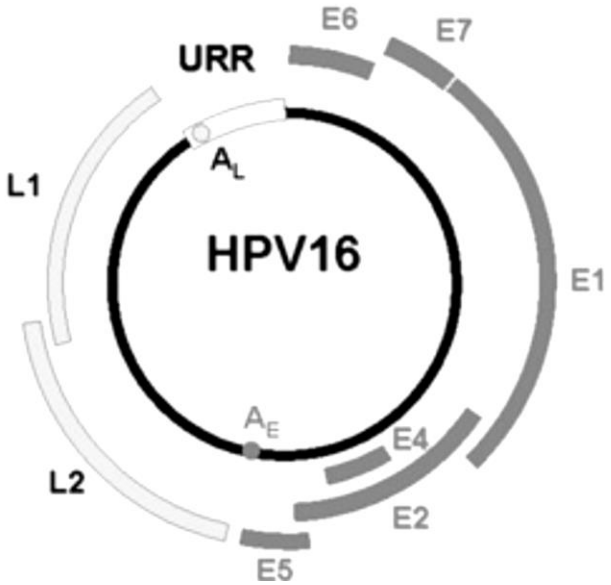


Figura 1. Genoma del VPH16. ORFs no estructurales: E1, E2, E4, E5, E6, E7; ORFs estructurales: L1 y L2; promotor y elementos enhancer: URR. Modificado de Stanley, Pett y Coleman, 2007.

1.1.1 Infección y ciclo replicativo del VPH

La infección por VPH se asocia con una amplia gama de patologías, incluyendo carcinomas de vagina, ano, pene y orofaringe, existen más de 100 tipos con manifestaciones clínicas. El virus infecta células epiteliales cutáneas y mucosas, accediendo a la lámina basal a través de pequeñas áreas de daño en el epitelio. Las proteínas de la cápside, L1 y L2 facilitan la entrada a la capa basal, y una vez adentro puede seguir dos vías: la vía productiva (abortiva) o la vía latente (transformadora). La vía productiva está enfocada en la replicación y el ensamblaje del virus, mientras que en la vía latente la expresión del VPH se desregula y no se completa el ciclo de vida normal del virus (De la Fuente-Villareal *et. al.*, 2010; Burd y Dean, 2016).

En la vía productiva, las copias de DNA viral se mantienen en un número bajo de copias hasta que la célula se mueve a través del epitelio en el proceso de diferenciación. La replicación y el ensamblaje del virus se producen en las células epiteliales escamosas diferenciadas a medida que se mueven hacia la superficie epitelial. La expresión génica del

virus está estrictamente controlada y el DNA viral se amplifica como plásmidos nucleares extracromosómicos; la replicación tiene lugar por completo dentro de la célula, por lo que se produce poca respuesta inmunitaria del huésped (Figura 2) (Burd y Dean, 2016).

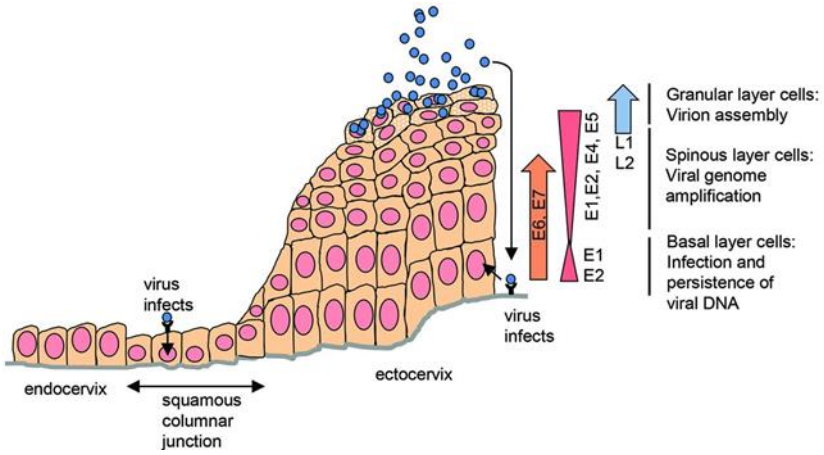


Figura 2. Infección por el VPH, expresión de las proteínas virales y producción de viriones. Tomada de Graham, 2017.

Al entrar el genoma viral al núcleo de la célula, comienza la replicación a través de las proteínas E1 (helicasa de DNA viral), la cual es reclutada por el factor de transcripción viral E2, quien también participa en el anclaje del episoma viral al genoma de la célula. Además, el virus se apropia de la maquinaria de replicación de la célula, debido a que no codifica para otras proteínas que le ayuden en la replicación de su genoma (De la Fuente-Villareal *et. al.*, 2010; Burd y Dean, 2016). Ya en las células basales infectadas, el genoma viral se replica junto con la replicación de genoma celular. Otra proteína viral, E4, también apoya la amplificación de genoma viral en los queratinocitos diferenciados, a través de regular directamente el ciclo celular en la fase G_2. También se ha observado la modulación de filamentos de citoqueratina para hacer a las células más propensas a liberar los viriones. Una vez que se expresa la proteína viral E5, está presente en el retículo endoplásmico participando en la modulación de vías de señalización, como la de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); también ayuda a evadir la respuesta inmune. La expresión de las proteínas E6 y E7 es controlada por el factor de transcripción viral E2, para asegurar la supervivencia continua de las células infectadas (Graham, 2017).

La expresión de las proteínas estructurales L1 y L2 se da en la parte final de la infección, durante el ensamblaje del virión. L2 se ensambla primero y se importa al núcleo para ayudar en el empaquetamiento del DNA y el ensamblaje del virión. L1 se autoensambla en capsómeros pentaméricos en el citoplasma y se transportan al núcleo. Los viriones ya formados se liberan dentro de las capas de células muertas que se desprenden de la superficie epitelial (Graham, 2017).

En una infección latente, la expresión del VPH se desregula y se da la integración del genoma viral en el genoma de la célula. Esta integración es un paso común asociado con la progresión al cáncer. Aunque la integración es un paso muy importante en la progresión hacia la carcinogénesis, algunos canceres continúan albergando el DNA del VPH de forma episomal.

De acuerdo a lo expresado por Graham y colaboradores "la integración podría ser un resultado indirecto de la unión de los episomas virales adyacentes a las regiones frágiles de los cromosomas que acumulan los factores de reparación de rotura del DNA esenciales para la amplificación del DNA viral" (Graham, 2017). Una vez sucedida esta integración, comienza toda una reorganización dentro de la célula, que beneficia al virus; por ejemplo, la pérdida de función de un supresor de tumores, es una de las acciones que ocurre después de la integración del VPH, ocasionando la deleción de regiones génicas que generan transcripciones truncadas, así como transcripciones que benefician al virus (Pinatti, Walline y Carey, 2018).

La integración del genoma viral se produce en la región E1/E2, rompiendo el marco de lectura de E2 y provocando la alteración o deleción de las secuencias del gen E2. Esto ocasiona la interrupción o el silenciamiento de los genes tempranos que se requieren para la replicación viral (Burd y Dean, 2016), ocurriendo así una inestabilidad genómica. De esta forma, las proteínas virales E6 y E7, conocidas por su papel asociado con la progresión maligna, se sobre-expresan provocando una desregulación. La función de E6 está relacionada con la degradación de la proteína p53, un importante represor del crecimiento y la diferenciación celular, mientras que E7 impide la regulación del crecimiento celular mediante una unión competitiva con la ciclina A1, la proteína p107 y con la proteína del retinoblastoma (pRb), que regulan la progresión de las células desde el ciclo celular en la fase G_1 a la fase S.

A E7 también se les atribuyen otras funciones como la desregulación epigenética, la modulación del sistema inmune, la invasión celular, la inmortalización celular y la inestabilidad genómica (Stanley, Pett y Coleman, 2007; De la Fuente-Villareal *et. al.*, 2010; Estêvão *et. al.*, 2019).

1.1.2 Oncoproteína E5 de VPH16

E5 de VPH16 es una proteína hidrofóbica de 83 aminoácidos que se encuentra unida a la membrana, se asocia con el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y la membrana nuclear. Se le ha considerado una oncoproteína debido a su capacidad de transformar fibroblastos murinos y cooperar con E7 de VPH16 para estimular la proliferación de queratinocitos humanos, además de contribuir a la carcinogénesis de la piel en ratones transgénicos. Diferentes reportes han sugerido que E5 contribuye a la carcinogénesis cervical a través de la modulación de las vías de señalización celular, además de aumentar el potencial de inmortalización de E6 y E7 de VPH16. En un estudio realizado a ratones transgénicos k14E5 se demostró que E5 de VPH16 podría contribuir a la carcinogénesis cervical solo o en combinación con E6 o E7. Además, se ha documentado que E5 puede perjudicar la comunicación célula-célula, haciendo que las células sean insensibles a las señales normales de regulación del crecimiento (Kim *et. al.*, 2010; Maufort *et. al.*, 2010).

A esta proteína viral se le han atribuido diversas funciones en múltiples mecanismos; modulando diferentes vías de señalización celular involucradas en proliferación celular, la angiogénesis y la apoptosis, favorece la activación de EGFR y la vía de señalización de células inflamatorias (Venuti *et. al.*, 2011). Participa en la evasión de la respuesta inmune al bloquear al complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Además, favorece la proliferación celular a través de la regulación negativa de los supresores tumorales p21 y p27, ambos inhibidores de proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que regulan la progresión del ciclo celular (Kim *et. al.*, 2010; Estêvão *et. al.*, 2019). E5 se expresa en etapas tempranas de la infección, por lo que sus funciones se centran en prolongar la vida y expandir el conjunto de células infectadas, de las cuales el cáncer puede surgir como un evento estocástico, ya que el gen E5 se elimina con frecuencia cuando el genoma del VPH se integra, favoreciendo la progresión maligna. En el cáncer invasivo, E5 se expresa cuando la

integración no interrumpe este gen, o en tumores que contienen el genoma viral episomal (Kim *et. al.*, 2010; Venuti *et. al.*, 2011).

1.2 Cáncer cervical

El cáncer cervical es una enfermedad que surge por una infección persistente de un subconjunto especifico de VPH; los VPH's de alto riesgo del tipo 16 y 18, son los causantes del 70 % de los canceres cervicales y lesiones precancerosas. Esta enfermedad se origina en células productoras de moco, en las regiones entre el ectocérvix y el endocérvix; estas áreas son más propensas a una infección persistente debido a que la replicación del VPH no puede controlarse adecuadamente. Las células del cuello uterino se vuelven anormales y comienzan a crecer sin control (Graham, 2017; Johnson *et. al.*, 2019; Organización Mundial de la Salud, 2019).

1.2.1 Importancia clínica y epidemiológica

El cáncer cervical es considerado la segunda causa de muerte en mujeres en el mundo y el segundo cáncer más común en mujeres que viven en regiones menos desarrolladas. La tasa de incidencia y mortalidad es más alta en zonas de bajos recursos y en México se reportan casos nuevos cada año; solo para el 2018 el número de incidencias fue de 7,869 ocupando el quinto lugar y el noveno en muertes (Globocan, 2018; WHO, 2019).

Gracias a los avances en el entendimiento de la enfermedad se ha desarrollado una vacuna que protege contra VPH's tanto de alto riesgo como de bajo riesgo. Sin embargo, la tasa de mortalidad en mujeres sigue siendo una de las más importantes, debido a que en mujeres que ya presentan la infección los tratamientos usados para mitigar no logran erradicar por completo la infección (Johnson *et. al.*, 2019; WHO, 2019).

Los esfuerzos por disminuir el número de personas infectadas son derivados de un control integral donde se incluyen diferentes etapas de prevención: vacunación contra el VPH, detección y tratamiento de lesiones precancerosas y diagnóstico y tratamiento del cáncer cervical invasivo. Sin embargo, aún faltan más acciones que ayuden a mitigar la enfermedad, ya que el 35% de pacientes logra progresar, por lo que identificar factores relacionados con el comportamiento biológico de la enfermedad se vuelve cada vez más indispensable (Johnson *et. al.*, 2019; WHO, 2019).

1.3 Programa EMT

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un programa biológico celular que ocurre en diferentes tipos de tejidos y etapas de desarrollo, así como en diferentes eventos patológicos como la cicatrización de heridas, fibrosis y en la progresión del cáncer a metástasis. Las células epiteliales pueden entrar a múltiples estados celulares mesenquimales, y estos cambios en el fenotipo dependen de señales y estímulos recibidos por la célula, y dentro del tejido (Zhang y Weinberg, 2018).

La EMT implica la perdida de la polarización de la célula, ocurriendo múltiples cambios bioquímicos que permiten la transformación fenotípica: hay una reorganización del citoesqueleto y las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular se debilitan provocando el desprendimiento de las células epiteliales entre sí y de la membrana basal. Entonces se activa un programa transcripcional para promover el paso al estado mesenquimatoso; estos cambios les permiten a las células adquirir capacidades migratorias, invasividad, resistencia a la apoptosis y la producción de componentes de la matriz extracelular (ECM) (Qureshi *et. al.*, 2015; Dongre y Weinberg, 2019).

La EMT está clasificada en tres tipos de procesos según el contexto fisiológico tisular. El tipo I ocurre durante la embriogénesis y en el desarrollo de órganos, generando células mesenquimales, que pueden someterse a una reversión de la EMT denominado transición mesénquima-epitelial (MET), para generar epitelios secundarios. El tipo II está involucrado en la cicatrización de heridas y en la regeneración de tejidos; también está involucrada en la inflamación y esta se detiene cuando cesa la inflamación. El tipo III está involucrado directamente en la progresión del cáncer y la formación de células madre cancerosas (Qureshi *et. al.*, 2015; Dongre y Weinberg, 2019).

En todas las condiciones patológicas, las células epiteliales pueden activar el programa EMT multifacético en diversas extensiones, frecuentemente adquiriendo la mayoría de los rasgos asociados con las células completamente mesenquimales. En condiciones fisiológicas, las células epiteliales y sus derivados neoplásicos rara vez avanzan a un estado celular completamente mesenquimatoso (Zhang y Weinberg, 2018).

1.3.1 Marcadores importantes en la EMT

Diversos factores de transcripción (FT) están involucrados en la EMT, actuando de forma pleiotrópica y en combinación para inducir la expresión de genes que promueven el estado celular mesenquimatoso; a su vez, reprimen la expresión de genes que mantienen el estado epitelial. Los FT ZEB1 y ZEB2, SNAIL (conocido como SNAI1), SLUG (conocido como SNAI2) y los factores TWIST1 y TWIST2 regulan la expresión de otros factores, así como el control directo de la expresión de varios genes asociados con la polaridad celular (Dongre y Weinberg, 2019). SNAI1 y TWIST1 han demostrado ser importantes para la metástasis en el modelo de cáncer de mama, pero no son esenciales para metástasis en otros sistemas, por ejemplo, en un modelo de cáncer de páncreas, en donde se requiere a ZEB1 (Yang *et. al.*, 2020).

SNAIL reprime al gen que codifica E-cadherina, *CDH1*, uniéndose a cajas E en el promotor CDH1 y reclutando el complejo represivo Polycomb; ZEB1 también reprime transcripcionalmente a *CDH1* e induce la expresión de los genes que codifican vimentina y N-cadherina mediante el reclutamiento de otros modificadores de cromatina a sus promotores. Ambos FT activan la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMP) que facilitan la degradación de la membrana basal, promoviendo la invasión celular (Dongre y Weinberg, 2019).

Recientemente se ha observado que ZEB1 promueve la EMT en líneas celulares de cáncer cervicouterino, aumentando la proliferación y la capacidad migratoria en células CaSki, así como la expresión de vimentina; la expresión de SLUG se ha observado en células previamente no metastásicas confiriéndoles en gran medida sus capacidades metastásicas. Esta información apoya la importancia de la activación de las FT en la EMT, ya que pueden convertir carcinomas no metastásicos en células capaces de invadir y hacer metástasis, indicando una prueba inicial de que la expresión, al menos transitoriamente, de un programa EMT es crucial para la diseminación metastásica de diversos tipos de células de carcinoma (Ran *et. al.*, 2015; Dongre y Weinberg, 2019).

Las células epiteliales, así como las células mesenquimales presentan marcadores que les permiten ser distinguidas unas de las otras. La demostración de ausencia o presencia de marcadores epiteliales y mesenquimales es usada ampliamente para demarcar estados de plasticidad celular. Las células epiteliales presentan marcadores propios como la E-cadherina (presente en las uniones adherentes), ocludinas, claudinas, citoqueratinas, y otras. Cuando ocurre la activación de la EMT las uniones laterales (uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas) que unen las láminas epiteliales sufren una remodelación, la unión célula-célula desaparece, la expresión de E-cadherina se reprime llevando a la perdida morfológica de las células epiteliales comenzando el cambio fenotípico, adquiriendo una morfología mesenquimatosa en forma de huso y expresando marcadores asociados con el estado mesenquimal como son la cadherina neutral (N- Cadherina), vimentina , fibronectina e integrina β1 y β3, entre otros (Figura 3) (Zeisberg y Neilson, 2009; Dongre y Weinberg, 2019).

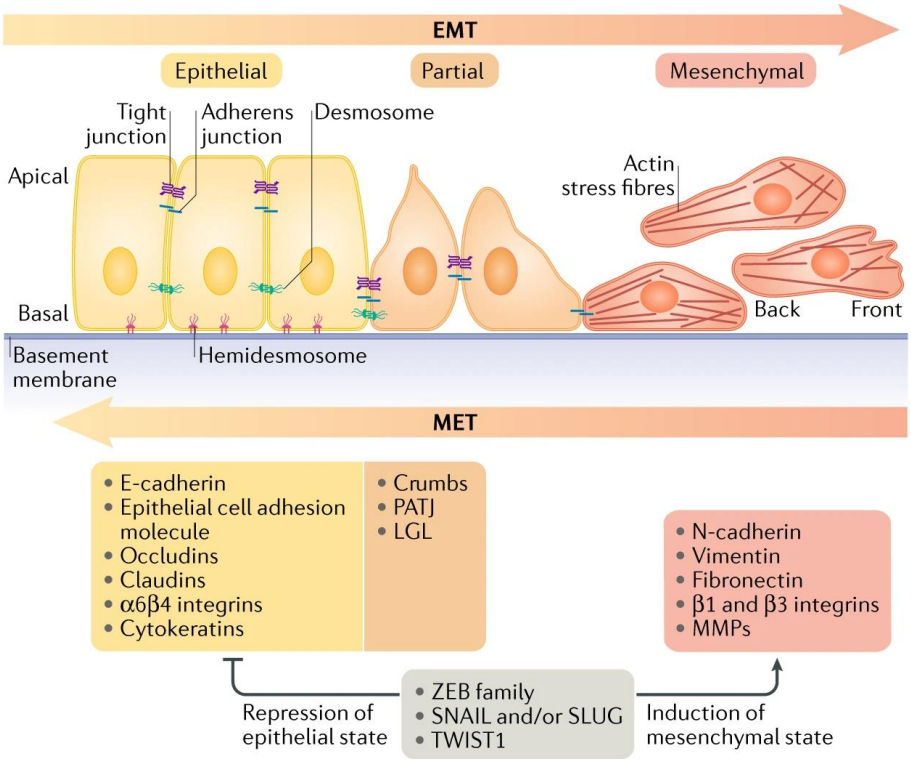


Figura 3. Esquema de un programa EMT típico. Se observan los principales marcadores epiteliales y mesenquimales regulados por factores de transcripción importantes en el programa. Tomado de Dongre y Weinberg, 2019.

1.3.2 EMT en la progresión del cáncer

Cada vez un número mayor de estudios demuestran la activación de los programas EMT durante la progresión maligna. En los carcinomas, donde el programa EMT contribuye a promover fenotipos de células cancerosas, las células de carcinoma pueden completar muchos de los pasos de la cascada de invasión-metástasis, incluida la invasión local de células neoplásicas en el sitio del tumor primario, su intravasación en los vasos sanguíneos, translocación a través de la circulación, extravasación en el parénquima de tejidos distantes y supervivencia como depósitos micrometastásicos (Figura 4). Sin embargo, al igual que las células normales, es poco frecuente que las células de carcinoma pierdan todos sus rasgos epiteliales y ganen un espectro completo de características mesenquimatosas (Zhang y Weinberg, 2018).

Debido a que el programa EMT a menudo se activa de manera reversible, las células de carcinoma vuelven a tener más estados epiteliales a través de MET, para formar metástasis macroscópicas de manera eficiente; esta heterogeneidad fenotípica puede surgir de la combinación especifica de FT y las modificantes de cromatina. Esta plasticidad fenotípica puede desempeñar un papel esencial en el último paso de la cascada metastásica (Dongre y Weinberg, 2019), proporcionando a las células cancerosas mayor adaptabilidad y resistencia, favoreciendo la respuesta a una variedad de señales externas y tensiones fisiológicas que les permiten adquirir ventaja de supervivencia en distintos entornos (vasos sanguíneos y linfáticos, así como sitios de tumores primarios y secundarios) (Yang *et. al.*, 2020).

La EMT juega un papel importante en la metástasis de los ganglios linfáticos en el cáncer cervical, actuando como un importante factor de riesgo de recurrencia o muerte. La metástasis en los ganglios linfáticos es el factor más importante en estadio temprano y proporciona información importante para determinar el enfoque del tratamiento. Muchos estudios han demostrado que la aparición de EMT en el cáncer de cuello uterino favorece la aparición de subpoblaciones de células madre cancerosas (CSC), lo que aumenta el potencial metastásico (Qureshi *et. al.*, 2015).

El tener una comprensión clara del papel de tiene la EMT en el cáncer cervical, permitirá tener terapias más efectivas que ayuden en el tratamiento de paciente con esta enfermedad (Qureshi *et. al.*, 2015).

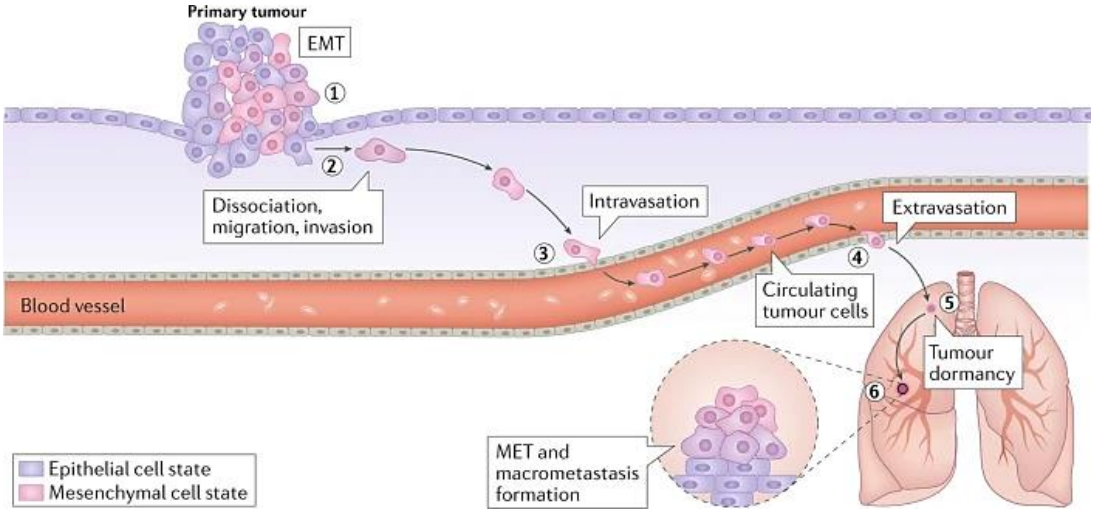


Figura 4. El programa EMT facilita múltiples pasos en la cascada invasión-metástasis. (1) las células tumorales epiteliales aflojan sus uniones celula-celula. (2) degradación de la membrana basal y la matriz extracelular (ECM) para permitir que las células migren e invadan tejido. (3) las células tumorales entran al torrente circulatorio. (4) algunas células podrán atravesar el endotelio capilar de algunos órganos. (5) establecimiento exitoso de las células tumorales. (6) crecimiento y proliferación de nuevos tumores. Tomado de Yang *et. al.*, 2020.

1.4 *Splicing* alternativo

1.4.1 *Splicing* y su importancia en el procesamiento del RNA mensajero

El procesamiento del RNA, es un paso critico dentro del dogma central de la biología. La transcripción de casi todos los genes se somete a un tipo de corte y empalme para obtener un RNA maduro; este proceso está altamente controlado por elementos reguladores *cis* y factores reguladores *trans*. El empalme constitutivo ocurre en cada limite intron-exon, indispensable para la maduración del RNA mensajero (RNAm) que requiere la eliminación de secuencias intrónicas y el empalme de exones adyacentes antes de la traducción en proteína (Urbanski, Leclair y Anczuków, 2018; Black *et. al.*, 2020); todo esto controlado por el *spliceosoma*. Esta estructura es una compleja maquina molecular, compuesta por más de 150 proteínas y cinco ribonucleoproteinas nucleares pequeñas (snRNP) U1, U2, U4, U5 y U6; dichas proteínas se ensamblan al pre-RNAm eliminando los intrones y uniendo los exones hasta tener una molécula de RNA maduro. La secuencia de ramificación (que se encuentra 18-40 nucleótidos rio arriba del 3´) y los sitios de empalme 5' y 3', son necesarias para el reconocimiento y ensamblaje del *spliceosoma*. A través de una serie de reacciones el complejo *spliceosoma* se forma; se da el reconocimiento del 5´por parte de U1 snRNP, luego se da el reconocimiento de U2 snRNP en la secuencia del punto de ramificación y enseguida se da el reclutamiento de snRNP U4, U6, U5 para escindir el intrón y unir los exones restantes (Figura 5) (Black *et. al.*, 2020).

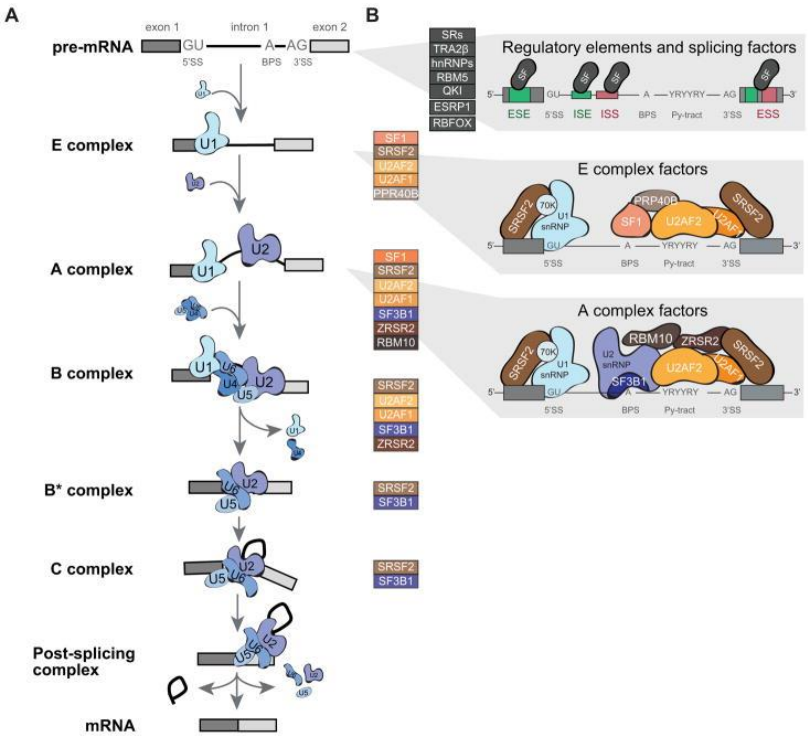


Figura 5. Componentes de la maquinaria transcripcional (*spliceosoma*). A) procesamiento del pre-RNAm; B) elementos y factores regulatorios de splicing. Tomado de Urbanski *et. al.*, 2018.

Además del empalme constitutivo, existe otro tipo de empalme denominado alternativo, donde se genera más de una especie de RNAm única a partir de un solo gen. Cambios como la inclusión o la omisión de exones individuales, el cambio entre sitios de empalme 5′ y 3′ alternativos, la retención de intrones, el empalme mutuamente excluyente de exones adyacentes y otros patrones más complejos del sitio de empalme se incluyen dentro de las variaciones (Figura 6) (Baralle y Giudice, 2017; Ule y Blencowe, 2019).

Estudios del genoma han estimado que cerca del 95% de los genes humanos experimentan algún nivel de empalme alternativo. Análisis de espectrometría de masa de alta resolución indican que el 37% de genes que codifican proteínas humanas generan múltiples isoformas de proteínas, contribuyendo a la complejidad del proteoma (Baralle y Giudice, 2017). Sin embargo, no todos los eventos de corte y empalme alternativos detectados resultar en la

producción de proteínas funcionales debido a que la transcripción no es codificante y no se traduce en una proteína, la estabilidad del RNA también se ve afectada (Bonnal *et. al.*, 2020).

El empalme alternativo contribuye a la diversidad proteómica al producir distintas isoformas a partir de un solo gen, también contribuye en la diferenciación celular y la determinación del linaje, la adquisición y el mantenimiento de la identidad de los tejidos y el desarrollo de órganos, también se ha observado en la EMT y en órganos adultos como el cerebro, corazón, músculo esquelético, entre otros (Black *et. al.*, 2020).

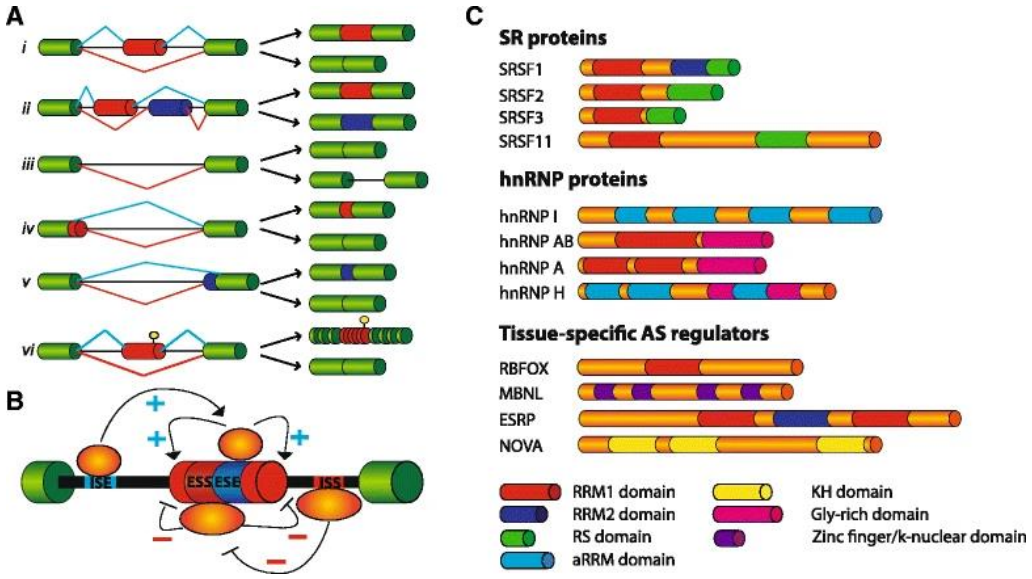


Figura 6. Tipos de splicing alternativo y elementos regulatorios. A) tipos de splicing alternativo; B) sitios ESE,ESS y ISE, ISS; C) RBP que participan en la regulación del splicing alternativo. Tomada de Pradella *et, al.*, 2017.

1.4.2 Reguladores de empalme alternativo

Así como hay proteínas que participan en el procesamiento del RNA, también hay proteínas que participan en la regulación del empalme alternativo, modulando la reacción de corte y empalme; actúan como activadores o represores al unirse a elementos potenciadores o silenciadores exonicos o intronicos (ESE, ESS y ISE, ISS, respectivamente) (Black *et. al.*, 2020).

Muchos tipos de proteínas de unión a RNA (RBP) pueden regular el empalme alternativo, uniéndose a elementos *cis* en intrones y exones ya sea reprimiendo o promoviendo el empalme, si las RBPs se unen a motivos potenciadores de empalme dentro de un intrón o exón estabilizan la formación del *spliceosoma* y promueve la retención de un exón; en cambio cuando se unen a motivos de silenciamiento ya sea en el intron o el exon previenen la formación del *spliceosoma* y promueve la eliminación de un exón (Black *et. al.*, 2020). Proteínas como las de la familia SR, las cuales presentan dominios ricos en serina y arginina, contribuyen a las interacciones proteína-proteína, así como la familia de ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP), las RBPs que contienen RRM, dominio de homología K (KH), dedo de zinc u otros dominios también participan en el regulación (Baralle y Giudice, 2017; Black *et. al.*, 2020).

Muchas RBPs reguladoras funcionan de una manera específica de células, tejidos o en afecciones particulares. Hasta la fecha, los reguladores de *splicing* alternativo específicos de tejido mejor caracterizados son NOVA1/2, PTBP2, SRRM4 y miembros de las familias RBFOX, MBNL, CELF, TIA, ESRP y STAR. Nova, PTBP1 y TDP-43 reprimen la inclusión del exon cuando su unión se superpone a un exon o sitio de empalme, pero activan el empalme cuando se unen a secuencias intronicas rio abajo del sitio de empalme 5' (Aparicio *et. al.*, 2013; Pradella *et. al.*, 2017; Black *et. al.*, 2020). RBFOX2, coordina las redes de empalme mesenquimatoso en los tejidos cancerosos, también regula el empalme alternativo de varias proteínas de unión a RNA diferentes (Urbanski *et. al.*, 2018). El modo de acción para estos factores depende de la posición de sus sitios de unión en el pre-RNAm (Pradella *et. al.*, 2017).

Durante la EMT diferentes RBPs están siendo afectadas, las ESRPs y RBM47 son ejemplo de ello, estas proteínas son específicas de tejido y favorecen eventos de empalme epitelial, por lo que son reguladas negativamente durante un programa de EMT; sin embargo, hay otras RBPs que están siendo favorecidas como RBFOX2 y MBNL1 los cuales contribuyen a firmas de empalme mesenquimal. La expresión de otros factores como RBM5 y 10, así como QKi se encuentra afectada en varios tumores sólidos (Pradella *et. al.*, 2017). La regulación de los diferentes RBPs puede ser debido a los factores de transcripción activadores de la EMT como Twist, Snail o Zeb1/2 ayudando a lograr un cambio fenotípico completo (Aparicio *et. al.*, 2013).

1.4.3 Funciones de las proteínas reguladores de empalme epitelial (ESRPs)

Las proteínas reguladoras de empalme epitelial (ESRPs) son RBPs específicas de tejido epitelial que participan en el *splicing* alternativo específico del epitelio. Tanto la ESRP1 como la ESRP2 tienen funciones similares, ambas favorecen la inclusión o exclusión de exones dependiendo el sitio de unión en el pre-RNAm. Las ESRPs se unen a motivos de unión UGG dentro de la región del intron; las ESRPs excluyen un exon cuando se une a motivos UGG rio arriba del exon blanco, alrededor de los 250 nucleótidos; cuando se unen a motivos UGG rio abajo del exón, alrededor de los 75-250 nucleótidos, promueven su inclusión (Göttgens, Span y Zegers, 2016).

Las ESRPs participa en el *splicing* alternativo de una gran variedad de genes, algunos de ellos codifican proteínas que están involucradas en el programa EMT. Ejemplo de ellos son los genes EPB41L5, SCRIB, MACF1 , GIT2, LOXL2, FAT y PTPRM, los cuales participan en la regulación del citoesqueleto de actina, contactos célula-célula, adhesión célula-matriz extracelular, migración, y polaridad celular (Aparicio *et. al.*, 2013).

Otros objetivos de las ESRPs incluyen proteínas de la membrana celular como integrinas y receptores (KITLG, MPZL1, ITGA6, CD46, CD44, FGFR2) que son capaces de detectar señales ambientales, pero también componentes de vías de señalización involucradas en EMT (MAP3K7, SOS1 y FYN) (Pradella *et. al.*, 2017).

El gen FGFR2 que codifica para el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 es otro de los objetivos mejor caracterizados que es regulado por las ESRPs. Su función es controlar el *splicing* mutuamente excluyente de los exones (IIIb y IIIc) que codifican un dominio proteico diferente causando una especificidad de ligando diferente (Pradella *et. al.*, 2017). Así como FGFR2, otro ejemplo de regulación es el gen p120-catenina, que también es modulado en el empalme de exones que generan diferentes isoformas que se expresan en células epiteliales y mesenquimales con funciones diferentes; mientras que una isoforma promueve la adhesión célula-célula otra promueve la migración e invasión celular (Aparicio *et. al.*, 2013).

1.4.4 *Splicing* alternativo en el cáncer y en la EMT

Los mecanismos postranscripcionales de la regulación de la expresión génica han tomado importancia recientemente debido a su uso como una herramienta por las células cancerosas para adquirir características únicas que les dan ventajas ante otras células para mantener la malignidad del tumor (Pradella *et. al.*, 2017). Específicamente, alteraciones en el *splicing* alternativo, como mutaciones en elementos reguladores del empalme de genes específicos involucrados en cáncer o cambios en la maquinaria de empalme pueden afectan a una red de objetivos de empalme descendentes. Las células cancerosas utilizan este proceso para producir isoformas que benefician la proliferación o migración celular, o que pueden escapar de la muerte celular (Urbanski *et. al.*, 2018).

Durante la EMT ocurren cambios profundos en la expresión génica que requieren múltiples capas de regulación, desde la transcripción hasta el procesamiento postranscripcional del RNA y las modificaciones traduccionales y postraduccionales. El *splicing* alternativo es un mecanismo versátil que contribuye a promover la plasticidad requerida en la EMT, favoreciendo propiedades de naturaleza más agresiva (Pradella *et. al.*, 2017). Se han identificado múltiples eventos de empalme alternativo asociados a EMT en líneas celulares derivadas de múltiples tipos de cáncer, como es el caso de líneas celulares de cáncer de mama y en muestras primarias de cáncer de mama humano, donde los patrones de empalme epitelial y mesenquimal se correlacionaron inversamente (Aparicio *et. al.*, 2013). Esa misma correlación es observada en otros tipos de cáncer (Urbanski *et. al.*, 2018).

2. ANTECEDENTES

La transición epitelio-mesénquima desempeña un papel importante en la metástasis del carcinoma cervical, su inducción ocurre a través de diferentes vías e involucra diferentes moléculas. Diversos informes reportan el papel de las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH cooperando para promover el desarrollo de ciertas características que favorecen a las células cancerosas durante la progresión del cáncer cervicouterino.

La escasa evidencia con respecto a la participación de otras proteínas virales como E5 de VPH 16 no ha permitido dilucidar el papel que juega en la EMT. El estudio realizado por Ranieri y colaboradores (2015) nos da una idea del papel que tiene la proteína viral; dicho estudio se enfocó en evaluar la expresión relativa de las dos isoformas de FGFR2 (FGFR2b y FGFR2c), las cuales se generan por *splicing* alternativo. Sus funciones difieren, debido a que son específicas de tejido; FGFR2b se expresa en células de linaje epitelial y FGFR2c se expresa en células de linaje mesenquimal.

Ambas isoformas se evaluaron en células HaCaT (de linaje epitelial) que expresaban a la proteína viral E5 de VPH 16, encontrando una expresión baja de la isoforma epitelial y un aumento en la expresión de la isoforma mesenquimal, lo que señala que E5 participa en la modulación de ambas isoformas. Al tratar de dilucidar el mecanismo por el que E5 puede estar modulando este cambio de isoformas, identificaron a las ESRPs, como las RBPs responsables de este *splicing* alternativo del gen FGFR2 concluyendo que E5 de VPH16 participa en el cambio de isoformas de FGFR2 a través de regular a las ESRPs.

Considerando la participación de E5 de VPH16 en la modulación de factores de *splicing* alternativo reportado por Ranieri y colaboradores (2015), se realizó una búsqueda bibliográfica para conocer que otros genes están siendo regulados por estos factores.

Warzecha y colaboradores (2009b) realizaron un análisis a partir de microarreglos con un enfoque basado en todo el genoma para caracterizar el empalme global de una red regulada por las ESRPs, incluyendo la transcripción de genes que codifican para proteínas con

funciones en EMT, como la organización del citoesqueleto de actina, adhesión célula–célula, la polaridad y migración celular.

La estrategia consistió en silenciar a las ESRPs en células PNT2, para detectar genes que están siendo expresados diferencialmente, y posibles eventos de *splicing* alternativo, dada la función conocida de estas proteínas en el procesamiento del RNA. Su análisis permitió identificar una amplia lista de nuevos objetivos por parte de las ESRPs, con al menos un ejemplo de cada tipo conocido de evento de *splicing* alternativo en la lista resultante de eventos de empalme regulados por las ESRPs. 18 genes fueron validados experimentalmente por RT-PCR, evaluando el cambio de isoformas en presencia y ausencia de las ESRPs, mostrando la acción de las ESRPs en potencializar o silenciar exones, así como promover isoformas cortas y largas. La mayoría de los candidatos que se sometieron a validación independiente estaban regulados por las ESRPs, lo que sugiere que la mayoría de estos candidatos contienen variantes de empalme que son de hecho componentes de una firma de empalme epitelial.

Otro estudio realizado por el mismo grupo de investigación (Warzecha *et. al.*, 2009a) se centró en analizar el *splicing* alternativo de FGFR2 y de otros genes como CD44, p120-Catenina (CTNND1) y hMena (ENAH), los cuales también experimentan cambios en el empalme durante la EMT. Los autores concluyen que la presencia de las ESRPs favorece la expresión de la isoforma epitelial en cada uno de estos genes, mientras que, al estar ausentes se expresan las isoformas mesenquimales.

El análisis bibliográfico realizado señala a una gran variedad de genes candidatos de estos factores reguladores de empalme, genes que están involucrados en la EMT, adhesión célula-célula, motilidad y polaridad celular. La participación observada en estos estudios, hacen a las ESRPs importantes reguladores en el *splicing* alternativo de un gran número de genes.

Teniendo las observaciones anteriores, en el presente trabajo fue de interés saber que otros genes que también son blanco de las ESRPs y que son importantes para la transición epitelio-mesénquima pueden estar siendo modulados por parte de E5 de VPH 16 en la expresión de sus isoformas epiteliales y mesenquimales.

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha observado la participación de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH16 durante la EMT en cáncer cervical, sin embargo, la oncoproteína E5 de VPH16 recientemente ha sido de interés ya que se ha observado que puede estar participando en la EMT al promover el cambio de isoformas en el FGFR2, regulando negativamente a RBPs involucradas directamente en el *splicing* alternativo del gen, el cual también es modulado durante la EMT (Ranieri *et. al.*, 2015).

Debido a la importancia de la EMT en la progresión de la carcinogénesis, así como la importancia de la proteína E5 de VPH16 al inicio de la infección y la relación que se le ha atribuido en la progresión del cáncer, establecer una posible participación de la proteína viral en la EMT a través del análisis de perfiles de expresión génica de diferentes isoformas de genes que están involucrados en la EMT, nos permitirá conocer con mayor detalle esta forma de regulación por E5, así como ayudar a futuras investigaciones a determinar posibles blancos para evitar que las lesiones premalignas progresen a cánceres invasivos.

4. HIPÓTESIS

La proteína E5 del VPH16 participa en el cambio de isoformas de genes involucrados en la transición epitelio-mesénquima a través de modular las proteínas reguladoras de empalme epitelial ESRP's.

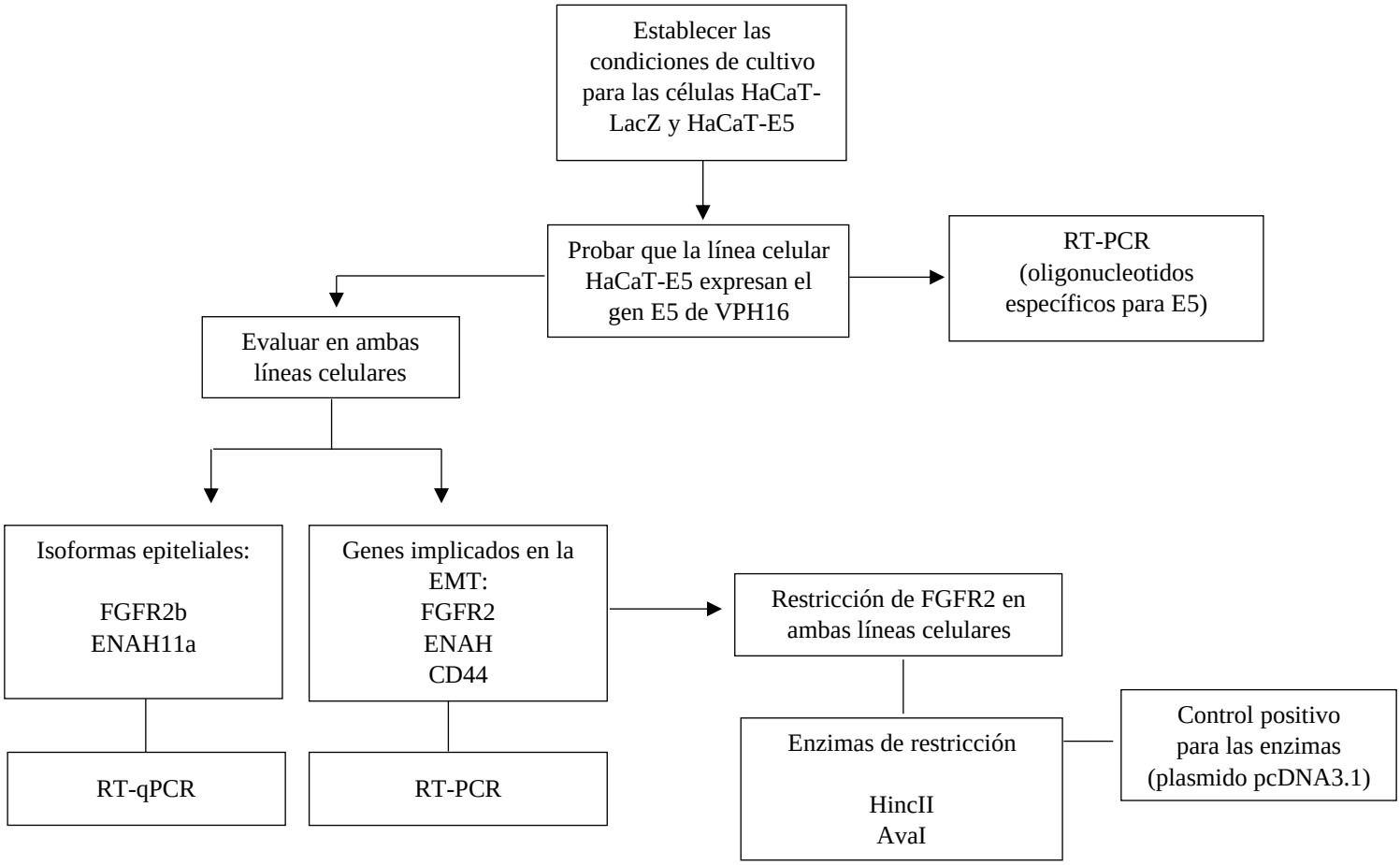
5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la expresión de E5 de VPH16 induce el cambio de isoformas que indique un *splicing* alternativo de genes implicados en la transición epitelio-mesénquima, en un modelo celular VPH^- (línea celular HaCaT).

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la expresión del RNAm de E5 de VPH16, en el sistema HaCaT-LacZ y HaCaT-E5.
2. Determinar eventos de *splicing* alternativo de genes implicados en la EMT en células HaCaT que expresan establemente el gen E5 de VPH16.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Modelo celular

Para el presente trabajo se utilizaron como modelo de estudio las líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5, ambas líneas se desarrollaron en el laboratorio No. 1 (Laboratorio de Investigación en Biología Molecular y Celular del Cáncer) del Departamento de Genética y Biología Molecular por la estudiante de doctorado Alicia Reveles-Espinoza en 2018.

El desarrollo de ambas líneas celulares fue a través de la generación de partículas lentivirales Lenti E5 VPH16 y Lenti-LacZα que contenían al gen E5 de VPH16 y al gen LacZa proveniente de *E. coli*, respectivamente. El sistema lentiviral fue ensamblado en las células HEK 293-FT, mediante la cotransfección de un plásmido de empaquetamiento (psPAX2), un plásmido de envoltura (pMD2.G) y un plásmido de transferencia, para el gen E5 de VPH16 (pSin-EF2-E5VPH16-Pur) y para el caso del gen LacZα (pSin-EF2-LacZα-Pur), el cual fue usado como un control de la síntesis del gen E5, presenta un tamaño similar. Después de que se liberaron al medio de cultivo, los lentivirus se purificaron y concentraron por ultracentrifugación. Posterior las células HaCaT fueron infectadas ya sea con el lentivirus Lenti-E5 VPH16 o Lenti-LacZ, seleccionando su transducción con puromicina.

Esta línea celular se ha utilizado ampliamente para estudiar la homeostasis epidérmica y su fisiopatología, así como las funciones que ejerce E5 de VPH16 en diversos estudios, también se ha utilizado recientemente para evaluar los efectos de la expresión de E5 sobre la diferenciación temprana de células epiteliales (Reveles-Espinoza, 2018). Las líneas celulares de linaje epitelial son ideales para estudiar la EMT.

8.2 Cultivo celular

Las dos líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5 se mantuvieron en medio Dulbecco´s Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (Ham) (1:1) (D-MEM/F-12) (Gibco, 12500-039), suplementado con 10% de KnockOut Serum Replacement (KO SR, Gibco Lote

1985373), un sustituto de Suero Fetal Bovino (SFB), adecuado para mantenimiento de células troncales embrionarias, bicarbonato de sodio 29mM, HEPES 10mM, L-glutamina 2mM, piruvato de sodio 1mM, penicilina 50U/ml y estreptomicina 50µg/ml.

Ambas líneas celulares fueron incubadas en una atmosfera a 37°C con 5% de CO_2. La cosecha de células se realizó utilizando 10% de tripsina al 1X diluida en PBS, dejándose a 37°C por 8-10min para disociar las células.

8.3 Extracción de RNA

Se extrajo el RNA de células provenientes de las líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5 obtenidas de cajas Petri de 60 mm con una confluencia del 80%. Las células se lavaron 2 veces con 2ml de PBS en cada ocasión, posteriormente se cosecharon con 10% de tripsina. La pastilla celular se resuspendió en 1ml de PBS, después se centrifugo a 5000rpm por 5min para retirar el PBS y agregar 600µl de Trizol® Reagent (Ambion by Life Technologies, 15596018).

La extracción del RNA total fue realizada por columna utilizando el kit Direct-zol ™ RNA MiniPrep (Zymo Research, R2050) como lo indican las instrucciones del fabricante. A los lisados celulares que contenían Trizol se les agrego un volumen igual de etanol frio al 96° (600 µl), se homogenizó y posteriormente se transfirió la mitad del volumen a una columna Zymo-spin IIC con su tubo de colecta y se centrifugo a 9300 rpm por 2 min; este paso previo se repitió para el resto del volumen y se volvió a centrifugar. Se cambió el tubo de colecta y se agregaron 400 µl de RNA Wash Buffer a la columna centrifugándose nuevamente a la misma velocidad. En un tubo de microcentrífuga estéril se realizó una mezcla de 5µl de DNase I y 75µl de DNA Digestion Buffer y se añadió directo a la columna dejándose incubar por 15min. Posteriormente, se añadieron a la columna 400µl de Direct-zol RNA PreWash y se centrifugó; se decantó el tubo de colecta y se volvió a repetir este paso previo. Posteriormente se adicionaron 700µl de RNA Wash buffer a la columna y se centrifugó, transfiriendo el volumen del tubo de colecta a un tubo eppendorf nuevo y estéril. Para eluir el RNA se agregó 50µl de DNase/RNase-Free Water a la columna y se centrifugo por 5 min a 9300 rpm.

La cuantificación del RNA se realizó por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Se realizó un tratamiento extra para eliminar posible DNA genómico contaminante; se adicionó 1µl de RQ1 DNase 10X Reaction Buffer (Promega, M198A) y 1µl (1 U) de RQ1 RNase-Free DNasa (Promega, M610A) y se incubó a 37°C durante 1h 30min, después se añadió 1µl RQ1 DNasa Stop Solution (Promega, M199A) y se dejó incubar a 65°C por 10min; el RNA obtenido se almacenó a -70°C.

El cDNA se sintetizó a partir de 1.6µg de RNA; en un tubo de microcentrífuga nuevo y estéril se agregó 8µl de RNA, 1µl de Oligo (dT) 15 primer (Promega, C110A) y 2.4µl de agua MiliQ estéril, para completar un volumen de 11.4µl. Se hizo un precalentamiento a 70°C por 5min, seguido de una incubación a 4°C durante 10min. Se agregó 5µl de M-MLV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer a 1X (Promega,M531A), 5µl de dNTPs, 0.6µl (24 U) de RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega, N211A) y 1µl (200 U) de M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, M170A), para tener un volumen final de 23µl, se homogenizó y se incubó a 42°C durante 1h 30min. El cDNA obtenido se almacenó a -20 °C.

8.4 PCR en punto final

Para la amplificación del cDNA correspondiente a regiones particulares de los genes de interés, se utilizaron los oligonucleótidos específicos; se preparó una mezcla de reacción, la cual contenía: 2µl de cDNA, 5µl de 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer a 1X (Promega, M890A), 1.5µl de MgCl2 Solution 25mM, 1µl de dNTPs, 1µl del oligonucleotido sentido y 1µl del oligonucleotido antisentido, 0.2µl (10 U) de GoTaq Flexi DNA Polymerase y 13.3µl de agua MiliQ estéril para tener un volumen final de 25µl. Toda esta mezcla de reacción fue llevada al termociclador AXYGEN MAXYGEN II. Las características de cada par de oligonucleótidos se encuentran en la tabla 1.

Para la amplificación de E5 de VPH16 se utilizaron las condiciones reportadas por Reveles-Espinoza (2018), una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 5min, 1ciclo; desnaturalización a 94°C por 45s, alineamiento de 60°C por 45s, y extensión a 72°C por 45s, por 30ciclos; finalizando a 72°C por 5min, 1ciclo. Para la amplificación de B2-microglobulina se utilizaron las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por

4min, 1ciclo; desnaturalización a 94°C por 1min, alineamiento a 60°C por 45s, extensión a 72°C por 45s, 30ciclos; extensión a 72°C por 7min, 1ciclo. La amplificación de FGFR2, ENAH, y CD44 se realizó con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 96°C por 5min, 1ciclo; desnaturalización a 96°C por 30s, alineamiento a 64°C por 45s, extensión a 72°C por 1min, 35ciclos; finalizando con una extensión de 72°C por 10min, 1ciclo.

Los productos de PCR se migraron electroforéticamente en geles de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio; por cada 5µl de muestra se agregó 1µl de Buffer de carga 6X (Apéndice 1). Para observar los amplicones en los geles de agarosa se utilizó un transiluminador.

Tabla 1. Características generales de los oligonucleótidos utilizados

Gen	Nombre	Secuencia (5´-3´)	Tm (°C)	Tamaño (pb)
E5 VPH16	AREEcoRIAU1E516wtFw	TTACATGAATTCATTGCCACCATGGACACCTATCGCTATATAACAAATCTTGATACTGC	60	303
	AREBamHIE516wtRv	ATGTAAGGATCCTTATGTAATTAAAAAGCG	60	
B2-micro	B2MG2Fw	ACCCCCACTTGAAAAAGATGAGTA	60	101
	B2MG2Rv	ATGATGCTGCTTACATGTCTCGA	60	
FGFR2	EGRThFGFR2Fw	TGGATCAAGCACGTGGAAAAGA	68.8	300
	EGRThFGFR2Rv	GGCGATTAAGAAGACCCCTATGC	67.4	
ENAH	EGRTENAHFw	TGCTGGCCAGGAGGAGAAGAAT	70.2	281 y
	EGRTENAHRv	ACTGGGCTGTGATAAGGGTGTGG	70.1	218
CD44	MOVRTCD44(5-15)Fw	AGGAGCAGCACTTCAGGAGGTTAC	67.7	1281
	MOVRTCD44(5-15)Rv	ACTGGGGTGGAATGTGTCTTGGTC	71.1	534 342 138
FGFR2b	MOVRTFGFR2bFw	CGTGGAAAAGAACGGCAGTAAATA	65	81
	MOVRTFGFR2bRv	GAACTATTTATCCCCGAGTGCTTG	65	

ENAH 11a	MOVRThMENA 11aFw	GAATTGCTGAAAAGGGATC	58.7	415
	MOVRThMENA 11aRv	CTGTTCCTCTATGCAGTATTTGAC	60.6	

8.5 PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó usando Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) usando el equipo StepOnePlus Real-time PCR system (Applied Biosystems). La mezcla de reacción contenía 2µl de cDNA, 7.5µl de Maxima SYBR Green, 0.2µl de cada oligonucleótido sentido y antisentido y 5.1µl de agua desionizada estéril para tener un volumen final de 15µl. Las condiciones de reacción fueron: 1ciclo de 95°C por 15min, 40ciclos de 95°C por 50s y una temperatura de alineamiento (Tm) de 60°C por 1 min. Como control se utilizó el gen constitutivo B2-microglobulina.

El cálculo de la expresión genética relativa se obtuvo mediante el método 2-ΔΔCT. A partir de los datos obtenidos del CT (cycle thresholds) de cada gen de interés y el gen constitutivo (B2-microglobulina), se determinó el ΔCT de cada muestra. Para normalizar las muestras se utilizó la formula ΔCT=CT$gen\ interés$−CT$gen\ constitutivo$. Después se calculó el ΔΔCT: ΔΔCT=ΔCT$muestra$−ΔCT$control$. Para obtener la expresión relativa de cada gen de interés con respecto al gen control se consiguió con la fórmula $2{-}\Delta\Delta CT$.

8.6 Purificación y precipitación de DNA

Los productos de la reacción de FGFR2 obtenidos de la PCR para ambas líneas celulares (HaCaT-LacZ y HaCaT-E5) se purificaron y se precipitaron utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, A9281) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al volumen total del producto de reacción (25µl) se le agrego un volumen igual de Membrane Binding Solution (MBS), posteriormente se vació todo el contenido en una SV Minicolumn con su respectivo tubo de colecta y se dejó incubar a temperatura ambiente por 1min, luego

se centrifugó a 16,000 xg (13,000rpm) a 4°C durante 1min, se decantó el tubo de colecta y se la adicionó 700 µl de Membrane Wash Solution (MWS), y se centrifugó nuevamente por 1 min. Se descartó el tubo de colecta y se volvió a repetir el último paso agregando solo 500µl de MWS y se volvió a centrifugar por 1min. Para eluir el DNA la SV Minicolumn, se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y estéril, se agregó 50µl de Nuclease-Free Water pre-calentada a 37°C, y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 min, finalmente se centrifugó durante 3min. Se almacenó a -20°C.

8.7 Digestión de DNA utilizando enzimas de restricción

Para la digestión del DNA purificado y precipitado de FGFR2 se utilizaron las enzimas de restricción HincII (HindII) (Thermo Scientific, ER0491) y Eco88I (AvaI) (Thermo Scientific, ER0381). Se utilizó al plásmido pCDNA3.1+ (5428 pb) (Figura 7) para probar el corte de las enzimas; la enzima HincII tiene 3 sitios de cortes en el plásmido, generando 3 fragmentos: 3009 pb, 2185 pb y 234 pb, mientras que la enzima AvaI tiene dos sitios de corte, generando 2 fragmentos: 3352 pb y 2076 pb. La digestión se realizó por un periodo de 2h 30min a 37°C.

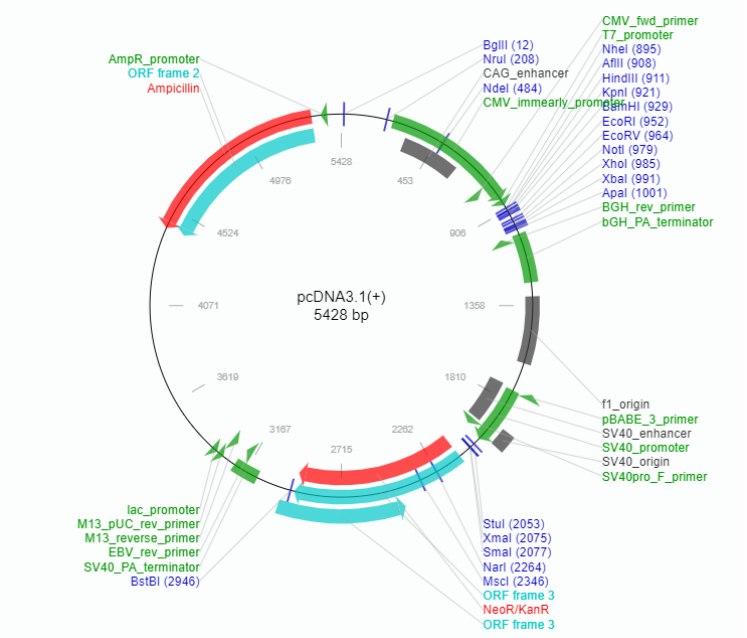


Figura 7. Mapa circular del plasmido pCDNA 3.1 (+). El mapa muestra los sitios de corte que tiene para diversas enzimas. Obtenido de la página de Addgene.

8.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5. Se usó la prueba *t de Student* con una confianza del 95%, y con valor de $p < 0.05$. Los resultados son de tres ensayos independientes.

9. RESULTADOS

9.1 La línea celular HaCaT-E5 expresa el transcrito de E5 de VPH16

Para comprobar que el gen E5 del VPH16 se expresaba en la línea celular HaCaT-E5, se realizó una RT-PCR usando oligonucleótidos específicos para amplificar el transcrito de E5 (Tabla 1). La banda observada en el gel de agarosa en un tamaño de 303 pb indica el amplicón esperado de E5 de VPH16 solo en los carriles correspondientes a la línea celular HaCaT-E5 (Figura 8). Como control positivo se utilizó al gen constitutivo B2-microglobulina, que tiene un tamaño de 101 pb.

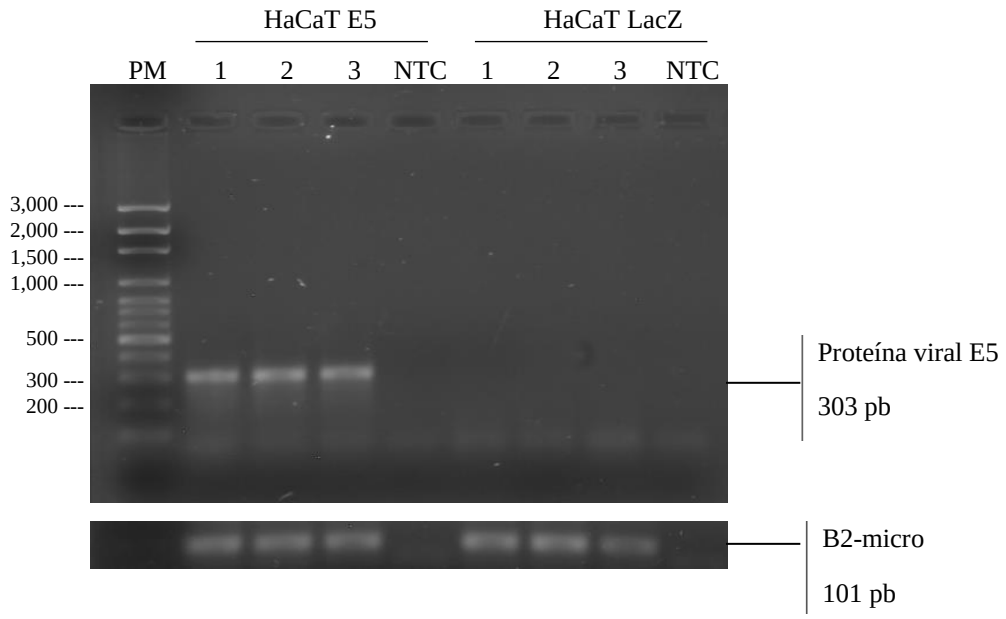


Figura 8. RT-PCR para amplificar del gen E5 del VPH 16. se realizó una PCR a cDNA proveniente de tres cajas independientes (1, 2 y 3) en ambas líneas celulares; control negativo (NTC).

9.2 Las dos líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5 presentan la variante de *splicing* epitelial de FGFR2 (FGFR2b)

Debido a antecedentes recientes que indican que E5 de VPH16 participa en la regulación de las isoformas de FGFR2, se decidió analizar la expresión de ambas isoformas, epitelial y

mesenquimal en ambas líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5. Para ello se realizó una restricción utilizando las enzimas HincII y AvaI (Thermo Scientific) similar a lo reportado por Warzecha y colaboradores (2009a).

Para comprobar si las enzimas cortaban eficientemente, se utilizó como control el plásmido pcDNA3.1+ para hacer una digestión con la enzima HincII; la enzima tiene tres sitios de corte en el plásmido, generando 3 fragmentos de diferentes tamaños como se observa en la figura 9.

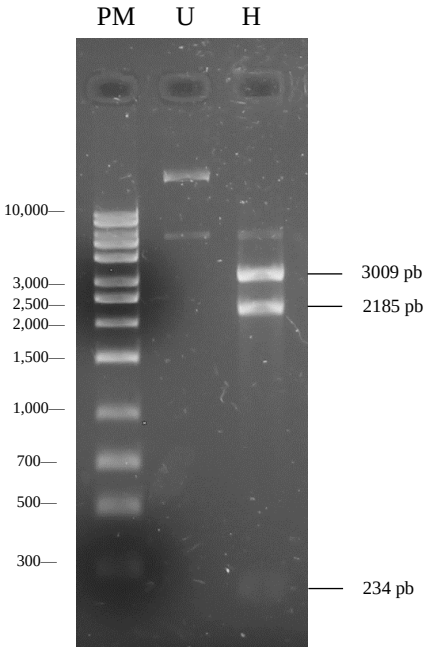


Figura 9. **Restricción de pcDNA3.1+ utilizando la enzima HincII.** PM: marcador de peso molecular; U: DNA no cortado; H: enzima HincII.

Una vez comprobado el corte de la enzima, se procedió a amplificar a FGFR2 a través de una PCR en punto final en ambas líneas celulares utilizando el par de oligonucleótidos mostrados en la tabla 1. La figura 10A muestra el tamaño del amplicón de FGFR2 de 300 pb en ambas líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5. El producto de reacción restante (20µl) de FGFR2 fue purificado y precipitado utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, A9281), como se muestra en la figura 10B.

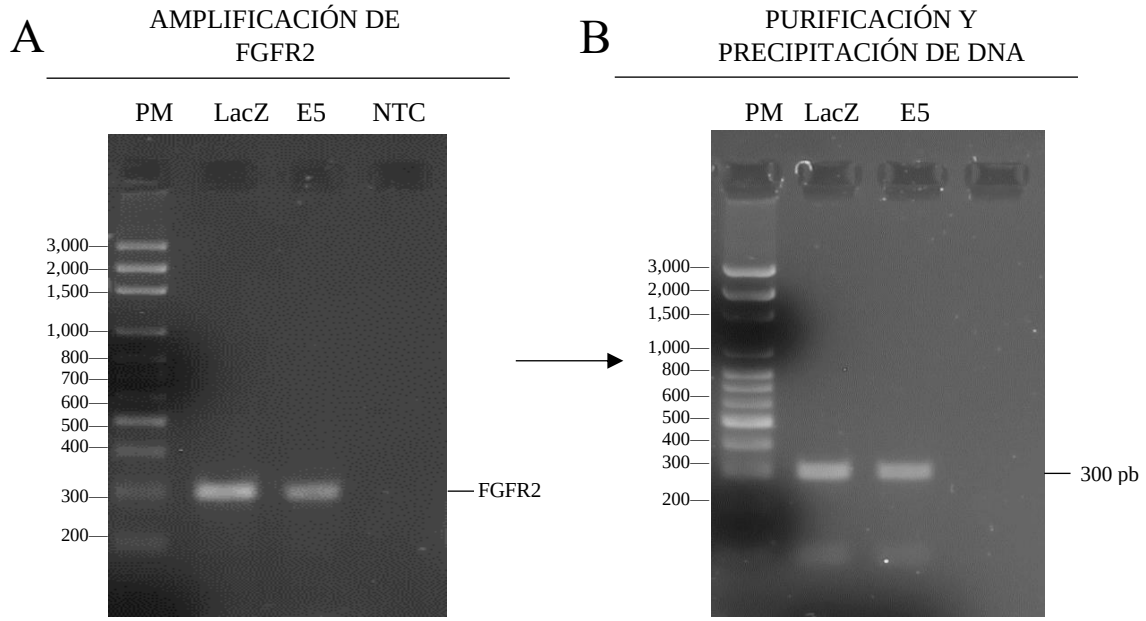


Figura 10. Amplificación, purificación y precipitación de FGFR2. A) PCR en punto final para amplificar FGFR2 en ambas líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5; B) Purificación y precipitación de DNA a partir de productos de PCR de FGFR2.

Para realizar la restricción de FGFR2 en ambas líneas celulares, se tomó el DNA purificado y precipitado previamente a partir del producto de PCR obtenido, para realizar la digestión, utilizando ambas enzimas, HincII y AvaI. HincII tiene 2 sitios de corte, generando 3 fragmentos, e indica que está presente la isoforma con características mesenquimales (FGFR2c). Por otro lado, AvaI tiene 1 sitio de corte, generando 2 fragmentos que indican la presencia de la isoforma con características epiteliales (FGFR2b). En ambas líneas celulares se mostró el corte con la enzima AvaI (A), pero no el corte con la enzima HincII (H) (Figura 11). Ambas líneas celulares presentaron la isoforma epitelial, sin embargo, no la mesenquimal. En este caso, la presencia de E5 de VPH16 no generó una diferencia en la expresión de las isoformas, ya que presenta el mismo patrón que la línea celular control (LacZ).

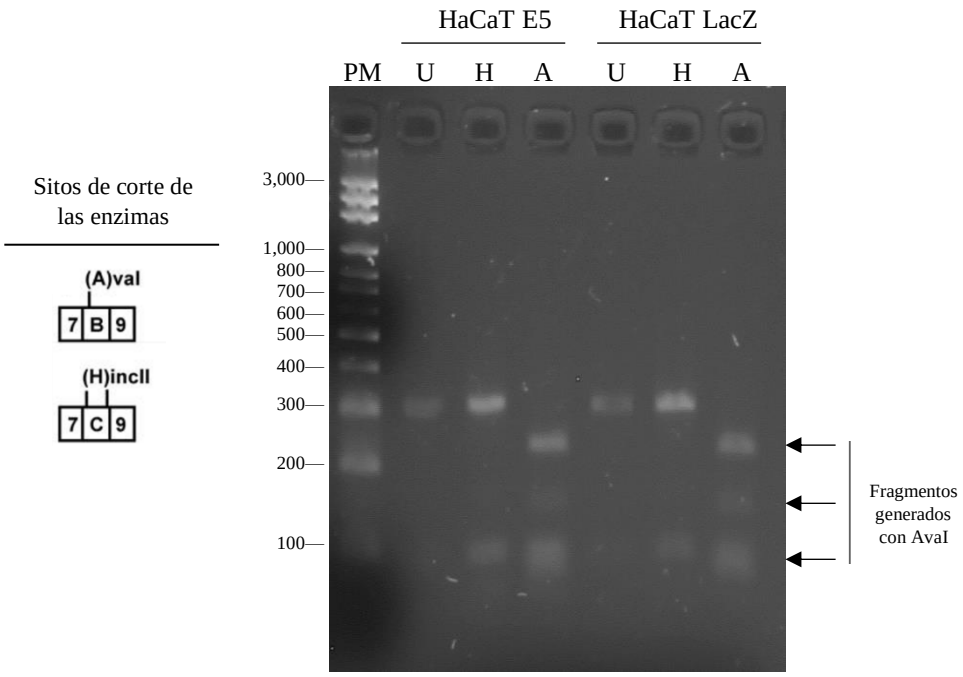


Figura 11. Restricción de FGFR2 en las líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5. U: DNA no cortado; H: corte con la enzima HincII; A: corte con la enzima AvaI.

Al realizar una cuantificación relativa de los amplicones, en base a su migración electroforética en el gel de agarosa utilizando el software ImageJ, se mostraron cambios en el corte con la enzima AvaI en presencia de la proteína viral E5, sin embargo, no hay cambios en el corte con la enzima HincII corroborando lo observado en el gel. El análisis estadístico no mostro diferencias significativas en el corte con AvaI (Figura 12).

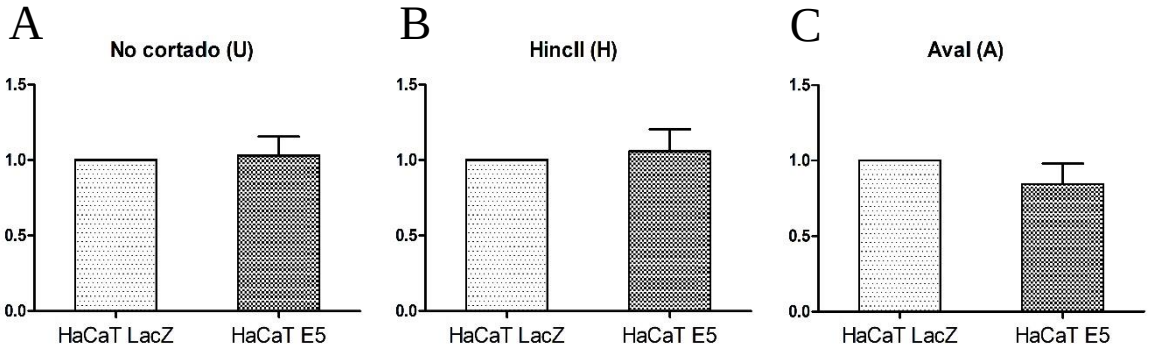


Figura 12. Cuantificación de la restricción de FGFR2. A) Cuantificación de bandas de DNA no cortado (U); Cuantificación de bandas de DNA cortado con la enzima HincII; C) Cuantificación de bandas de DNA cortado con la enzima AvaI. No. replicas: 3

Debido al efecto mostrado en la cuantificación relativa del corte con la enzima AvaI, para dilucidar si la presencia de E5 de VPH16 tenía algún efecto regulatorio hacia la isoforma epitelial, se realizó una RT-qPCR usando oligonucleótidos específicos que flanquean los exones correspondientes a la isoforma epitelial de FGFR2 (ver tabla 1). Los resultados mostraron que la presencia de E5 de VPH16 provoca una disminución en la expresión de la isoforma epitelial, indicando que E5 modula su expresión (Figura 13).

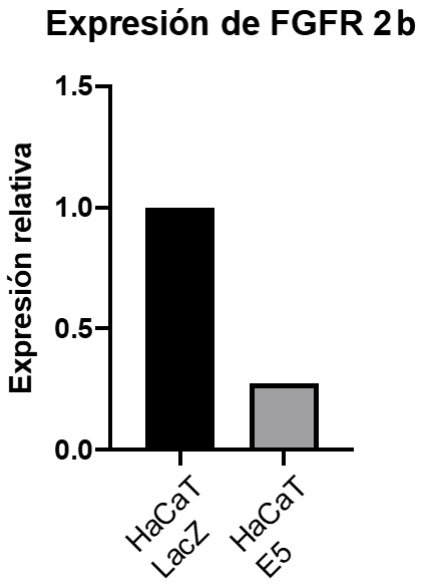


Figura 13. RT-qPCR para la isoforma epitelial de FGFR2. La expresión de la isoforma fue evaluada en ambas líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5. Se normalizo utilizando al gen constitutivo B2-microglobulina. No. replica: 1

9.3 Las líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5 expresan las variantes de *splicing* epitelial y mesenquimal del gen ENAH

Otro gen que al igual que FGFR2 comúnmente sufre cambios durante la EMT, es ENAH. El *splicing* alternativo de este gen se ve afectado, pasando de la expresión de la isoforma epitelial (ENAH11a), a la mesenquimal (ENAHΔ6). Con el fin de conocer si la presencia de E5 de VPH16 influye en el *splicing* de dichas isoformas, se realizó una RT-PCR usando oligonucleótidos específicos para amplificar ambas isoformas. La figura 14 muestra la presencia de las dos isoformas en ambas líneas celulares; la isoforma ENAH11a tiene un tamaño de 281 pb, mientras la isoforma ENAHΔ6 tiene un tamaño de 218 pb.

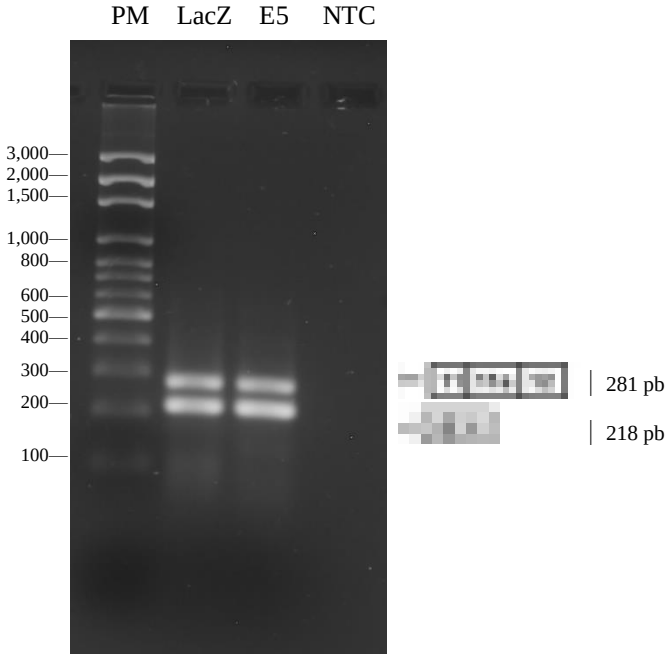


Figura 14. Isoforma epitelial y mesenquimal del gen ENAH en la línea celular HaCaT-LacZ y HaCaT-E5. PM: marcador de peso molecular; NTC: control negativo.

Al hacer la cuantificación relativa de los amplicones en la electroforesis en gel de agarosa usando el software ImageJ, se aprecia un cambio en la expresión de ambas isoformas en presencia de E5 de VPH16. La isoforma ENAH11a disminuye, mientras que la isoforma

ENAHΔ6 aumenta (Figura 15). Aunque el análisis estadístico no indicó significancia, sin embargo, estos resultados son una primera aproximación para conocer si E5 es capaz de hacer un cambio en la expresión de ambas isoformas.

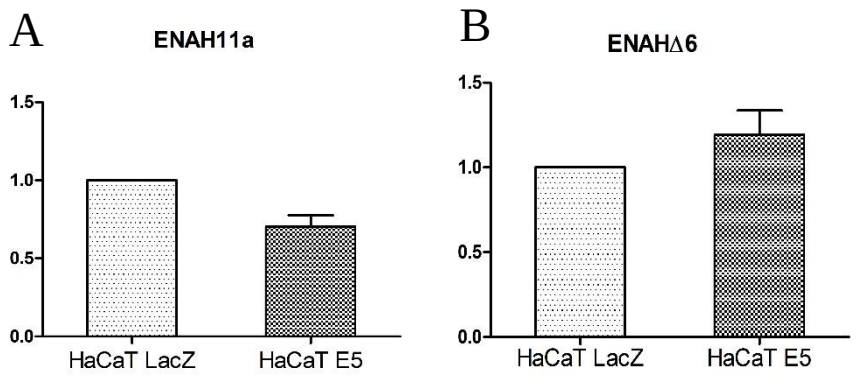


Figura 15. Cuantificación del gel para las isoformas de ENAH. A) Cuantificación de la isoforma epitelial, ENAH11a; B) Cuantificación de la isoforma mesenquimal, ENAHΔ6.

De acuerdo a lo observado en la figura 15A, donde los resultados indican que la presencia de E5 tiene un efecto negativo en la expresión de la isoforma ENAH11a, se centró el foco de atención en esta isoforma. Se realizó una RT-qPCR usando oligonucleótidos específicos para amplificar solo la isoforma epitelial (ver tabla 1). La expresión relativa de ENAH11a es menor en células con E5 (Figura 16), lo que sugiere una acción represora por parte de la proteína viral; cabe señalar que solo fue una réplica experimental, por lo que sería necesario realizar varias repeticiones del ensayo para confirmarlo.

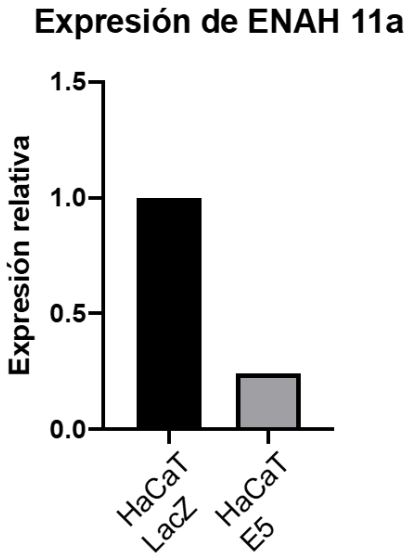


Figura 16. RT-qPCR para la isoforma epitelial de ENAH. La expresión se evaluó en ambas líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5. Se normalizo utilizando al gen constitutivo B2-microglobulina. No. Replicas:1

9.4 Las líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E5 expresan las variantes de *splicing* epitelial y mesenquimal del gen CD44

CD44 es otro gen que también es comúnmente afectado durante la EMT. Al igual que ENAH y FGFR2, se quiere conocer si E5 de VPH16 modula la expresión de sus isoformas epiteliales y su isoforma mesenquimal. Para ello se realizó una RT-PCR usando oligonucleótidos que amplifiquen las isoformas epiteliales (presentan exones variables: v6-10, v8-10, v10) y la isoforma mesenquimal (presenta solo exones constitutivos: 5-15). En el gel de agarosa se puede observar que en las dos líneas celulares están presentes los amplicones que corresponden a ambos tipos de isoformas; sin embargo, se observan cambios en la expresión de las isoformas epiteliales, ya que la expresión de la isoforma v8-10 y v10 se encuentra disminuida en presencia de E5, mientras que las isoformas v6-10 y 5-15 no reflejan algún cambio en ambas líneas celulares (Figura 17).

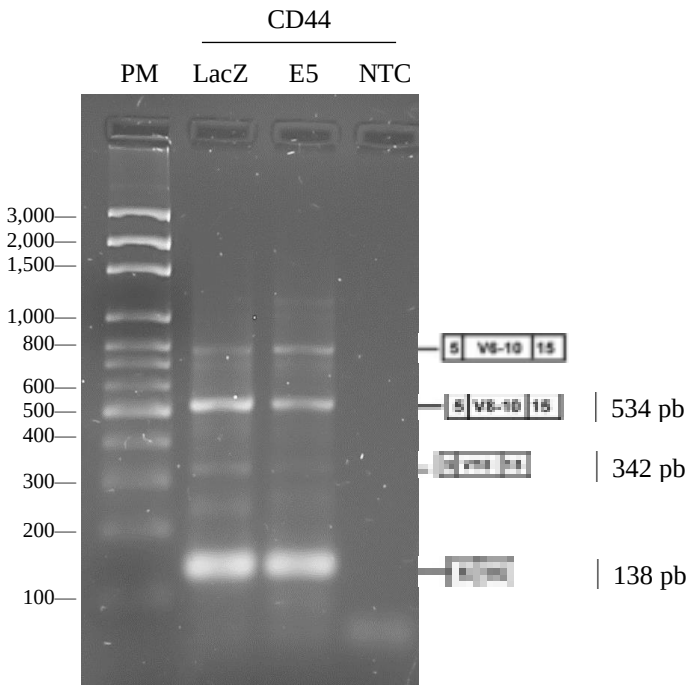


Figura 17. Isoformas de CD44 en la línea celular HaCaT-LacZ y HaCaT-E5. Diferentes isoformas epiteliales y la mesenquimal de CD44. PM: marcador de peso molecular; NTC: control negativo.

Al hacer una cuantificación relativa de las isoformas usando ImageJ, los resultados muestran una disminución de ambas isoformas epiteliales v6-10 y v8-10 en presencia de E5; sin embargo, solo la disminución de la isoforma v8-10 mostró significancia estadística. Por otro lado, la isoforma mesenquimal 5-15 mostro un incremento, pero al igual que en el caso de la isoforma v6-10, el cambio no fue estadísticamente significativo (Figura 18). La acción que ejerce E5, indica una regulación negativa sobre las isoformas epiteliales, sin embargo, falta analizar detalladamente cada una de ellas para conocer a fondo la acción de E5.

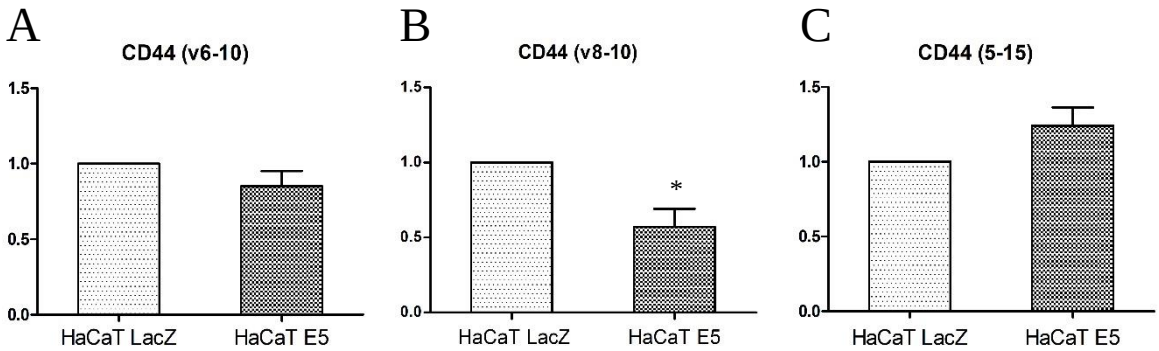


Figura 18. Cuantificación relativa de las isoformas de CD44. A) Cuantificación relativa de la isoforma epitelial v6-10; B) Cuantificación relativa de la isoforma epitelial v8-10; C) Cuantificación relativa de la isoforma mesenquimal 5-15.

10. DISCUSIÓN

La activación de un programa EMT en células cancerosas, implica cambios fenotípicos que involucran una reprogramación celular, ocurren cambios profundos que van desde la activación transcripcional de genes que favorecen propiedades de naturaleza agresiva hasta la transformación completa de una célula epitelial a una mesenquimal (Pradella *et. al.*, 2017). La desregulación del *splicing* alternativo es un proceso fundamental en el cáncer y proporciona una fuente potencialmente rica de nuevos objetivos terapéuticos y biomarcadores para la progresión de la enfermedad (Urbanski *et. al.*, 2018).

La desregulación del *splicing* alternativo se ha observado en diferentes genes que están involucrados en la EMT, esta regulación favorece el cambio de isoformas de una epitelial a una mesenquimal, RBPs como las ESRPs son antagonistas de este cambio de isoformas por lo que son reguladas negativamente durante el cáncer. Recientemente se reportó que E5 de VPH16 participa en el cambio de isoformas de FGFR2 (Ranieri *et. al.*, 2015), por lo que en el presente estudio se analizó el cambio de isoformas de otros dos genes, ENAH y CD44, que también están regulados durante la EMT, en presencia de E5 de VPH16.

El receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 2 está involucrado en diferentes procesos celulares como proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular (Babina y Turner, 2017). Una desregulación o mutaciones con pérdida de función desequilibran la homeostasis epitelial-estromal, estos cambios son característicos en un proceso tumorigénico, las dos isoformas conocidas FGFR2b y FGFR2c tienen funciones antagónicas, y se expresan de forma diferente (Ranieri *et. al.*, 2016). El *splicing* alternativo de FGFR2 está altamente regulado, involucra diferentes RBP siendo las ESRPs las principales moduladoras, al ser específicas de tejido epitelial, favorecen la expresión de la isoforma epitelial.

En el presente estudio se evaluó la expresión de ambas isoformas de FGFR2 en presencia de E5 de VPH16 con el fin de conocer si la proteína viral tenía algún efecto en su expresión; a

partir de una restricción utilizando dos enzimas específicas que cortan cada una de las isoformas, AvaI para la isoforma epitelial y HincII para la isoforma mesenquimal, se observó la presencia de la isoforma epitelial, sin embargo, no se observó la presencia de la isoforma mesenquimal. La cuantificación relativa realizada refleja lo observado en el gel, estos resultados indican que no hubo sitios de corte para la enzima HincII. Es bien conocido que la expresión de la isoforma mesenquimal se da con frecuencia en un fenotipo mesenquimal y su regulación positiva se da en eventos como la EMT; es probable que E5 de VPH por sí sola no logre impulsar la expresión de esta isoforma en las células HaCaT, y es posible que se requiera de otros factores que en conjunto impulsen su expresión.

Sin embargo, debido a que anteriormente un estudio reportó que E5 puede regular negativamente la expresión de la isoforma epitelial modulando a las ESRPs, proteínas que participan directamente en el *splicing* alternativo del gen (Ranieri *et. al.*, 2015), se hizo énfasis en el análisis de esta isoforma. Al evaluar la expresión relativa de FGFR2b, los resultados nos sugieren una regulación negativa por parte de la proteína viral, sin embargo, se requiere un número mayor de replicas que confirmen este comportamiento. Warzecha y colaboradores (2009a), reportan similares observaciones respecto a la baja expresión de la isoforma epitelial, ya que en su trabajo evaluaron la expresión de ambas isoformas en células sin expresión de las ESRPs, mostrando una baja inclusión de la isoforma epitelial y un aumento en la expresión de la isoforma mesenquimal.

El análisis de la expresión de ambas isoformas de FGFR2 mediante la estrategia mostrada aquí (a través de la generación de un amplicon correspondiente a FGFR2 y su restricción usando las mismas enzimas HincII y AvaI), se ha utilizado en diversos estudios que han permitido darle validez a su especificidad. Siguiendo esta estrategia, un estudio realizado por Cha y colaboradores (2008) evaluó en diferentes líneas celulares de cáncer de mama no invasivo (BT474, ZR-75-1, MCF-7, T-47D, MDA-MB-468, SK-BR-3) e invasivo (Hs578T, BT549, MDA-MB-231), la expresión de una isoforma u otra. La presencia de la isoforma epitelial se observó en células no invasivas mientras que en las células invasivas se detectó la isoforma mesenquimal. La activación del cambio de isoformas generalmente se da en eventos como la EMT o en la progresión del cáncer y el mismo estudio lo señala al evaluar la expresión de los marcadores E-cadherina, N-cadherina y vimentina en todas las líneas

celulares. Esto nos da una idea del comportamiento observado en nuestros resultados, en donde las células HaCaT usadas en el estudio no fueron sometidas a ningún estímulo que favoreciera la expresión de la isoforma FGFR2c; sin embargo, el efecto observado por parte de E5 nos da una idea sobre su papel regulatorio.

Otro gen que es regulado durante un programa de EMT es el gen ENAH, el cual pertenece a un grupo de proteínas que regulan el citoesqueleto de actina, modulan la adhesión celular y la migración. De este gen, se han identificado diferentes isoformas derivadas del *splicing* alternativo, que se expresan en tejido y tipos celulares específicos; la variante ENAH 11a es asociada al epitelio, mientras que la variante ENAHΔ6 se asocia con un fenotipo mesenquimal (Di Modugno *et. al.*, 2012). En el presente estudio se analizó la expresión de ambas isoformas en las células HaCaT en presencia de E5 de VPH16; nuestros resultados de cuantificación relativa indicaron una disminución en la expresión de la isoforma epitelial y un aumento en la isoforma mesenquimal. A pesar de que estos cambios no son significativos, nos dan un primer acercamiento sobre el entendimiento del comportamiento de E5. Este cambio, la expresión de las isoformas también lo reporta Warzecha y colaboradores (2009a), en células epiteliales de próstata (PNT2) con silenciamiento de ambas ESRPs, en donde la expresión de la isoforma epitelial se ve disminuida, mientras que la mesenquimal se favorece.

Nuestros resultados sobre la expresión relativa de la isoforma epitelial en las células HaCaT con E5, nos indican una regulación negativa por parte de esta proteína viral. Resultados similares reporta Ahuja y colaboradores (2020), en donde la expresión relativa de ENAH 11a disminuye cuando se realiza el silenciamiento de ESRP1, que se ha reportado como blanco de E5 de VPH16. Di Modugno y colaboradores (2012) reportan que la presencia de la ESRP1 favorece la isoforma ENAH11a y bloquea la expresión de la isoforma ENAHΔ6, indicando que tanto el transcrito como la proteína están siendo regulados negativamente.

Se ha reportado que una baja expresión de la isoforma ENAH11a en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), mejora la migración celular (Brian *et. al.*, 2014). Cuando hay una expresión ectópica de esta isoforma en células de cáncer de mama de linaje epitelial (MCF7) en donde generalmente no se expresa la isoforma, se favorece la formación de tumores con una morfología similar a la del epitelio, actuando de manera antagónica a las

características ya conocidas en el cáncer. En tejidos normales ENAH11a se encuentra en las uniones estrechas y adherentes, cuando su expresión es perturbada, la distribución de E-cadherina en las uniones célula-célula interrumpe la morfología epitelial normal (Balsamo *et. al.*, 2016).

Diversos estudios afirman la importancia que tiene la isoforma epitelial de ENAH al bloquear características que favorecen la progresión del cáncer, la función que se observa de E5 de VPH16 como represor de dicha isoforma, nos indica que puede estar favoreciendo condiciones de un fenotipo maligno. La expresión diferencial de isoformas podría constituir un marcador potencial de agresividad en la etapa temprana (Brian *et. al.*, 2014); sin embargo, aún falta más evidencia que respalde esta acción de E5.

El gen CD44 también es un blanco a ser regulado durante la EMT. CD44 es una glicoproteína transmembranal que actúa en la división, supervivencia y adhesión celular. Al igual que los genes anteriores el *splicing* alternativo se regula de manera diferencial. Esta glicoproteína presenta diferentes isoformas epiteliales, que contienen los exones variables 6-10 y generan las isoformas CD44v. La eliminación de los exones variables y la presencia de los exones constitutivos 1-5 y 16-20 generan la isoforma estándar o mesenquimal CD44s (Urbanski *et. al.*, 2018). En el presente estudio se analizaron la expresión de diferentes isoformas epiteliales, así como la isoforma mesenquimal en células que expresan constitutivamente a E5 de VPH16. La expresión diferencial observada en las isoformas epiteliales v8-10 y v10 en presencia de E5, y que fue confirmada en la cuantificación relativa, refleja la regulación negativa por parte de la proteína viral. La regulación significativa que se observó en la isoforma v8-10 nos demuestra la participación de E5 en el *splicing* alternativo; sin embargo, no hubo cambios significativos para la isoforma v6-10 y la isoforma mesenquimal 5-15. Como se mencionó anteriormente, las ESRPs regulan el *splicing* alternativo de ciertos genes incluido CD44; al estar presente favorece la expresión de isoformas epiteliales, mientras que al estar ausente se expresa la isoforma estándar (Brown *et. al.*, 2011). Nuestros resultados sugieren de E5 actúa reprimiendo la expresión de las isoformas epiteliales a través de modular a esta RBP; sin embargo, en nuestro modelo de estudio falta confirmarlo.

La expresión de las isoformas de CD44v se ha observado tanto en tejidos normales como en tumores, reportándose su presencia en tumores gástricos, ováricos, de colon y de próstata.

Por ejemplo, la expresión de CD44 v8-10 se ha visto en modelos de cáncer gástrico y en tumores ováricos; el papel que juegan estas isoformas en la progresión tumoral sigue siendo un tema de discusión (Urbanski *et. al.*, 2018). La expresión de la isoforma CD44s está asociada predominantemente a fenotipos mesenquimales, y su expresión se ha reportado en tumores de mama y en fenotipos de células cancerosas, mientras que las isoformas CD44v se asocian negativamente con estos fenotipos y se asocian positivamente con la proliferación celular (Zhang *et. al.*, 2019).

Las observaciones aparentemente contradictorias para las isoformas de CD44v resaltan la naturaleza compleja de CD44, sin embargo, en un programa EMT la expresión de ambos tipos de isoformas difiere. La isoforma CD44s se expresa claramente mientras que las isoformas CD44v no lo hacen. La expresión de CD44 en un evento como la EMT durante la progresión del cáncer, favorece un fenotipo mesenquimal confiriendo ventajas a la célula para generar metástasis. En nuestro trabajo la regulación negativa observada por parte de E5 de VPH16 nos da evidencia de una participación en los cambios iniciales de un fenotipo maligno. A pesar de que no hubo un aumento significativo en la isoforma mesenquimal, la cuantificación relativa nos aproxima a indagar con más detalle en el papel que E5 tiene sobre la expresión de ambos tipos de isoformas.

11. CONCLUSION

La expresión de E5 de VPH 16 solo se observó en la línea celular HaCaT E5.

La expresión de las isoformas epitelial y mesenquimal de tres genes FGFR2, ENAH y CD44, son alterados en un programa de EMT, en células HaCaT que expresan a E5 de VPH16.

E5 de VH16 mostró un efecto negativo en la expresión de la isoforma epitelial (FGFR2b), mientras que no favoreció la expresión de la isoforma mesenquimal.

E5 de VPH16 indujo una expresión diferente en ambas isoformas de ENAH, favoreciendo la expresión de la isoforma mesenquimal (ENAHΔ6) y regulando la expresión de la isoforma epitelial (ENAH 11a).

La expresión diferencial observada en dos isoformas epiteliales de CD44 (v8-10 y v10) en presencian de E5 de VPH16, nos sugiere una regulación negativa por parte de la proteína viral.

El papel atribuido de E5 en la EMT es reciente, la función de E5 en el cambio de isoformas en genes involucrados en la EMT incluidos dos de los tres genes aquí evaluados es desconocida, por lo que los resultados obtenidos en el presente trabajo son una primera aproximación en el estudio del efecto regulatorio que E5 ejerce sobre la expresión de las isoformas.

12. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos se sugiere:

Evaluar la expresión de ambos tipos de isoformas epiteliales y mesenquimales de los tres genes evaluados, por qPCR en células HaCaT que contienen E5 de VPH16 para confirmar el efecto regulatorio observado por parte de E5

Evaluar la expresión a nivel de RNAm y de proteína de las ESRPs en presencia de E5 de VPH16, para confirmar la regulación negativa que tiene la proteína viral sobre ellas.

Inducir la EMT en las células HaCaT que presentan E5 de VPH16 y evaluar la expresión de ambos tipos de isoformas de los tres genes evaluados y biomarcadores importantes en la EMT, como E-Cadherina y Vimentina.

13. BIBLIOGRAFÍA

Ahuja, N., Ashok, C., Natua, S., Pant, D., Cherian, A., Pandkar, M. R., Yadav, P., Vishnu, N., Mishra, J., Samaiya, A., & Shukla, S. (2020). Hypoxia-induced TGF-β-RBFOX2-ESRP1 axis regulates human MENA alternative splicing and promotes EMT in breast cancer. *NAR cancer*, *2*(3), zcaa021. https://doi.org/10.1093/narcan/zcaa021

Aparicio, L. A., Abella, V., Valladares, M., & Figueroa, A. (2013). Posttranscriptional regulation by RNA-binding proteins during epithelial-to-mesenchymal transition. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *70*(23), 4463–4477. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1379-0

Babina, I., Turner, N. (2017). Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer. *Nat Rev Cancer* 17, 318–332. https://doi.org/10.1038/nrc.2017.8

Balsamo, M., Mondal, C., Carmona, G., McClain, L. M., Riquelme, D. N., Tadros, J., Ma, D., Vasile, E., Condeelis, J. S., Lauffenburger, D. A., & Gertler, F. B. (2016). The alternatively-included 11a sequence modifies the effects of Mena on actin cytoskeletal organization and cell behavior. *Scientific reports*, *6*, 35298. https://doi.org/10.1038/srep35298

Baralle, FE y Giudice, J. (2017). Empalme alternativo como regulador del desarrollo y la identidad de los tejidos. *Reseñas de la naturaleza. Biología celular molecular* , *18* (7), 437–451. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.27

Black, A. J., Gamarra, J. R., & Giudice, J. (2019). More than a messenger: Alternative splicing as a therapeutic target. *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms*, *1862*(11-12), 194395. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2019.06.006

Bonnal, S.C., López-Oreja, I. & Valcárcel, J. (2020). Roles and mechanisms of alternative splicing in cancer-implications for care. *Nat Rev Clin Oncol* 17, 457–474. https://doi.org/10.1038/s41571-020-0350-x

Bria, E., Di Modugno, F., Sperduti, I., Iapicca, P., Visca, P., Alessandrini, G., Antoniani, B., Pilotto, S., Ludovini, V., Vannucci, J., Bellezza, G., Sidoni, A., Tortora, G., Radisky, D. C., Crinò, L., Cognetti, F., Facciolo, F., Mottolese, M., Milella, M., & Nisticò, P. (2014). Prognostic impact of alternative splicing-derived hMENA isoforms in resected, node-negative, non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*, *5*(22), 11054–11063. https://doi.org/10.18632/oncotarget.2609

Brown, R. L., Reinke, L. M., Damerow, M. S., Perez, D., Chodosh, L. A., Yang, J., & Cheng, C. (2011). CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *The Journal of clinical investigation*, 121(3), 1064–1074. https://doi.org/10.1172/JCI44540

Burd EM, Dean CL. (2016). Human papillomavirus. *Microbiol Spectrum* 4(4):DMIH2-0001-2015. doi:10.1128/microbiolspec

Cha, J. Y., Lambert, Q. T., Reuther, G. W., & Der, C. J. (2008). Involvement of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Isoform Switching in Mammary Oncogenesis. *American Association for Cancer Research*, *6*(3), 435-445. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0187

Cheng, Y. M., Chou, C. Y., Hsu, Y. C., Chen, M. J., & Wing, L. Y. (2012). The role of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncoproteins in cervical epithelial-mesenchymal transition and carcinogenesis. Oncology letters, 3(3), 667–671. https://doi.org/10.3892/ol.2011.512

De la Fuente-Villarreal D,Guzmán-López S, Barboza-Quintana O, González-Ramírez R.A. (2010). Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina Universitaria. 12(49):231-238*

Di Modugno, F., Iapicca, P., Boudreau, A., Mottolese, M., Terrenato, I., Perracchio, L., Carstens, R. P., Santoni, A., Bissell, M. J., & Nisticò, P. (2012). Splicing program of human MENA produces a previously undescribed isoform associated with invasive, mesenchymal-like breast tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

of the United States of America, *109*(47), 19280–19285. https://doi.org/10.1073/pnas.1214394109

Dongre, A., Weinberg, R.A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 69–84. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4

Estêvão, D., Rios, N., Gil, R. M., Medeiros, R. (2019). Hallmarks of VPH carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862 (2), 153-162. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2019.01.001.

Global Cancer Observatory. (2018). *Cervical cancer in Mexico*. International Agency for Research on Cancer. https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf

Göttgens, E.-L., Span, P.N. y Zegers, M.M. (2016). Roles and Regulation of Epithelial Splicing Regulatory Proteins 1 and 2 in Epithelial–Mesenchymal Transition. *International Reviewof Celland Molecular Biology*, 327.ISSN 1937-6448. http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.06.003

Graham, S. V. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci (Lond)* 131 (17): 2201–2221. doi: https://doi.org/10.1042/CS20160786

Hochmann, J., Parietti, F., Martínez, J., Lopez, A. C, Carreño, M., Quijano, C., Boccardo, E., Sichero, L., Möller, M. N, Mirazo, S., & Arbiza, J. (2020). Human papillomavirus type 18 E5 oncoprotein cooperates with E6 and E7 in promoting cell viability and invasion and in modulating the cellular redox state. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115, e190405..https://dx.doi.org/10.1590/0074-02760190405

Johnson, C. A., James, D., Marzan, A., & Armaos, M. (2019). Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. *Seminars in oncology nursing*, 35(2), 166–174. https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.003

Kim, M-K., Kim, H. S., Kim, S-H., Oh, J-M., Han J. Y., Lim, J. M., Juhnn, Y-S., Song Y-S. (2010). Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. *Biochemical Pharmacology,* 80 (12), 1930-1935. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.07.013

Maufort, J. P., Shai, A., Pitot, H. C., & Lambert, P. F. (2010). A role for VPH16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer research*, 70(7), 2924–2931. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3436

Okunade KS (2020). Virus del papiloma humano y cáncer cervical. *Revista de obstetricia y ginecología: la revista del Instituto de Obstetricia y Ginecología* , *40* (5), 602–608. https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1634030

Pinatti, L. M., Walline, H. M., & Carey, T. E. (2018). Human Papillomavirus Genome Integration and Head and Neck Cancer. *Journal of dental research*, *97*(6), 691–700. https://doi.org/10.1177/0022034517744213

Pradella, D., Naro, C., Sette, C., & Ghigna, C. (2017). EMT and stemness: flexible processes tuned by alternative splicing in development and cancer progression. *Molecular cancer*, *16*(1), 8. https://doi.org/10.1186/s12943-016-0579-2

Qureshi, R., Arora, Himanshu., & Rizvi, M.A. (2015). EMT in cervical cancer: Its role in tumour progression and response to therapy. *Cancer Letters,* 356: 321-331. http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.021

Ran, J., Lin, D-L., Wu, R-F., Chen, Q-H., Huang, H-P., Qiu, N-X., Quan, S. (2015). ZEB1 promotes epithelial–mesenchymal transition in cervical cancer metastasis. *Fertility and Sterility*, 103 (6), 1606-1614. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.03.016

Ranieri, D., Belleudi, F., Magenta, A. and Torrisi, M.R. (2015), VPH16 E5 expression induces switching from FGFR2b to FGFR2c and epithelial-mesenchymal transition. Int. J. Cancer, 137: 61-72. doi:10.1002/ijc.29373

Ranieri, D., Rosato, B., Nanni, M., Magenta, A., Belleudi, F., & Torrisi, M. R. (2016). Expression of the FGFR2 mesenchymal splicing variant in epithelial cells drives

epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*, 7(5), 5440–5460. https://doi.org/10.18632/oncotarget.6706

Reveles-Espinoza, A. M. (2018). 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. [tesis de doctorado] Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Stanley, M.A., Pett, M.R., Coleman, N. (2007). VPH: de infección a cáncer. *Biochem Soc Trans.* 35 (6): 1456–1460. doi: https://doi.org/10.1042/BST0351456

Ule, J. and Blencowe, B J. (2019). Alternative Splicing Regulatory Networks: Functions, Mechanisms, and Evolution. *Molecular Cell*, 76(2), 329-345.https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.017

Urbanski, L. M., Leclair, N., & Anczuków, O. (2018). Alternative-splicing defects in cancer: Splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, *9*(4), e1476. https://doi.org/10.1002/wrna.1476

Venuti, A., Paolini, F., Nasir, L., Corteggio, A., Roperto, S., Campo, M. S., & Borzacchiello, G. (2011). Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Molecular cancer*, 10, 140. https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-140

Warzecha, C. C., Sato, T. K., Nabet, B., Hogenesch, J. B., & Carstens, R. P. (2009a). ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing. *Molecular cell*, *33*(5), 591–601. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.025

Warzecha, C. C., Shen, S., Xing, Y., & Carstens, R. P. (2009b). The epithelial splicing factors ESRP1 and ESRP2 positively and negatively regulate diverse types of alternative splicing events. *RNA biology*, *6*(5), 546–562. https://doi.org/10.4161/rna.6.5.9606

World Health Organization. (2019). Human papillomavirus (VPH) and cervical cancer. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(VPH)-and-cervical-cancer

Yang, J., Antin, P., Berx, G. et al. (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol 21, 341–352. https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9

Zeisberg, M. & Neilson, E.G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*; 119(6):1429-1437. https://doi.org/10.1172/JCI36183.

Zhang, H., Brown, R. L., Wei, Y., Zhao, P., Liu, S., Liu, X., Deng, Y., Hu, X., Zhang, J., Gao, X. D., Kang, Y., Mercurio, A. M., Goel, H. L., & Cheng, C. (2019). CD44 splice isoform switching determines breast cancer stem cell state. *Genes & development*, *33*(3-4), 166–179. https://doi.org/10.1101/gad.319889.118

Zhang, Y., & Weinberg, R. A. (2018). Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front Med*, 12 (4): 361-373. doi:10.1007/s11684-018-0656-6.

14. APENDICE

Buffer de Corrida para geles de agarosa: Tris acetate (TAE)

TAE	**50X**
Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA al 0.5 M (pH 8.0)	100 ml

Buffer de carga para DNA en geles de agarosa

Orange R	0.3%
Glicerol	30%