



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE LAS ONCOPROTEÍNAS E6 Y E7 DEL VPH-16 SOBRE LA
ACTIVACIÓN DE LAS GTPasas RAC 1/2/3 EN PROCESOS ASOCIADOS CON
TRANSFORMACIÓN CELULAR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

BQD. José Joel Ruiz Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Marcela Lizano Soberón

[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Aliesha Araceli González Arenas

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dra. Yolanda Irasema Chirino López

[Facultad de Estudios Superiores Iztacala](#)

Ciudad de México. Agosto 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RUIZ HERNÁNDEZ JOSÉ JOEL
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria de febrero de 2023, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de Maestría en Ciencias, con la réplica de la tesis "Efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16 sobre la activación de las GTPasas Rac 1/2/3 en procesos asociados con transformación celular", dirigida por el/la Dr(a). LIZANO SOBERÓN MARCELA .

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

ROCHA ZAVALETA LETICIA	PMDCBQ	PRESIDENTE
GONZÁLEZ ESPINOSA CLAUDIA	PMDCBQ	SECRETARIO
IBARRA RUBIO MARÍA ELENA	PMDCBQ	VOCAL
ROBLES FLORES MARTHA	PMDCBQ	VOCAL
ROJAS DEL CASTILLO EMILIO	PMDCBQ	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 10 de febrero de 2023



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Marcela Lizano Soberón y se desarrolló en el laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos en la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología y el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Este proyecto fue parcialmente financiado por: El Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) con los programas PRONAH-7 Virus Y Cáncer #303044; Paradigmas y Controversias de la Ciencia #320812; y Ciencia de Frontera CF-2019-51488.

DEDICATORIAS

A mi familia:

Con profundo amor y respeto estaré infinitamente agradecido con mis padres: Marina Hernández Jiménez y Mariano Ruiz Cruz, por apoyarme en esta y todas las etapas formativas de mi vida. Gracias por su esfuerzo, atención, así como por su ejemplo diario de disciplina, trabajo duro, honradez, fortaleza y amor incondicional. Son ustedes los protagonistas de mis metas logradas y por alcanzar. Gracias por ser padres maravillosos y ejemplares.

A mi hermana Jacqueline Ruiz Hernández. Gracias Oja por ser mi ejemplo de vida, brindarme todo tu apoyo, consejos y amor incondicional en todas las etapas. Me siento muy orgulloso y afortunado por haber crecido contigo y compartir cada vivencia a tu lado. Siempre estaré agradecido contigo.

Agradezco a mi hermano Luis Mariano y mi sobrina Naomi Hernández Ruiz, por todo su apoyo. Todas sus virtudes y experiencia son mi ejemplo e inspiración.

A mi mejor amiga Katia Zocinia, te agradezco por tu compañía y amor incondicional, gracias por todas tus enseñanzas de vida, que en esta etapa fueron clave para nuestro crecimiento introspectivo, por estar en las buenas y malas, siempre tendrás todo mi cariño y gratitud.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y su Posgrado en Ciencias Bioquímicas, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación académica. Así como al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y al Instituto Nacional de Cancerología donde se realizó el presente trabajo.

Agradezco a la Dra. Marcela Lizano Soberón por dirigir la presente tesis, brindarme su confianza y abrirme las puertas de su laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos en el Instituto Nacional de Cancerología. Gracias por darme todo su apoyo, enseñanzas, paciencia, recursos y esfuerzo para la realización de este proyecto. Es usted un ejemplo para mí como una brillante investigadora y sobre todo por su calidez humana. Siempre estaré agradecido con usted y me siento muy honrado por ser su alumno.

A la Dra. Aliesha Araceli González Arenas y la Dra. Yolanda Irasema Chirino López, por formar parte de mi comité tutorial, por compartir sus conocimientos, sus valiosos comentarios, enriquecedoras discusiones, disposición y comprensión en todo momento.

Agradezco a mi comité de sinodales conformado por la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, la Dra. Claudia González Espinosa, la Dra. María Elena Ibarra Rubio, la Dra. Martha Robles Flores, y el Dr. Emilio Rojas Del Castillo, por su amabilidad, disponibilidad y sus valiosos comentarios para el enriquecimiento en la escritura de la presente tesis.

Al Dr. Omar Muñoz Bello agradezco su enseñanza técnica y teórica para la realización de la estrategia experimental, por su paciencia, disciplina y sobre todo por su amistad. Admiro mucho su dedicación y entrega en las labores que desempeña.

A la Mtra. Adela Carrillo, a la Dra. Imelda Martínez, a la Dra. Adriana Contreras, al Dr. Josué Castro Muñoz, al Dr. Joaquín Manzo Merino y a la Dra. Alma Chávez por su apoyo, valiosos comentarios y atenciones durante la realización del proyecto.

Agradezco al Dr. Alejandro López Saavedra por su apoyo y disponibilidad en la enseñanza de técnicas de microscopía. A la Dra. Monserrat Llaguno por sus valiosos comentarios y conocimientos brindados.

A mis compañeros de laboratorio: Katia Monroy, Alicia, Iris, Yunuen, Ximena, Eduardo, Víctor, Carolina, y Leslie, por su apoyo y grata convivencia.

Así mismo agradezco el apoyo económico a través de una beca nacional CONAHCYT 2021-1 durante la realización del proyecto de maestría con No. CVU:1100839.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1	Índice de figuras.....	7
2	Abreviaturas.....	8
3	Abstract	10
4	Resumen	11
5	Introducción	12
6	Marco teórico	13
6.1	Señalización de las Rac GTPasas	13
6.1.1	Activación de Rac GTPasas mediada por GEF.....	15
6.1.2	Señalización de efectores de Rac GTPasas en la reorganización del citoesqueleto.....	18
6.2	Señalización aberrante de Rac GTPasas en cáncer	20
6.3	Cáncer cervicouterino	23
6.4	Virus del Papiloma Humano.....	25
6.4.1	Oncoproteínas virales (E6 y E7)	25
6.5	Antecedentes: Señalización aberrante de Rac GTPasas en cáncer cervicouterino	27
	Justificación	28
	Hipótesis.....	28
	Objetivo general.....	29
	Objetivos particulares:	29
7	Estrategia experimental	29
8	Materiales y métodos	30
8.1	Cultivo celular	30
8.2	Obtención de RNA y síntesis de cDNA	30
8.3	Electroforesis de ácidos nucleicos	31
8.4	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....	31
8.5	Western Blot	31
8.5.1	Extracción de proteínas	31
8.5.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE).....	32
8.5.3	Transferencia.....	32
8.5.4	Bloqueo de membrana e incubación de anticuerpos primarios y secundarios	32
8.5.5	Anticuerpos.....	32

8.5.6	Revelado de la presencia de proteínas	33
8.6	Inmunofluorescencia.....	33
8.7	Viabilidad celular e IC50 de EHT1864 para determinar el efecto citotóxico sobre células HaCat y células C-33A.	33
8.8	Proliferación celular de C-33 A mediante ensayos de MTS.....	34
8.9	Ensayos de cierre de herida	34
8.10	Análisis Estadístico	34
9	Resultados.....	35
9.1	Presencia de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16 establemente transfectadas en células C-33 A.	35
9.2	E7 de VPH16 aumenta los niveles de mRNA del GEF TIAM 1, mientras que E6 de VPH 16 disminuye los niveles de mRNA de GEF P-REX1.	36
9.3	E7 de VPH-16 aumenta los niveles de mRNA de Rac1, Rac 1b, mientras que E6 y E7 de VPH-16 aumentan los niveles de mRNA de Rac3.	38
9.4	E7 de VPH-16 aumenta los niveles de mRNA de LIMK 1 y cofilina 1	40
9.5	IC50 de EHT 1864 para la viabilidad de células C-33 A establemente transfectadas con E6 o E7 de VPH-16 y de células HaCat.	42
9.6	Proliferación de células C-33 A establemente transfectadas con E6 o E7 de VPH-16.	43
9.7	E6 o E7 de VPH-16 aumentan la migración de manera dependiente de Rac GTPasas.	44
10	Discusión de resultados.....	45
11	Conclusiones	53
12	Perspectivas	53
13	Referencias.....	53

1 Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de la regulación para la actividad de la GTPasas.....	14
Figura 2. Mecanismo de activación de los GEF Tiam1, P-Rex1 y Vav2.....	17
Figura 3. Señalización de Rac GTPasa en la reorganización del citoesqueleto de actina... ..	19
Figura 4. Estimación de muertes al año por cáncer en mujeres de todas las edades.....	24
Figura 5. Principales proteínas celulares que interaccionan con las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-AR.....	27
Figura 6. Presencia de E6 y E7 de VPH-16 en células C-33 A transfectadas de manera estable.....	36
Figura 7. E7 de VPH16 aumenta los niveles de mRNA del GEF TIAM 1, mientras que la presencia de E6 de VPH 16 disminuye los niveles de mRNA del GEF P-REX1.....	37
Figura 8. E7 de VPH16 aumenta los niveles de mRNA de Rac 1 y Rac 1b, mientras que E6 o E7 de VPH-16 aumentan los niveles de mRNA de Rac3.	39
Figura 9. Niveles proteicos de Rac GTPasas en presencia de E6 y E7 de VPH-16.	40
Figura 10. E7 de VPH-16 aumenta los niveles de mRNA de LIMK 1 y cofilina 1	41
Figura 11. IC50 de EHT 1864 en células C-33 A establemente transfectadas con E6 o E7 de VPH-16 y células HaCat.	43
Figura 12. Proliferación de células C-33 A.	44
Figura 13. E6 o E7 de VPH-16 aumentan la migración de manera dependiente de Rac GTPasas.....	45

2 Abreviaturas

AID	Dominio autoinhibidor
Arp2/3	Proteína relacionada con actina 2/3
C-33 A	Células epiteliales negativas a VPH aisladas del cuello uterino
CaMKII	Proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina
CC	Cáncer cervicouterino
CDK2	Serina/treonina-proteína cinasa II
DH	Dominio de homología
DHR	Región de homología DOCK
DLG	Proteína de discos grandes
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2F	Factor de transcripción II
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ErbB	Homólogo del oncogén viral de la leucemia eritroblástica
GAP	Proteínas activadoras de GTPasa
G$\beta$$\gamma$	Subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas
GDI	Inhibidores de disociación de guanosina
GBD	Dominio de unión a GTPasa
GDP	Difosfato de guanosina
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
HA	Etiqueta de hemaglutinina
HaCaT	Células de queratinocitos humanos inmortalizados
HDAC	Histonas desacetilasa
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
IC50	Concentración inhibitoria 50
IQGAP1	Proteína similar a la activación de Ras GTPasa 1
IRSp53	Receptor de insulina tirosina quinasa sustrato p53
KD	Dominio de cinasa serina/teronina
LCR	Región larga de control
LIMK1	Cinasa 1 de dominio LIM
LPA1	Receptor de ácido lisofosfatídico 1
MAGI1	Proteína 1 que contiene el dominio WW y PDZ de guanilato quinasa asociada a la membrana
MLC	Cadena ligera de la miosina

MLK-1-3	Cinasa de linaje mixto 1-3
MMP	Metaloproteasa de matriz
MTOC	Centro de organización de microtúbulos
mRNA	RNA mensajero
NFX1	Factor de transcripción nuclear de unión a X-Box 1
P	Grupo fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PAK1-3	p21- cinasa activada isoformas 1, 2 y 3
P-Rex1	Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato dependiente del factor de intercambio 1
p70 S6	Proteína ribosómica S6 cinasa beta-1
PAK	Serina/treonina cinasa activada p21
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfoinositido 3-cinasa
pRB	Proteína asociada a retinoblastoma
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Rac1	Sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada con Ras
Rac1b	Sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionada con Ras de exón adicional 1b
RhoG	Proteína de unión a GTP relacionada con Rho
RIPA	Buffer de radioinmunoprecipitación para lisis celular
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RTK	Receptor tirosina-cinasa
STAT 3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TIAM1	Invasión de linfoma T y proteína 1 inductora de metástasis.
VAV	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina Vav
VPH	Virus del papiloma humano
VPH-AR	Virus del papiloma humano de alto riesgo
VPH-BR	Virus del papiloma humano de bajo riesgo
SDF-1 α	Factor 1 derivado de células estromales
WB	Western blot

3 Abstract

The aberrant signaling of Rac GTPases underlie cellular processes that promote malignant transformation; therefore, multiple alterations in this pathway have been reported in several types of cancer. However, the involvement of Rac GTPases pathway in the progression and maintenance of cervical cancer (CC), as well as, the relationship with the human papillomavirus (HPV), the etiological agent of CC, is not yet understood. Currently, CC ranks fourth in incidence and mortality of female neoplasms worldwide, and in Mexico ranks second, which constitutes a serious public health problem. In general, a direct connection has been described between the overexpression and/or overactivation of Rac GTPase elements, with increased motility and invasiveness in HR-HPV-positive CC cell lines and in high-grade cervical lesions. In addition, the transcriptional data suggest that the presence of the mRNA that codes for E6 and E7 oncoproteins of HPV-16, alter mRNA levels of Rac GTPases in CC cells. However, the precise role of HR-HPV and its oncoproteins on alterations in Rac GTPase-mediated signaling in cervical cancer is unclear. So, in the present study, C-33 A cells (HPV-negative CC) stably transfected with HPV-16 E6 and E7 oncogenes were used to evaluate their specific participation on the Rac GTPases pathway elements, as well as their effect on cell migration after inhibiting Rac GTPase activation. Interestingly, we found that the presence of E7 of HPV-16 significantly increased the mRNA levels of the Rac 1 and Rac 3, as well as the mRNA levels of elements involved in the activation of RacGTPase pathway, such as TIAM1, LIMK1 and cofilin1. Meanwhile, E6 of HPV-16 significantly increased Rac 3 mRNA levels and decreased P-Rex1 mRNA levels. Finally, we observed that even in the presence of both E6 and E7 oncoproteins of HPV-16, cell migration significantly decreased after pharmacological inhibition of Rac GTPase activation. In this way we demonstrate that E6 and E7 of HPV-16 increase cell migration through Rac GTPases 1, 2 and 3 activation dependent manner in CC.

4 Resumen

La señalización aberrante de las Rac GTPasas subyace a procesos celulares que favorecen la transformación maligna. En consecuencia, múltiples alteraciones en estas cascadas de señalización celular se han reportado en diversos tipos de cáncer. No obstante, se sabe poco sobre su papel en la progresión del cáncer cervicouterino (CC) y la relación con su agente causal: el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR). Actualmente el CC ocupa el cuarto lugar entre las neoplasias con tasas de mortalidad e incidencia más altas en el mundo y el segundo lugar en México. De manera general, se ha descrito una correlación directa entre la sobre-expresión y/o sobre-activación de las proteínas de las Rac GTPasas, con un aumento de motilidad e invasividad en líneas celulares de CC positivas a VPH-AR y en lesiones cervicouterinas de alto grado. Adicionalmente, datos procedentes de un transcriptoma sugieren que la presencia del mRNA que codifica para las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16, alteran los niveles de mRNA de las Rac GTPasas en células de CC. Sin embargo, no está claro el papel preciso del VPH-AR ni de sus principales inductores carcinogénicos sobre alteraciones en las señalizaciones mediadas por Rac GTPasas en el contexto del CC. De esta manera, en el presente trabajo se utilizaron células C-33 A (células de CC negativas a VPH) transfectadas establemente con los oncogenes E6 y E7 del VPH-16 para evaluar su participación específica sobre cascadas de señalización de las Rac GTPasas, así como su efecto sobre la migración celular tras inhibir la activación de las RacGTPasas. De manera interesante, encontramos que la presencia de E7 de VPH-16 aumentó significativamente los niveles de mRNA de Rac 1 y Rac 3, así como los niveles de mRNA de elementos involucrados en la activación de cascadas de señalización de RacGTPasas, tales como TIAM1, LIMK1 y cofilina1. Por otra parte, E6 de VPH-16 aumentó significativamente los niveles de mRNA de Rac 3 y disminuyó los niveles de mRNA de P-Rex1. Finalmente observamos que aún en presencia de ambas oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16, la migración celular disminuye significativamente tras la inhibición farmacológica de la activación de las Rac GTPasas. De esta manera demostramos que E6 y E7 de VPH-16 aumentan la migración celular de manera dependiente de la activación de Rac GTPasas en CC.

5 Introducción

Las GTPasas de la familia de Rac pertenecen a una familia de proteínas G pequeñas que activan blancos de señalización que incluyen proteínas cinasas, proteínas adaptadoras y proteínas reguladoras de actina, las cuales participan en diversos procesos celulares tales como la remodelación del citoesqueleto de actina, el establecimiento de la polaridad celular, la dinámica de los microtúbulos, el tráfico de vesículas y la migración, entre otros (Suryavanshi, N., et. al 2013). Por otra parte, la señalización aberrante en esta vía se ha relacionado con procesos que dirigen la carcinogénesis, tales como aumento en la proliferación, migración, invasión y metástasis. En consecuencia, se han reportado alteraciones de elementos de las Rac GTPasas en diversos tipos de cáncer, como el de mama, pulmón, colorrectal, próstata, cabeza-cuello, cérvix, testículo y melanomas, entre otros (Kazanietz, M. et. al. 2017; Wertheimer, E., et. al. 2012).

Los componentes de las señalizaciones mediadas por Rac GTPasas han sido poco estudiados en el cáncer cervicouterino (CC), a pesar de que estas moléculas juegan un papel clave en el proceso de metástasis. Se ha descrito que la mediana de supervivencia del CC metastásico es de sólo 8 a 13 meses, y la tasa de supervivencia a 5 años es del 16.5% (Zhou, S. y Peng, F. 2020). En consecuencia, el CC ocupa el cuarto lugar entre las neoplasias en mujeres de todas las edades con tasas de mortalidad e incidencia más altas en el mundo y el segundo lugar en México (Global Cancer Observatory, 2020).

Más del 95 % de los casos de CC se asocia con la infección persistente del virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) (World Health Organization, 2022), el cual es el agente infeccioso de transmisión sexual más común en todo el mundo. Los tipos de VPH-AR más prevalentes son el 16 y el 18, los cuales son causantes de aproximadamente el 70% de todos los casos de CC (HPV information centre, 2019). La infección persistente del VPH-AR promueve la integración del genoma viral al genoma celular, provocando la expresión continua de las oncoproteínas E6 y E7, las cuales son las responsables de alterar la mayoría de los procesos que favorecen la transformación celular por este virus. (Hu, D. et. al 2015, Huh et al., 2007).

Poco se conoce respecto a la participación de las Rac GTPasas en la progresión y el mantenimiento del CC; sin embargo, de manera general, se ha descrito una correlación directa entre la sobreexpresión y/o la activación de elementos de Rac GTPasas, con un aumento de motilidad e invasividad en líneas celulares de CC positivas al VPH-AR y en lesiones cervicouterinas de alto grado (Wertheimer, E., et. al. 2012; Donnelly, S. K., et, al.

2017; Zubor, P., et. al. 2020). Adicionalmente, datos transcripcionales sugieren que la presencia del mRNA de E6 y E7 de VPH-16 alteran los niveles de mRNA de las Rac GTPasas en células de CC (Olmedo-Nieva, L. et. al. 2022).

La evidencia actual que vincula la actividad de Rac GTPasas como reguladores clave en procesos relacionados con la agresividad de diferentes tipos de tumores, y su limitado abordaje hasta el momento en el CC, pone de manifiesto la necesidad de entender posibles mecanismos de acción de estas moléculas que pudieran ser inducidos a través de las oncoproteínas de VPH-AR. Esos estudios permitirán aportar conocimiento sobre el panorama de vías de señalización en el contexto de esta neoplasia, y eventualmente, colaborar con el desarrollo de estrategias terapéuticas encaminadas a mejorar la calidad de vida de las pacientes.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16 sobre los niveles de mRNA así como los niveles proteicos de las Rac GTPasas, sus activadores GEF y sus efectores involucrados en la reorganización del citoesqueleto de actina. Del mismo modo se evaluó su efecto en la migración celular tras inhibir la activación de Rac GTPasas en un modelo de células de CC.

6 Marco teórico

6.1 Señalización de las Rac GTPasas

Las Rac GTPasas pertenecen a la familia Rho de proteínas G pequeñas y comprenden las isoformas parálogas Rac1, Rac2, Rac3 y RhoG. Todas ellas actúan como interruptores moleculares que alternan entre una forma inactiva unida a GDP y una forma activa unida a GTP, lo que permite su interacción con diversas moléculas efectoras río abajo para regular su función, así como regular procesos celulares que involucran el reordenamiento del citoesqueleto de actina, adhesión celular, migración, proliferación, supervivencia, diferenciación e incluso transformación maligna (Parri, M., et, al., 2010). Esos eventos son parcialmente consecuencia de una rápida transición en la activación de las Rac GTPasas, lo cual se lleva a cabo a través de factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), proteínas activadoras de la actividad de GTPasa (GAP) e inhibidores de disociación de guanosina (GDI) (Figura 1) (Cherfils, J. et. al. 2013).

Los GEFs, por medio de diversas señales inducidas por factores de crecimiento, quimiocinas y receptores de adherencia, promueven cambios conformacionales en la GTPasa, lo que

permite que se una el GTP procedente de las altas concentraciones citosólicas, formando así un complejo activo Rac-GTP (Wertheimer, E. et. al. 2012; Cherfils, J. et. al. 2013). Adicionalmente, la actividad biológica del complejo activo está regulada por su localización celular, de manera que Rac-GTP necesita anclarse a la membrana citoplasmática para poder ejercer su acción sobre sus efectores (Casado-Medrano, V. et. al. 2018). En contraste, la capacidad de Rac para hidrolizar el GTP es poco eficiente, por lo que requieren la acción de una GAP para mejorar su actividad enzimática intrínseca y acelerar la hidrólisis para formar GDP (Figura 1). De este modo se promueve la formación del complejo inactivo con Rac-GDP (Wertheimer, E. et. al. 2012; Cherfils, J. et. al. 2013). Por otro lado, ambos procesos se regulan a través de los GDI, los cuales forman complejos solubles con las GTPasas en el citosol, protegiendo su característico grupo lipídico (farnesilo o geranilgeranilo) ubicado en el extremo C-terminal, estabilizando el complejo inactivo Rac-GDP e impidiendo su anclaje a la membrana (Wertheimer, E. et. al. 2012).

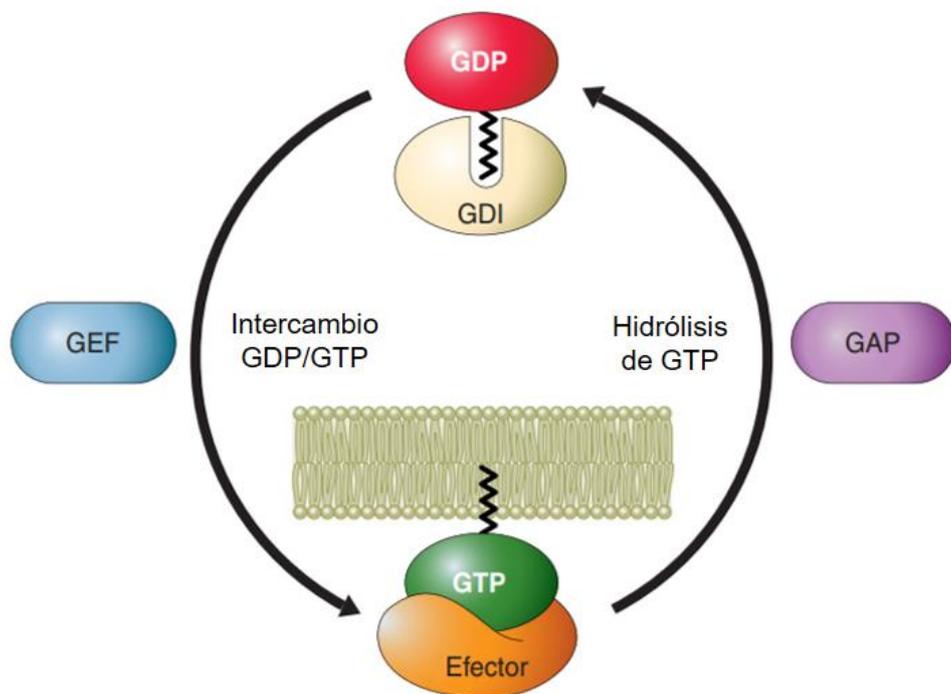


Figura 1. Ciclo de la regulación para la actividad de la GTPasas.

La GTPasa unida a GTP (verde) y a la membrana plasmática conforman el estado activo. Y aquella unida a GDP (rojo) formando un complejo con GDI constituye el estado inactivo. Los reguladores del ciclo son los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), proteínas activadoras de GTPasa (GAP) y los inhibidores de disociación de guanosina (GDI). Figura modificada de Cherfils, J. et. al. 2013.

Los reguladores de la actividad de las Rac GTPasas GEF, GAP y GDI, coordinan diversas funciones celulares involucradas principalmente con el reordenamiento del citoesqueleto de actina y la motilidad, de manera que la regulación aberrante en cualquier componente del

ciclo puede favorecer eventos celulares relacionados con contextos patológicos tales como procesos migratorios e invasivos en cáncer (Wertheimer, E. et. al. 2012; Cherfils, J. et. al. 2013; Casado-Medrano, V. et. al. 2018)

6.1.1 Activación de Rac GTPasas mediada por GEF

Se han identificado más de 80 GEF, los cuales se pueden clasificar estructuralmente en DBL-GEF y DOCK-GEF por los dominios que conforman estas proteínas (Cook, D. et. al. 2014). Los DBL-GEF comprenden de al menos 30 miembros, entre los cuales se encuentra VAV, TIAM1 y P-REX (Cook, D. et. al. 2014). De manera general, los DBL-GEF poseen uno o más dominios catalíticos de homología Dbl (DH), los cuales son responsables de promover el intercambio de GDP/GTP, así mismo, suelen tener uno o más dominios PH, los cuales regulan su actividad catalítica y localización mediante la unión de fosfoinosítidos (Cherfils, J. et. al. 2013). Adicionalmente, los DBL-GEF pueden poseer múltiples dominios de interacción proteica, los cuales les otorgan un nivel de complejidad biológica mayor, debido a que permite que los GEF formen complejos con diferentes proteínas para activar de forma específica a las Rac GTPasas, proporcionando así, mecanismos divergentes de señalización en los reordenamientos del citoesqueleto que contribuyen a la migración y la invasión de distintas formas (Kazanietz, M. et. al. 2017; Cooke, M., et. al., 2020).

Para que los GEF puedan activar las Rac GTPasas, necesitan de una gran variedad de señales externas que incluyen factores de crecimiento (como EGF, PDGF y HGF) y ligandos de receptores acoplados a proteína G (como SDF-1 α , esfingosina-1-fosfato y bombesina) (Kazanietz, M. et. al. 2017). Dichos estímulos son captados por diversos receptores (tales como integrinas, GPCR y RTKs), para posteriormente generar una cascada de moléculas intermedias que pueden incluir vías dependientes o independientes de PI3K y regular la activación de los GEF (Cherfils, J. et. al. 2013).

En la vía dependiente de fosfoinosítido 3-cinasas de clase I (PI3K), el producto fosfatidilinositol (3,4,5) -trisfosfato (PIP3), se une directamente al dominio PH presente en los GEF para activarlos. Por otra parte, la vía independiente de PI3K, puede involucrar mecanismos más complejos o incluso la unión directa del GEF con los receptores con actividad de serina/treonina cinasa o de tirosina-cinasa. (Cooke, M., et. al., 2020). En consecuencia, para ambos casos, los GEF pueden cambiar su localización subcelular, así como sufrir cambios conformacionales que alteran los mecanismos autoinhibidores y/o sufrir cambios alostéricos en el dominio catalítico (Lawson C. et. al., 2018).

Un ejemplo de activación de las proteínas GEF de manera dependiente de PI3K es la activación del GEF P-REX1, que se regula a través de la estimulación de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), seguido de la activación sinérgica de las subunidades G β de las proteínas G heterotriméricas y la formación de PIP3, para su unión directa con el GEF en su dominio PH (Figura 2A) (Cook, D. et. al. 2014). Por otro lado, el GEF TIAM1 se activa predominantemente por eventos que son parcialmente independientes de la actividad de PI3K (Mertens, A. et. al. 2003).

Se ha descrito que la estimulación de LPA1 por ligandos LPA o PDGF, promueve que TIAM1 se transloque a la membrana celular a través de su dominio PHn, induciendo su fosforilación en residuos de treonina por Ca²⁺/CaMK-II y PKC, lo cual desencadena un cambio conformacional del GEF que le permite unirse a Rac para activarlo. (Mertens, A. et. al. 2003) Asimismo la estimulación del receptor HER2 por su ligando HER, promueve que TIAM1 se fosforile y se desplace de las adherencias intercelulares, propiciando mayor potencial migratorio en células de cáncer de mama (Adam, L., et. al. 2001). Aunado a esto, la expresión de E-cadherina conduce a una mayor localización de membrana de TIAM1 y un aumento en la actividad de Rac (Fleming, I., 1999). No obstante, la regulación de TIAM1-Rac se ha descrito principalmente como consecuencia de la señalización por Ras. Esto ocurre tras la estimulación de RTKs, tal como EGFR o PDGFR y por factores de crecimiento como EGF, PDGF o FGF, lo que provoca la dimerización y autofosforilación en residuos de tirosina de la región citoplasmática del receptor. Las tirosinas fosforiladas y su secuencia circundante forman sitios de acoplamiento como pTyr- ψ -X- ψ y NPX-pTyr para la unión de sustratos que contienen dominios de fosfotirosina y homología Src 2 (SH2) respectivamente (Belov, A., et. al. 2012). De esta manera la proteína adaptadora SHC se asocia con EGFR fosforilado a través de su dominio SH2, lo que promueve su fosforilación y a su vez, le permite interactuar con el dominio SH2 de GRB-2 (Walker, F., et. al. 1998). Posteriormente SOS se unirá, a través de sus dominios de prolina en C-terminal, con el dominio SH3 de Grb2, lo que induce la actividad de SOS hacia Ras, estimulando su unión con GTP (Li S, et.al. 2001). Eventualmente Ras activo interactúa directamente con TIAM1 en su dominio RBD, permitiendo su acción hacia la activación de Rac (Figura 2B) (Mertens, A. et. al. 2003; Nussinov, R., 2014). No obstante, también se han descrito mecanismos de activación de TIAM1 dependientes de PI3K, en donde su producto PIP3 pueden unirse a los dominios PHc de TIAM1 permitiendo que Rac sea activado (Sander, E., et. al. 1998). Sin embargo, esto ha sido un tema de debate, ya que también se ha probado que la delección del dominio PHc no afecta la localización ni la actividad de TIAM1 (Mertens, A. et. al. 2003). Debido a que se han descrito de mejor manera los mecanismos de activación de TIAM1 en los que no interviene PI3K ni sus productos, se dice que es parcialmente independiente de PI3K (Pegtel, D. et al., 2007; Cook, D. et. al. 2014).

Por otro lado, se ha reportado que el GEF VAV2 se activa mediante su fosforilación en los tres posibles sitios de tirosina, Tyr-142, Tyr-159 y Tyr-172 por Src en respuesta a factores de crecimiento como EGF y PDGF (Tamás, P., et.al. 2003). En retrospectiva, VAV2 se encuentra autoinhibido en su sitio activo DH por una hélice en la región Ac. Tras la estimulación por factores de crecimiento, VAV2 se une en su dominio SH2 a sitios de autofosforilación Tyr-992 y Tyr-1148 del receptor de EGF de una manera dependiente del dominio SH2 de Src. De manera que VAV2 adquiere una conformación potencialmente activa a través de su fosforilación por las cinasas Src y Syk dentro de la hélice en la región Ac, modificando su conformación inhibidora y estabilizándola mediante interacciones con el dominio CH y los dominios DH-PH, lo que eventualmente favorece su acción hacia las Rac GTPasas (Figura 2C) (Tamás, P., et.al. 2003; Cook, D. et. al. 2014). A pesar de la heterogeneidad con la cual los GEF TIAM1, VAV2 y P-REX1 son activados, van a tener afinidad similar para activar a las GTPasas de la sub familia Rac. Sin embargo, las cascadas de señalización que desencadenan pueden incluir tanto a efectores comunes como divergentes.

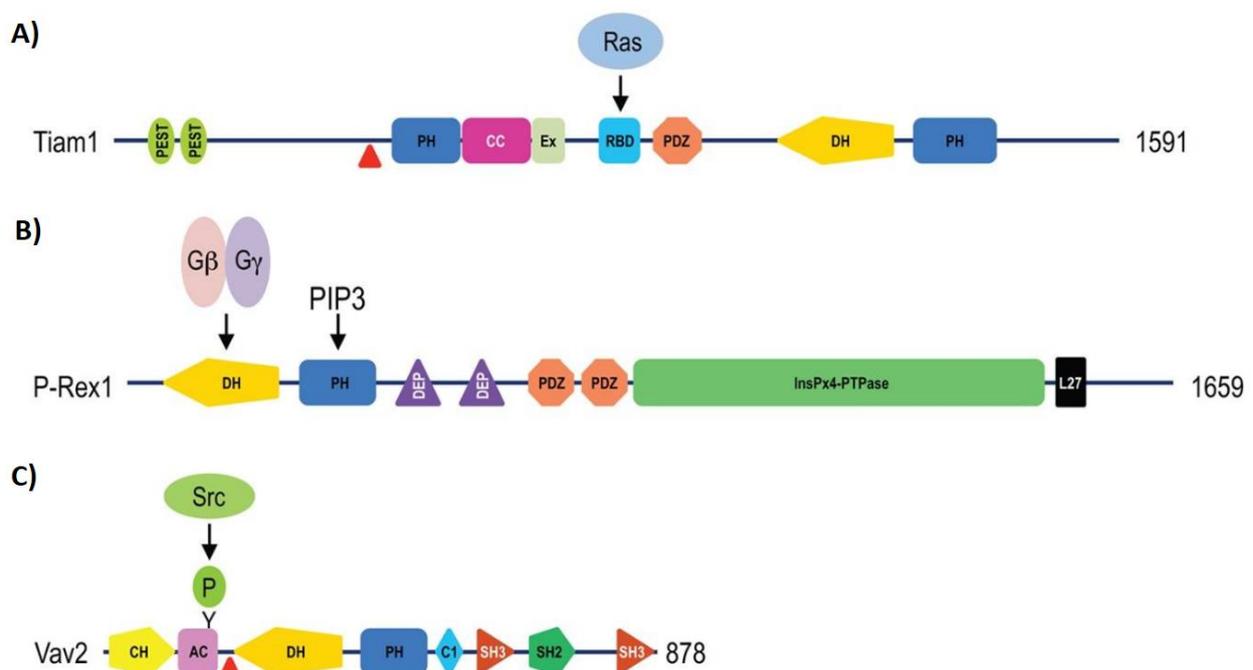


Figura 2. Mecanismo de activación de los GEF Tiam1, P-Rex1 y Vav2

(A) La activación de Tiam1 ocurre principalmente a través de la unión directa de Ras activo con el dominio RBD de Tiam1. B) La activación de P-Rex1 implica la unión de su dominio DH con la subunidad Gβγ de las proteínas G heterotriméricas, así como la formación de PIP3 para su unión directa con el dominio PH. C) La activación de Vav2 implica la fosforilación de su dominio AC por Src. El número en el extremo derecho de cada proteína indica el número total de aminoácidos que la conforman. Los triángulos rojos indican la posición de los truncamientos N-terminales que dan como resultado la formación de variantes transformantes y constitutivamente activas. Figura modificada de Cook, D. et. al. 2014.

De manera interesante, se han descrito funciones duales de los GEF en la migración celular según el contexto y el tipo de célula, tal es el caso de PREX1 y TIAM1. Por un lado, mejoran la adhesión célula-célula mediada por cadherina, promoviendo una morfología celular de tipo epitelial y, por otro lado, pueden contribuir a la extensión del lamelipodio y estimular la migración celular (Marei, H. et al., 2017; Pegtel, D. et al., 2007).

En este sentido, una vez que el GEF es capaz de interactuar con las Rac GTPasas, la cinética de activación es compleja pero eficiente, al generar respuestas rápidas requeridas por la célula (Cherfils, J. et. al. 2013). Los GEF modifican el sitio de unión del nucleótido en las Rac GTPasas, formando un complejo de baja afinidad entre la GTPasa unida a GDP y el GEF, que posteriormente se convierte en un complejo de alta afinidad de GTPasa/GEF libre de nucleótidos, esto permite la unión del GTP circundante para la activación completa de Rac GTPasa (Bos, J. et. al., 2007).

6.1.2 Señalización de efectores de Rac GTPasas en la reorganización del citoesqueleto.

Una de las principales funciones de Rac es regular la dinámica del citoesqueleto, promoviendo el ensamblaje de actina necesario para el mantenimiento de la morfología, polaridad, adhesión y migración celular (Cherfils, J. et. al. 2013). Para ello, Rac señala a una gran diversidad de proteínas efectoras como la cinasa de serina-treonina PAK1-3 (p21-cinasa activada), MLK-1-3 (cinasa de linaje mixto), cinasa p70 S6, CaMKII y muchas otras (Sauzeau, V. et. al. 2022). Sin embargo, el reordenamiento del citoesqueleto depende de Rac GTPasas en al menos dos mecanismos principales: un mecanismo ocurre a través de la transforforilación del homodímero de la cinasa PAK, que en su forma activa fosforila LIMK y ésta a la colfilina, inhibiendo la acción despolimerizante de actina de esta última. El otro mecanismo es a través de la activación del complejo Arp2/3, cuya función es promover la polimerización de nuevos monómeros de actina. (Figura 3)

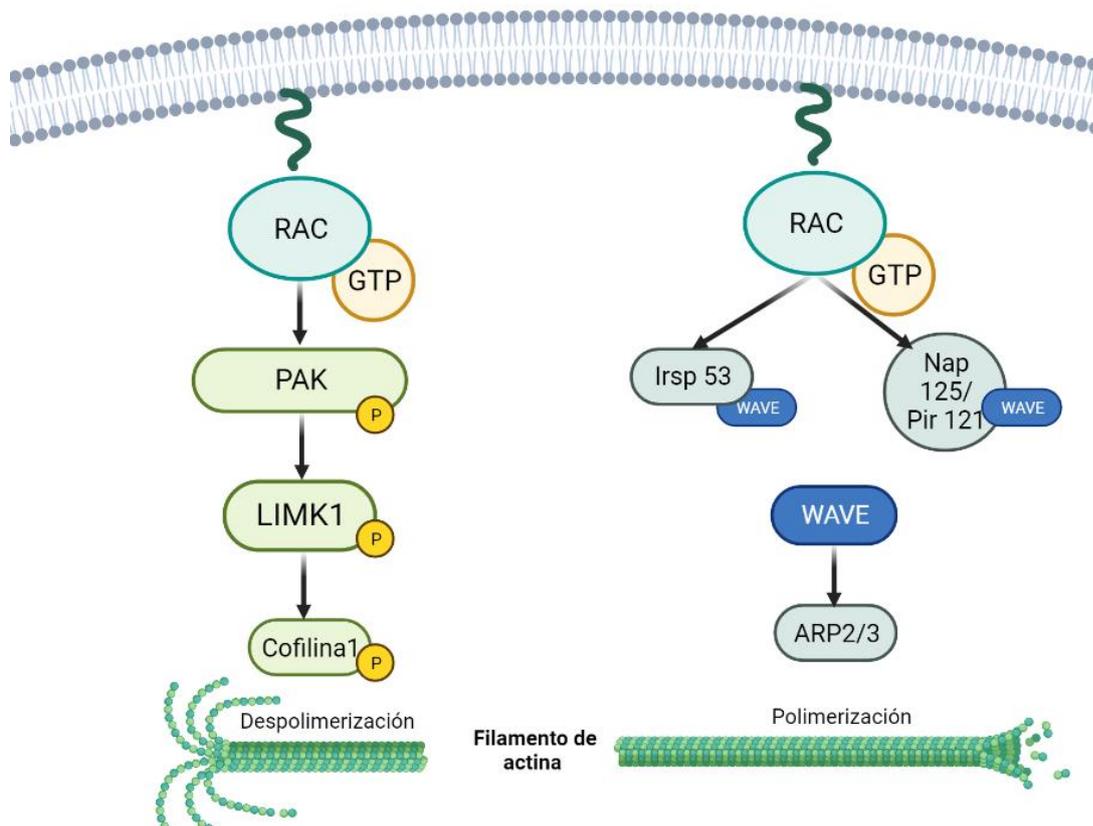


Figura 3. Señalización de Rac GTPasa en la reorganización del citoesqueleto de actina.

La activación de Rac promueve cambios relacionados con la reorganización del citoesqueleto a través de la activación del eje PAK/LIMK (izquierda), para suprimir la actividad despolimerizante de Cofilina1. Así también Rac activo induce la liberación de WAVE a través de complejos Irsp53 o Nap125-PIR121, para activar a Arp2/ (derecha), lo que provoca polimerización de actina. En conjunto favorecen a cambios en el citoesqueleto de actina necesarios para la formación de filopodios y la migración celular. Figura modificada de Wertheimer, E. et. al. 2012.

Las cinasas PAK 1, 2 y 3 son isoformas que van a regular su señalización a través de interacciones de sus dominios estructurales. En el estado no activado, forman un homodímero autoinhibido, producto de la interacción en cis con su dominio de cinasa serina/treonina (KD) conservado en el C-terminal y su dominio autoinhibidor (AID) (Fryer, B., 2005). Eventualmente, a medida que los complejos activos de las Rac GTPasas son generados, van a interactuar con PAK en su dominio de unión a GTPasa (GBD) en N-terminal para interrumpir la autoinhibición, lo que conduce a la dimerización y trans-autofosforilación resultando en su activación completa de la cinasa (Sorrell, F. et al., 2019).

Una vez activas, las PAK desencadenan una cascada de señales a cinasas río abajo que están involucradas en la protrusión de la membrana y el recambio de la adhesión focal al promover la fosforilación de proteínas involucradas en la dinámica de la actina. Las PAK

fosforilan a LIM cinasa-1 (LIMK1), que a su vez fosforila e inactiva a cofilina, suprimiendo el desensamblaje de los filamentos de actina en el filopodio (Li Z. et al., 2020)

Por otra parte, se sabe que Rac1 interacciona con el complejo regulador WAVE, y conduce a la activación del complejo de nucleación de actina Arp2 /3, que cuando se combina con la inactivación localizada de cofilina mediada por PAK, conduce a la formación de la red de actina ramificada característica de invadopodios (Li Z. et al., 2016).

6.2 Señalización aberrante de Rac GTPasas en cáncer

La metástasis es un proceso de varios pasos en el que las células migran desde el tumor primario para diseminarse por el cuerpo, estableciendo tumores secundarios en sitios distantes (Donnelly, S. K., et al. 2017). Para lograr esto, las células cancerosas adquieren capacidades invasivas y forman protuberancias ricas en actina llamadas invadopodios, los cuales dependen en gran medida de las Rac GTPasas (Cooke, M., et al., 2020). Debido a su estrecha implicación en estos procesos, resulta común que se reporten múltiples alteraciones de estas proteínas en diversos tipos de cáncer, las cuales incluyen su sobre expresión, mutaciones puntuales, estabilidad y/o localización celular anómala, entre otras (Kazanietz, M. et al. 2017; Clayton N. et al., 2020).

El miembro más estudiado de la subfamilia de Rac GTPasas es Rac 1 y se expresa de manera ubicua. De manera interesante se ha encontrado que tiene un papel pro-oncogénico en tumores sólidos y se ha reportado que los ratones *knock out* para Rac1 adquieren resistencia al cáncer de piel, pulmón y páncreas impulsado por KRas (Casado-Medrano, V. et al. 2018). Asimismo, se ha reportado que la mutación con ganancia de función en la posición aminoacídica P29S de Rac1 está presente en hasta el 9% de los melanomas secuenciados en zonas con exposición al sol (Krauthammer, M., et al. 2012). Adicionalmente, se han descrito otras mutaciones en Rac1 con ganancia de función en tumores humanos, como en las posiciones Q61R y A159V, en cáncer de próstata y cáncer de cabeza y cuello, respectivamente (Casado-Medrano, V. et al. 2018). No obstante, estas mutaciones también se han observado en tumores de colon, tiroides y pulmón (Sauzeau, V. et al. 2022). Por otro lado, se encontró que la sobreexpresión y/o hiperactivación de Rac1 se correlaciona con la progresión y mal pronóstico en cáncer de testículo, gástrico, mama, pulmón, ovario, próstata, vejiga, entre otros (Baugher, P. et al., 2005; Wu, Y. et al., 2014; Sauzeau, V. et al. 2022). En este sentido, hay evidencia suficiente que prueba que diversas alteraciones de Rac1 (que le permitan su activación continua) son cruciales en la carcinogénesis.

El gen de Rac1 comprende 7 exones; sin embargo, debido al proceso de splicing alternativo se puede generar una variante transcripcional, conformada de 8 exones con un exón adicional 3b, conocido como la variante Rac1b, cuyo producto proteico exhibe una mayor actividad de intercambio de nucleótidos, una capacidad deteriorada para hidrolizar al GTP y una afinidad reducida por GDI. Lo que da como resultado un mutante constitutivamente activa, cuya sobreexpresión se ha reportado en pacientes con cáncer colorrectal metastásico y se ha asociado como un factor negativo para la supervivencia general y la supervivencia libre de progresión (Casado-Medrano, V. et. al. 2018). Por otra parte, la sobreexpresión de Rac1b está relacionada con la presencia de metástasis a distancia y un mal resultado clínico en pacientes con cáncer folicular de tiroides (Casado-Medrano, V. et. al. 2018). Asimismo, su expresión y/o señalización anómala se ha descrito en cáncer de mama, adenocarcinomas de pulmón, páncreas, entre otros (Kawazu, M., et al., 2013; Marei, H. et al., 2017; Cooke, M., et. al., 2020).

Por otro lado, el gen Rac2 contiene 7 exones y su expresión se encuentra silenciada en células no hematopoyéticas por metilación del DNA (Vaghi, V. et. al., 2014). De manera similar, la eliminación de Rac2 en modelos in vivo, retrasa significativamente el inicio de leucemia mieloide aguda. No obstante, también se ha relacionado a Rac2 con múltiples tipos de cáncer, y se ha reportado tanto sobre-expresado como sub-expresado en tumores cerebrales, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello y leucemias (Kawazu, M., et al., 2013).

Por su parte, el gen Rac3 abarca 6 exones y en circunstancias no patológicas, se expresa principalmente en el cerebro y los tejidos neuronales (Vaghi, V. et. al., 2014). Así mismo se ha reportado que su eliminación en ratones retrasa significativamente el inicio de leucemia linfoblástica aguda (Casado-Medrano, V. et. al. 2018). Adicionalmente, su regulación al alza se ha descrito en carcinoma agresivo de mama, en cáncer de próstata y cerebro (Donnelly, S. K., et, al. 2017).

A pesar de que las Rac GTPasas tienen un grado muy alto de homología, presentan su mayor divergencia en el extremo C-terminal, el cual es importante para impulsar su localización subcelular diferencial, lo que permite colocarse en la proximidad de proteínas de diferentes cascadas de señalización, y por tanto la unión a reguladores celulares específicos (Baugher, P. et al., 2005; Casado-Medrano, V. et. al. 2018). De este modo alteraciones en alguna de las isoformas parálogas, tendrán un efecto suigéneris en la patología. Por ejemplo, pese a la identidad del 93% en la secuencia primaria entre Rac3 y Rac1, hay evidencia que describe que juegan roles antagónicos en diversos procesos celulares, tales como la diferenciación

neural, la autofagia, e incluso la invasión celular (Casado-Medrano, V. et. al. 2018; Baugher, P. et al., 2005, Donnelly, S. K., et, al. 2017).

Aunado a esto, el mecanismo más común que explica la hiperactivación de Rac en el cáncer humano es la desregulación de la función Rac-GEF. Ya que sus alteraciones también se relacionan en gran medida con fenotipos pro-oncogénicos y pro-metastásicos. La desregulación de los Rac-GEF se produce como consecuencia de la sobreexpresión, la activación de mutaciones/deleciones y/o entrada de excesivas señales río arriba. (Casado-Medrano, V. et. al. 2018). En última instancia, estas señales afectarán el estado de activación de los GEF. De hecho, varios GEF, como TIAM1 y P-REX1 están regulados al alza o hiperactivos en eventos tumorigénicos y metastásicos (Welch H., 2015). Por otro lado, hay menos evidencia de la desregulación en la expresión y/o función de Rac-GAP. La evidencia actual sugiere que la expresión aberrante de los GEF en las células cancerosas podría redirigir la señalización mediada por diversos receptores hacia el fortalecimiento de la activación continua de las Rac GTPasas (Clayton N. et. al., 2020), no obstante, esta hipótesis continúa siendo objeto de estudio en modelos oncogénicos.

Un GEF implicado en la progresión del cáncer es TIAM1, el cual ha tenido un papel controversial en la interpretación de sus funciones biológicas. Por ejemplo, se reportó en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, las cuales son altamente migratorias y metastásicas, que TIAM1 se sobre-expresa y ocurre lo contrario para los modelos menos invasivos como las células MCF-7 o SK-BR-3 (Lawson C. et. al., 2018). Con base en esto y con estudios posteriores se estableció una correlación entre la sobreexpresión de TIAM1 con el alto grado tumoral en los carcinomas.

Por otra parte, en un modelo de ratones con cáncer de piel inducido por Ras, se observó que la ausencia de TIAM1 provoca que se desarrollen menos tumores, aunque los tumores que se forman son más agresivos (Malliri, A. et al., 2002). Por otro lado, estudios recientes muestran una relación inversa entre la expresión de TIAM1 y la progresión de los carcinomas de mama, por lo que surge la necesidad de reevaluar la participación de TIAM1 en el cáncer de mama y en otros tipos de cáncer (Li, Z., et al., 2016; Lawson C. et. al., 2018).

Siguiendo el ejemplo de los GEF, estudios recientes identificaron que P-REX1 se asocia con progresión metastásica y mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama y de próstata (Srijakotre, N., et al., 2017), promoviendo la actividad de Rac1 en procesos migratorios. La regulación positiva de P-REX1 se produce a través de una mayor expresión génica,

desregulación epigenética o aumento de la estabilidad de las proteínas (Marei, H. et al., 2017).

Así bien, se han reportado múltiples estudios que señalan funciones distintas de las isoformas de VAV2/3 en el cáncer, tal es el caso de VAV2 que se activa en el melanoma metastásico para promover la expresión de metaloproteinasas que conducen a la invasión. De manera similar VAV2/3 favorece el crecimiento y metástasis del cáncer de mama y regula al alza objetivos genéticos importantes para la metástasis específica de pulmón en vías dependientes de Rac1 (Cook, D. et. al. 2014).

Lo anterior sugiere que la señalización de los GEF en cáncer va a depender de escenarios biológicos complejos y posibles mecanismos compensatorios entre los miembros de la misma familia DBL-GEF y las Rac GTPasas. Por lo tanto, los GEF de Rac, son blancos terapéuticos prometedoras contra el cáncer. Prueba de ello es el desarrollo del compuesto NSC23766 y sus derivados, el cual se encuentra en una etapa experimental/preclínica, y se ha descrito como un inhibidor competitivo de la carga de GTP en Rac1 por TIAM1 y Trio con efectos antitumorígenicos y antimetastásicos (Mendoza-Catalan. et.al. 2012; Liang, J., et. al. 2021). Sin embargo, el compuesto NSC23766 no inhibe la activación de Rac por GEFs como VAV, ni por otros mecanismos (Shutes A., et. al. 2007).

Recientemente se desarrollaron derivados del compuesto NSC23766, tal es el caso de EHT 1864, cuyo mecanismo radica en la inhibición alostérica de la unión de nucleótidos a Rac1, Rac 1b, Rac2 y Rac3, lo que impide que la GTPasa ingrese al ciclo de intercambio de GDP/GTP. Por lo tanto, EHT 1864 tiene un efecto más amplio que los inhibidores de la interacción Rac/Rac-GEF, y podría ser beneficioso para el tratamiento de los cánceres con mutaciones activadoras de Rac1, como el melanoma y el uterino (Kazanietz, M. et. al. 2017; Shutes A., et. al. 2007)

6.3 Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CC) es un problema de salud pública que ocupa el cuarto lugar en incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres alrededor de todo el mundo con aproximadamente 604,127 nuevos casos y 341,831 muertes en el 2020 (Global Cancer Observatory, 2020). En México ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad por cáncer

en mujeres, reportándose en el 2020 un total de 9,439 casos nuevos y 4,335 defunciones. (Global Cancer Observatory, 2020) (Figura 4).

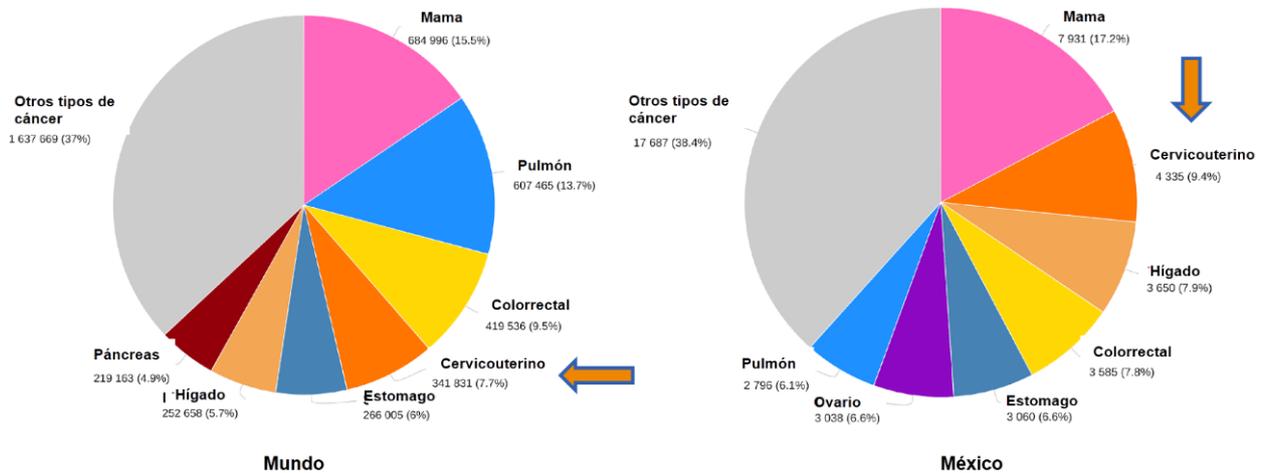


Figura 4. Estimación de muertes al año por cáncer en mujeres de todas las edades
 Proporción que ocupa CC (anaranjado) del total de muertes por cáncer en mujeres en el mundo (izquierda) y en México (derecha) Recuperado de Global Cancer Observatory, 2020.

El CC es causado predominantemente por infecciones persistentes del Virus del Papiloma Humano (VPH), encontrándose la presencia del genoma viral en más del 91% de los casos (Chan, C. K., et al., 2019). Adicionalmente, se han sugerido varios factores de riesgo que aumentan la probabilidad de que se desarrolle una infección persistente y la subsecuente transformación maligna. Estos incluyen factores infecciosos y conductuales, tal como el tabaquismo, uso prolongado de anticonceptivos orales, la alta paridad, la coinfección con otros agentes infecciosos como el virus del herpes simple tipo II o el virus de la inmunodeficiencia humana. (Small, W. et. Al. 2017).

El CC presenta tasas desproporcionadamente altas en los países menos desarrollados, probablemente debido al acceso reducido de las pruebas de detección y al alto costo de las vacunas contra el VPH. (De Martel, C., et. al. 2017). Desafortunadamente el 13% de las pacientes con CC se diagnostican en etapas avanzadas (Montalvo et al., 2011). Si el CC se diseminó a los tejidos u órganos circundantes y/o a los ganglios linfáticos regionales, la tasa de supervivencia a 5 años es del 58%. Mientras que, si el cáncer se ha propagado a una parte distante del cuerpo, la tasa de supervivencia a 5 años es de tan sólo el 18 %. (Zhou, S. y Peng, F. 2020). A diferencia de las pacientes con CC en estadio temprano y localmente avanzado, que tienen acceso a tratamientos convencionales que incluyen cirugía, quimioterapia o radioterapia (RT), no existe un tratamiento estándar para las pacientes con CC metastásico debido a sus manifestaciones heterogéneas. (Li, H., et. al. 2016).

6.4 Virus del Papiloma Humano

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es el agente infeccioso de transmisión sexual más común en todo el mundo, y es también el causante del 5% de todos los cánceres humanos (Estêvão, D. et. al. 2019). Además de su fuerte asociación con el CC, estudios epidemiológicos demuestran una elevada asociación de la presencia del VPH con diversos tipos de cáncer como ano en aproximadamente el 90% de los casos, vagina y vulva en el 70%, orofaringe en el 70% y más del 60 % de los tumores de pene (Wu, J., et. al. 2021).

Hasta el momento, se han identificado más de 200 genotipos de VPH capaces de infectar al humano (Serrano, B. et. al. 2018) y de acuerdo a su potencial oncogénico, se pueden subdividir en VPH de bajo riesgo (VPH-BR); que se relacionan principalmente con el desarrollo de verrugas y lesiones benignas (Van Doorslaer, K. 2013), y los VPH de alto riesgo (VPH-AR); los cuales se asocian al desarrollo de cáncer. Actualmente hay 15 tipos de VPH-AR y son responsables de más del 99,7 % de los casos de CC, de los cuales el 55 % son positivos al VPH16 positivos y el 15 % al VPH18 (Scarth, JA, et. al. 2021; HPV information centre, 2019).

El VPH es un virus icosaédrico pequeño de 50-55 nm de diámetro, sin envoltura, que posee un genoma de DNA bicatenario de aproximadamente 8,000 pares de bases, que contiene por lo menos ocho marcos de lectura abiertos (ORF), que son expresados en un mRNA policistrónico. El VPH infecta los queratinocitos basales y su expresión es temporal y sincronizada con su proceso de diferenciación. El virus expresa las proteínas "tempranas" como las E1, E2, E4, E5, E6 y E7; así como las proteínas "tardías" formadoras de la cápside L1 y la menor L2. La región de control larga (LCR) es esencial para regular la expresión del genoma viral (de Sanjosé, Brotons & Pavón, 2018).

6.4.1 Oncoproteínas virales (E6 y E7)

Los impulsores clave de la transformación mediada por el VPH son la expresión continua de los oncogenes E6 y E7, cuyos productos proteicos actúan en conjunto para prolongar la progresión del ciclo celular, retrasar la diferenciación e inhibir la apoptosis en la célula de queratinocitos del huésped para generar un entorno propicio para la replicación viral.

En los cánceres invasivos y en un subconjunto de lesiones de alto grado se ha detectado una mayor expresión de E6 y E7, probablemente debido a la integración del DNA viral en el genoma de la célula huésped. Tanto las proteínas E6 como las E7 son esenciales para inducir y mantener la transformación celular, debido a su interferencia con el control del ciclo celular

y la apoptosis. Se cree que la inestabilidad genómica promovida por VPH es una parte esencial de la transformación celular (Narisawa-Saito & Kiyono, 2007). Previamente se ha descrito que las oncoproteínas virales intervienen en diversos procesos celulares a través de la interacción con múltiples proteínas blanco.

La proteína E6 de los VPH-AR está constituida de aproximadamente 150 aminoácidos y contiene un motivo LXXLL en la región amino terminal que se requiere para interactuar con distintas proteínas celulares como: E6AP, E6BP, IRF3, tuberina y paxillina, entre otras. Dentro de estas interacciones proteicas, la unión de E6 de VPH-AR con la ubiquitina-proteína ligasa E3A (E6AP) promueve la degradación de diversas proteínas reguladoras como la supresora de tumores p53, evitando de este modo la detención del crecimiento celular y la apoptosis, lo que a su vez favorece la acumulación de mutaciones en el DNA (Scheffner et al., 1993, Hu, D. et al 2015). Por otra parte, en el extremo carboxilo terminal la proteína E6 de los VPH-AR, contiene un dominio llamado PBM (motivo de unión a PDZ), el cual le confiere la capacidad de interactuar con proteínas celulares que contienen dominios PDZ. (Howie et al., 2009). Lo que comúnmente induce su degradación a través del proteosoma (Zhang et al., 2007). Ejemplos de estas son DLG, Scribble, MUPP1, MAGI-1, -2 y -3, GIPC, PATJ, PTPN3 y PSD95, entre otras. Lo cual generalmente causa la pérdida de contactos célula-célula mediada por uniones estrechas y, por lo tanto, contribuye a la pérdida de polaridad (Estêvão, D., et al., 2019) (Figura 5)

La proteína E7 está formada por 98 aminoácidos que para su estudio se han dividido en tres regiones conservadas: CR1, CR2 y CR3. La región CR2 incluye un motivo LXCXE conservado que media la unión específica con la proteína supresora de tumores pRB (Münger et al. 1989). La proteína E7 forma un complejo con culina 2, una ubiquitina ligasa de tipo 2, permitiendo la degradación de pRB y a su vez, promueve la liberación y actividad de la familia de los factores de transcripción E2F, favoreciendo la continuidad del ciclo celular de G1/S, lo que eventualmente conduce a la proliferación descontrolada de las células (Hu, D. et al 2015, Huh et al., 2007) (Figura 5).

Además de la inactivación de los miembros de la familia pRb, se han descrito diversas funciones de E7, tales como interacción con las histonas desacetilasas (HDAC) para promover el crecimiento celular, interacción con la cinasa dependiente de ciclina (CDK) 2 / ciclina A, así como CDK2 / ciclina E, entre otros blancos, lo que afecta la diferenciación celular, la apoptosis y la inestabilidad genómica (McLaughlin-Drubin, et al. 2009; Narisawa-Saito & Kiyono, 2007).

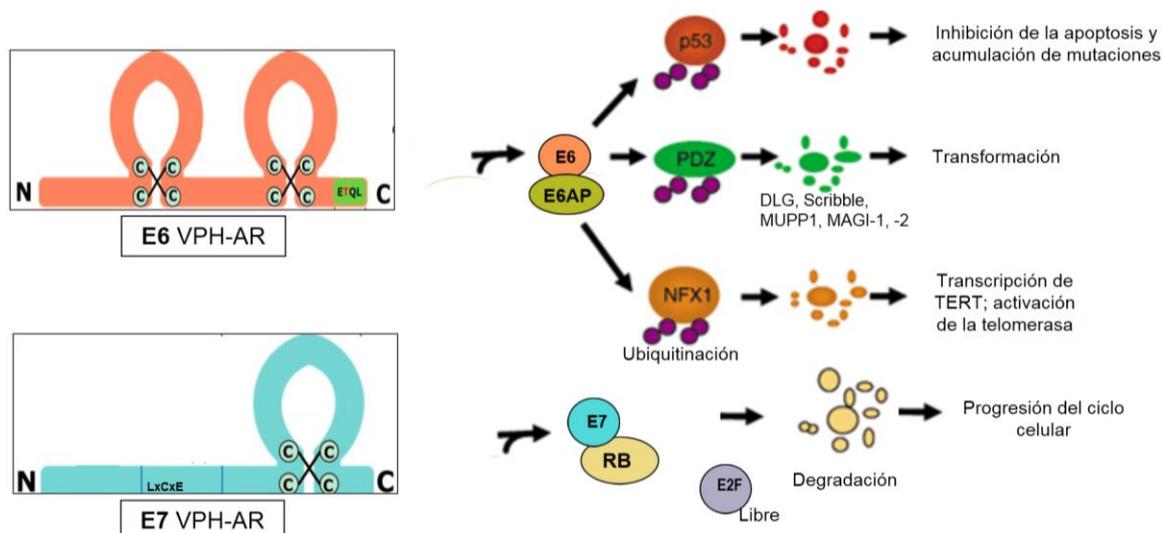


Figura 5. Principales proteínas celulares que interaccionan con las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-AR.

La proteína E6 de VPH-AR interacciona con la ubiquitina-proteína ligasa E3A (E6AP), lo que permite la degradación de blancos celulares como NFX1, proteínas con dominio PDZ (DLG, Scribble, MUPP1, MAGI-1, -2), así como la proteína supresora de tumores p53. Por otro lado, la proteína E7 de VPH-AR puede degradar a la proteína del retinoblastoma (pRb), promoviendo la transformación celular. Recuperada y modificada de Narisawa-Saito & Kiyono, 2007.

Por lo tanto, las oncoproteínas del VPH pueden inducir alteraciones en vías de señalización celular que contribuyen a la carcinogénesis. Tras la infección inicial, esta modulación puede ser necesaria para completar el ciclo replicativo y formar partículas virales infecciosas. Sin embargo, la expresión continua de los oncogenes virales puede eventualmente alterar las funciones normales de la célula, desencadenando un proceso de transformación celular.

6.5 Antecedentes: Señalización aberrante de Rac GTPasas en cáncer cervicouterino

Particularmente, en CC se han encontrado aumentado los niveles proteicos de Rac1 y el GEF TIAM1 a medida que las lesiones cervicouterinas avanzan a un cáncer invasor. De manera interesante, se observó que Rac1 está presente en el núcleo de las células de lesiones cervicouterinas de alto grado comparadas con las lesiones de bajo grado. Por otra parte, utilizando líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino C33A (VPH negativas) y SiHa (positivas a VPH-16), se observó que al inhibir farmacológicamente a Rac1, se reduce la proliferación en estas células (Mendoza-Catalan. et.al. 2012).

Por otro lado, Xu, A. y colaboradores en el 2013 observaron que la ausencia de Rac1 en células HeLa disminuye la proliferación e invasión celular, además de disminuir la secreción de metaloproteína-2 (MMP-2) y aumentar la quimiosensibilidad al cisplatino.

Otros estudios demostraron que las GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42 se encuentran activadas en líneas celulares derivadas de CC, lo que correlaciona directamente con una mayor motilidad de las células CaSki y SiHa, las cuales son positivas al VPH-16, en comparación con las células VPH negativas como C33-A (Matarrese, P. et. al., 2016).

Por otra parte, datos procedentes de un transcriptoma (Olmedo-Nieva, L. et.al. 2022), señalan que la presencia de E7 o E6 de VPH-16 en células C-33 A transfectadas de manera estable, desregulan los niveles relativos de diversos mRNAs celulares, los cuales traducen a proteínas cuyas funciones están relacionadas con la formación de uniones adherentes, adhesiones focales y la polimerización de actina. Interesantemente, dentro de este análisis de RNAseq se encontró aumento en los niveles de mRNA de TIAM1, Rac3 y LIMK1 tanto por E6, como por E7 de VPH-16. Sin embargo, la presencia de E7 de VPH-16 aumenta los niveles de mRNA de VAV2 y la presencia de E6 de VPH-16 disminuye el mRNA de P-REX1.

Poco se conoce respecto a la participación de las isoformas de Rac1, como Rac2 y Rac3 en la progresión o el mantenimiento del CC; sin embargo, su expresión y activación se han observado en diversos tipos de cáncer como aquellos de cabeza y cuello, mama, estómago ovario y cerebro, participando en procesos como migración e invasión, los cuales son característicos de un fenotipo tumoral agresivo (Wertheimer, E., et. al. 2012, Donnelly, S. K., et, al. 2017, Zubor, P., et. al. 2020).

Justificación

Las Rac GTPasas y sus señalizaciones celulares se han encontrado alteradas en diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer cervicouterino, afectando procesos como proliferación, migración e invasión celular. Los mecanismos moleculares mediante los cuales el VPH-AR regula la activación de estas señalizaciones a través de Rac GTPasas aún se desconocen, por lo que es de interés evaluar la participación específica de las oncoproteínas virales en estos eventos celulares, lo que permitirá eventualmente, aportar enfoques terapéuticos y pronósticos.

Hipótesis

Las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16 regulan vías de señalización de Rac GTPasas 1, 2 y 3 afectando procesos asociados con migración celular en cáncer cervicouterino.

Objetivo general

Evaluar la participación de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16 en señalizaciones reguladas por Rac GTPasas 1, 2 y 3, así como su efecto sobre la migración en células de cáncer cervicouterino.

Objetivos particulares:

- 1.-Analizar los niveles de mRNA y los niveles proteicos de Rac 1, 2 y 3, así como de sus GEF TIAM1, VAV2 y P-REX1 en células C-33 A con expresión estable de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16.
- 2.- Analizar los niveles de mRNA, así como los niveles de las proteínas fosforiladas de efectores involucrados con la reorganización del citoesqueleto de actina PAK1/2/3, LIMK1 y cofilina1 en células C-33 A con expresión estable de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16.
- 3.- Evaluar la participación específica de la activación de Rac 1, 2 y 3 en la migración de células C-33 A con expresión estable de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16.
- 4.- Evaluar el efecto de la inhibición de los oncogenes de E6 y E7 en células de CC positivas al VPH 16 (CaSki) sobre elementos de señalización de Rac 1, 2 y 3.

7 Estrategia experimental

Se emplearon células de cáncer cervicouterino C-33A (negativas a VPH) establemente transfectadas con oncoproteínas E6 o E7 de VPH-16 para realizar los siguientes experimentos:

- 1.-Se evaluó los niveles de mRNA, así como los niveles proteicos de Rac1,2, 3, TIAM1, VAV2 y P-REX1 mediante qPCR y western blot.
- 2.- Se evaluó los niveles de mRNA, así como los niveles proteicos fosforilados de PAK1/2/3, LIMK1, y cofilina1. mediante qPCR y western blot.
- 3.-Se calculó la IC50 del compuesto EHT1864, el cual inhibe la activación de las Rac GTPasas 1/2/3, para determinar su efecto citotóxico sobre células no tumorigénicas HaCat y células de CC, C-33A mediante ensayos de MTS.
- 4.- Se calculó las condiciones de SFB óptimas para inhibir la proliferación celular sin afectar la viabilidad celular mediante ensayos MTS.
- 5.- Se realizaron ensayos de cierre de herida para evaluar la migración celular en ausencia o presencia de EHT1864.

8 Materiales y métodos

8.1 Cultivo celular

Se empleó la línea celular de cáncer de cérvix C-33 A (negativa a VPH) establemente transfectada con oncoproteína E6 o E7 de VPH-16, o con el vector de expresión p3x-FLAG CMV.10 (Sigma Aldrich) Así también se empleó la línea de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT. Ambas líneas celulares se adquirieron de ATCC (American Type Culture Collection). Fueron mantenidas en medio Eagle de Dulbecco modificado (DMEM) enriquecido con suero bovino fetal al 10% a 37°C en ambiente húmedo y CO₂ al 5%.

8.2 Obtención de RNA y síntesis de cDNA

Células C-33 A fueron sembradas en placas de 60mm por triplicado y 24hrs post-sembrado se obtuvo el RNA total de cada condición utilizando el RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El RNA obtenido se eluyó en 30uL de H₂O libre de RNAsas, posteriormente fue tratado para asegurar la eliminación del DNA con el kit DNase Free DNA removal kit (Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA USA). Se utilizaron 1.5ug de RNA para la reverso-transcripción (RT) utilizando el Kit High-Capacity RNA-to-cDNA (ThermoFisher Scientific). La expresión de E6 o E7 de VPH-16 fue verificado por RT-PCR utilizando *primers* específicos enlistados en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los *primers* utilizados para amplificar los genes E6 o E7 de VPH-16 y a los componentes de la cascada de señalización de Rac GTPasas.

<i>Gene</i>	<i>Forward 5'</i>	<i>Reverse 3'</i>	<i>Fragmento (bp)</i>
E6 VPH-16	GTTCCAGATTACGCTTTCAGGAC	TTACAGCTGGGTTTCTCTACGTG	477
E7 VPH-16	TCATGGAGATACACCTAC	TTATGGTTTCTGAGAACA	297
TIAM1	GATGGCAAGAGGGAGAAAGAA	CAGAACCAGGATGGAGTGAAA	101
PREX1	CCTTCTTCCTCTTCGACAAC	GGAGCCGTTGATGGATTT	108
VAV2	GTCCTACGGCTTCTACCTAA	CATCTCAAACCTGCTCCATCC	111
RacT	CAGGCCATCAAGTGTGT	CCCAGATTCACCGGTTT	98
Rac1	CGGTGAATCTGGGCTTATG	GAACACATCTGTTTGCGGAT	86
Rac1b	GGAGAAACGTACGGTAAGG	ATGATGCAGGACTCACAAG	97
Rac2	TCGAGAAACTGAAGGAGAAG	CTCGTCGAACACGGTTT	137
Rac3	ACGGGAAACCAGTCAACTT	CCAGAGAGAAGCAGATCAGAAA	114
LIMK1	GTCGCACCAGTACTATGAGAAG	AACCAGTCCCTTGGTGATTT	112

Cofilin-1	TGTCAAGATGCTGCCAGATAAG	GCCCAGAAGATAAACACCAGAT	102
-----------	------------------------	------------------------	-----

8.3 Electroforesis de ácidos nucleicos

Todas las amplificaciones de cDNA llevadas a cabo, fueron corridas por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (en TBE 1X mostrado en anexo 1.7). Los marcadores de peso molecular (Axygen®) que se utilizaron, fueron de 100 pb en todos los casos. El voltaje usado para correr cada gel varió entre 80 y 100 volts. Los electroferogramas resultantes se revelaron con GelRed de GenScript®, por fluorescencia del colorante en la luz UV.

8.4 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Se emplearon 200µg de cDNA, y se evaluaron los niveles relativos de los genes TIAM1, PREX1, VAV2, RacT, Rac1, Rac1b, Rac2, Rac3, LIMK1, y cofilin-1 mediante qPCR utilizando *primers* específicos para cada gen, los cuales se enlistan en la tabla 1. La cantidad de producto de amplificación se midió en cada ciclo de PCR empleando SYBR Green, el cual emite fluorescencia a medida que se une al DNA de doble cadena. Los resultados fueron presentados como una cuantificación relativa utilizando el método de $\Delta\Delta Ct$. Como control de expresión constitutiva se utilizó el gen 18S.

8.5 Western Blot

Para detectar los niveles de proteína E6 o E7 de VPH16, así como los diversos blancos celulares analizados en este trabajo, se realizaron ensayos de western blot utilizando extractos totales 24 h post-sembrado. Las proteínas diana se transfieren a una membrana hidrófoba después de SDS-PAGE y se detectan mediante anticuerpos específicos. Los resultados se muestran como niveles proteicos relativos comparados con los niveles proteicos de un control endógeno housekeeping.

8.5.1 Extracción de proteínas

Las células C-33 A se cultivaron en placas de 60 mm y se lisaron 24h post-sembrado, para lo cual se les retiró el medio de cultivo y se lavaron con 2 mL de PBS estéril tres veces. Posteriormente, las cajas con los cultivos se colocaron sobre hielo y se añadieron 100µL del buffer RIPA (Tris 100 mM, pH 8.0, NaCl 250 mM, Nonidet P-40 al 0.5%, cóctel de inhibidor de proteasas (Roche) y con inhibidores de fosfatasa Ortovanadato de sodio 8Mm). Las células

fueron recolectadas utilizando un gendarme. El raspado se pasó de 10-15 veces con una jeringa de 1 mL, el lisado resultante se conservó a -80°C.

8.5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

Se realizó una electroforesis en medio desnaturalizante con el fin de separar, de acuerdo al peso molecular, las proteínas presentes en las muestras. Previamente se realizó una cuantificación de proteína total a las muestras, utilizando el método de ácido bicinónico, y se diluyó la muestra con buffer Laemmli 1:1 v: v. Posteriormente se hirvió la muestra a baño maría durante 15 minutos y se procedió a colocar en el gel de corrida 20 µg de extractos de proteínas celulares. Se usaron geles de poliacrilamida al 8% y 10 %. La electroforesis se llevó a cabo usando buffer de corrida 1X a 80 V hasta que el frente de migración salió del gel.

8.5.3 Transferencia

Una vez que la electroforesis se completó, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de nitrocelulosa con poros de 0.2 µm (Bio-Rad®) en una cámara con buffer de transferencia 1X a 100V durante 2h en frío. Para corroborar la transferencia de proteínas, la membrana se tiñó con una solución de Rojo Ponceau, el cual se une al extremo amino de las proteínas, posteriormente la membrana se lavó con solución salina-Tris y Tween (TBS-T)1X hasta eliminar el colorante.

8.5.4 Bloqueo de membrana e incubación de anticuerpos primarios y secundarios

La membrana se bloqueó durante 1 h 30 min a 37°C con BSA al 7.5 % en solución con TBS-T 1X en agitación. Al finalizar el bloqueo se realizó 1 lavado de 5 minutos con TBS-T 1X. Posteriormente, la membrana fue incubada con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C en agitación, seguido de tres lavados con TBS-T 1X en agitación durante 10 min, la membrana fue incubada con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-T 1X.

8.5.5 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti-HA (1:1000, Cell Signaling), anti TIAM1 (1:1000 Cell Signaling), anti-Phospho-PAK1 (Thr423) /PAK2 (Thr402) (1:1000 Cell Signaling), anti-Rac 3 (1:1000 Sigma aAldrich), los cuales fueron diluidos en TBS-T 1X con BSA al 2.5%. Como control de carga se emplearon los anticuerpos anti- Alpha-Actinina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA) y anti-tubulina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA) y anti-H3 (1:50000, Cell Signaling). Los anticuerpos secundarios empleados en este trabajo fueron anti-

rabbit y anti-mouse (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, USA), acoplados a peroxidasa de rábano (HRP), los cuales se diluyeron en TBS-T 1X.

8.5.6 Revelado de la presencia de proteínas

La detección de las proteínas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia de alta sensibilidad usando el reactivo ECL (Amersham). En este método el peróxido del luminol y un activador son sustratos de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario, las cuales reaccionan y producen luminiscencia. Para la detección se empleó un sistema de obtención de imágenes con el equipo iBright.

8.6 Inmunofluorescencia

Se empleó esta técnica la cual utiliza la especificidad de los anticuerpos con tintes fluorescentes para visualizar la presencia y la distribución de las oncoproteínas en el modelo celular a través de un microscopio de fluorescencia. Se sembraron células C-33 A sobre portaobjetos en placas de 6 pozos y se fijaron 24 horas post-sembrado con PBS-paraformaldehído al 3.7% durante 10 minutos y se permeabilizaron con PBS-Triton X-100 al 0.1%. Posteriormente, las células fueron tratadas con una solución de BSA al 0.3% y se incubaron toda la noche con anticuerpos anti-HA (Cell Signaling) para observar la presencia de las oncoproteínas en el modelo celular utilizado. Las células se lavaron extensivamente con PBS y luego se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo conjugados con Rhodamina o Alexa-488 (Invitrogen). Los portaobjetos se lavaron extensivamente y fueron montados utilizando el medio para tinción de núcleos DAPI (Molecular Probes).

8.7 Viabilidad celular e IC50 de EHT1864 para determinar el efecto citotóxico sobre células HaCat y células C-33A.

Se sembraron placas de 96 pozos con 10^4 células C-33 A del modelo empleado y células HaCat, para ambas se colocaron concentraciones del inhibidor EHT1864 (Sigma Aldrich) que partía de 0.33uM a 100uM. A las 24h, 48h y 72h post-tratamiento, se colocó 20uL del reactivo CellTiter 96® AQ aqueous One Solution, el cual contiene un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna; MTS] y un reactivo de acoplamiento de electrones (etosulfato de fenazina; PES). Posteriormente se incubaron las placas a 37°C durante 2 horas. Luego se registraron las absorbancias a 490 nm con un lector de placas de 96 pocillos. La cantidad de producto de formazán medida por la cantidad de absorbancia de 490 nm fue directamente proporcional al número de células vivas en cultivo.

8.8 Proliferación celular de C-33 A mediante ensayos de MTS

Se sembraron placas de 96 pozos con 10^4 células C-33 A del modelo empleado a concentraciones de 10% y 2% de SFB. A las 24h, 48h y 72h post-incubación, se colocó 20uL del reactivo CellTiter 96® AQ ueous One Solution, el cual contiene un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna; MTS] y un reactivo de acoplamiento de electrones (etosulfato de fenazina; PES). Posteriormente se incubaron las placas a 37°C durante 2 horas. Luego se registraron las absorbancias a 490 nm con un lector de placas de 96 pocillos. La cantidad de producto de formazán medida por la cantidad de absorbancia de 490 nm fue directamente proporcional al número de células vivas en cultivo.

8.9 Ensayos de cierre de herida

La migración celular se examinó mediante un ensayo de cierre de herida. Se sembraron aproximadamente 3×10^4 células en placas ibidi de 2 pozos de 35 mm de alto con medio DMEM al 2% de SFB. A las 24 h post sembrado se retiró la celda divisora de 2 pozos que forma la "herida" y se trataron con el inhibidor EHT1864. Se monitorizó la migración de las células hacia el cierre de la herida de la misma región en diferentes tiempos (0, 24 y 48h), y se adquirieron las imágenes mediante un sistema de cámara digital acoplado a un microscopio invertido de contraste de fases (Axio Vert). A continuación, se analizó y cuantificó la repoblación por células migratorias de la región de la herida utilizando el software ImageJ v1.48 (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

8.10 Análisis Estadístico

Los datos que muestran los efectos de E6 o E7 de VPH-16 en los diferentes ensayos, son presentados como promedios \pm SD. El valor de p se calculó mediante la prueba estadística t de Student no pareada de dos colas. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando *** p <0.001, ** p <0.01 y *p <0.05 comparado con el valor del vector vacío.

9 Resultados

9.1 Presencia de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16 establemente transfectadas en células C-33 A.

Previo a el cumplimiento de los objetivos propuestos, se procedió a validar el modelo experimental utilizado, el cual consiste en células de cáncer cervicouterino C-33 A (negativas a VPH) establemente transfectadas con los oncogenes E6 y E7 del VPH-16, clonados en el vector de expresión p3x-FLAG CMV-10, que permite generar proteínas de fusión con las secuencias de etiquetas Flag y HA para su inmunodetección, utilizando como control las células transfectadas con el vector vacío (p3x). Las construcciones de los plásmidos utilizados están ilustradas en la Figura 6A. Primeramente se evaluó la presencia de los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 a través de RT-PCR, observando sus productos de amplificación de ~477pb y ~297pb respectivamente (Figura 6B). Cabe mencionar que al utilizar los *primers* que flanquean la secuencia completa de E6, también se amplifican los productos de splicing alternativo del RNA llamados E6*, siendo el más abundante el transcrito E6*I detectado en 295 pb. Posteriormente utilizando extractos de proteínas totales, se evaluaron los niveles proteicos de E6 y E7 de VPH-16 realizando ensayos de inmunodetección por western blot mediante su identificación con la etiqueta HA, en donde se evidencia la presencia de dichas oncoproteínas a 23kDa y 25kDa aproximadamente, de manera similar se observa la presencia de las isoformas de E6 denominadas E6* (banda de ~15 KDa) (Figura 6C), las cuales son producto de transcritos pequeños de E6 como resultado del splicing alternativo, siendo esta una característica común de los VPH de alto riesgo (VPH-AR) (Mesplède et al., 2012). Acorde con los resultados anteriores, para confirmar la presencia y localización de dichas oncoproteínas, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, identificando a E6 y E7 de VPH-16 con la etiqueta HA en verde (Figura 6D), y se observa la presencia aparente de ambas oncoproteínas con localización predominantemente nuclear, lo que concuerda con lo antes reportado (Knapp, A. et. al. 2009) (Mesplède et al., 2012). En conjunto estos experimentos demuestran la presencia de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16 en las células C-33 A transfectadas de manera estable.

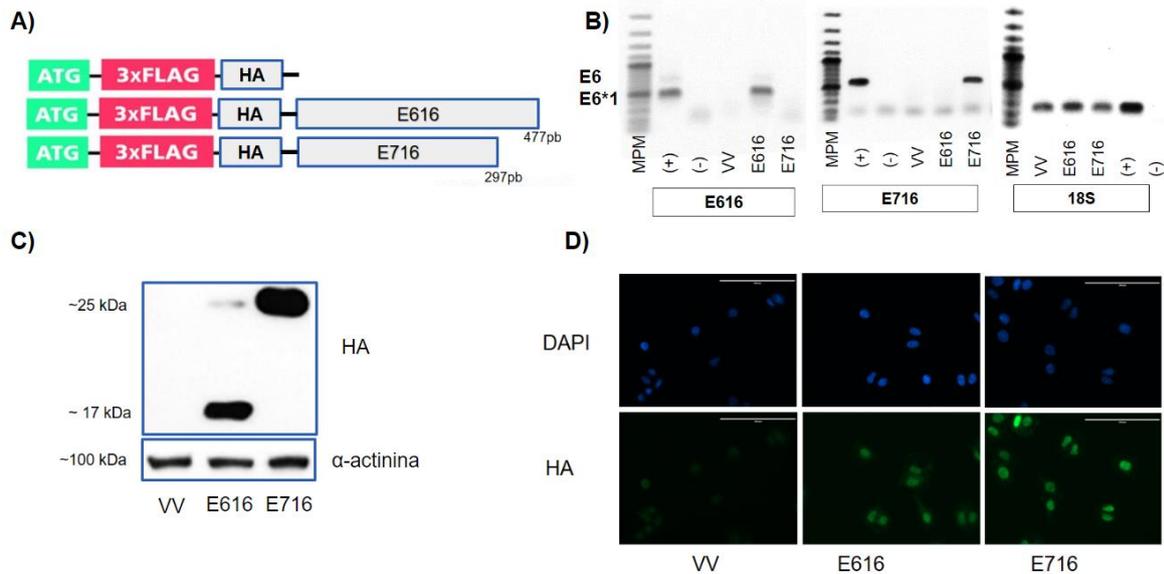


Figura 6. Presencia de E6 y E7 de VPH-16 en células C-33 A transfectadas de manera estable. (A) Ilustración de la transfección estable de los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 (de tamaños 477pb y 297pb respectivamente) clonados en el vector de expresión p3x-FLAG CMV-10. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados mediante RT-PCR de E6, E6* y E7 de VPH-16 (~477, ~295 y ~ 297 pb respectivamente), utilizando como control endógeno el gen para la subunidad ribosomal 18S: (MPM) Marcador de 100 pb; (-) control negativo H₂O; (+) control positivo cDNA a partir de células CaSki positivas al VPH-16, (VV) vector vacío. (C) Niveles proteicos de E6 y E7 de VPH-16 mediante inmunodetección por western blot utilizando anticuerpos para la etiqueta HA y α -actinina como control de carga: (VV) vector vacío; E616, E6*16 y E716 (bandas de ~23, ~15 y ~ 25 kDa respectivamente). (D) Localización y presencia, mediante inmunofluorescencia, de E6 y E7 de VPH-16 utilizando anticuerpos para la etiqueta HA (verde) y núcleos teñidos con DAPI (azul).

9.2 E7 de VPH16 aumenta los niveles de mRNA del GEF TIAM 1, mientras que E6 de VPH 16 disminuye los niveles de mRNA de GEF P-REX1.

Diversas moléculas inducen la activación de las señalizaciones mediadas por las Rac GTPasas, las cuales dependen de la señalización de factores de crecimiento, quimiocinas y receptores de adherencia, que generan a su vez la activación de los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) (Wertheimer, E. et. al. 2012). Los GEF inducen la disociación de GDP y permiten la formación de un complejo activo con las Rac GTPasas unidas a GTP. (Cherfils, J. et. al. 2013). De esta manera, nos interesó analizar el efecto de los oncogenes E6 y E7 sobre los niveles de mRNA de TIAM1, PREX1 y VAV2.

Una vez establecido el modelo celular, se emplearon células C-33 A establemente transfectadas con las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16, utilizando como control al vector vacío p3x y se realizó qPCR para evaluar los niveles de mRNA de los GEF: TIAM1, P-REX1 y VAV2. De manera interesante se observó que la presencia de la oncoproteína E7 de VPH16

aumenta significativamente los niveles de mRNA de TIAM1 (Figura 7A), mientras que de manera independiente E6 de VPH-16 disminuye significativamente los niveles de mRNA del GEF P-REX1 (Figura 7B). Por otra parte, estas oncoproteínas no causan un efecto en los niveles de mRNA del GEF VAV2 (Figura 7C). Partiendo de los resultados anteriores, se evaluaron los niveles proteicos de TIAM1 en extractos totales, por lo que se realizó inmunodetección por western blot, utilizando como control de carga α -tubulina, y se observó que las proteínas E6 y E7 de VPH-16 no afectan los niveles proteicos de TIAM1 comparado con el vector vacío (Figura 7D y 7E). Estos resultados sugieren que ambas oncoproteínas juegan un papel clave en la regulación de los niveles de mRNA de TIAM1 y P-REX1; sin embargo, esto no afecta los niveles proteicos de TIAM1. Por otra parte, después de comprobar que E6 abate los niveles de mRNA de P-REX1, se pretenderá eventualmente evaluar su participación sobre los niveles proteicos de este GEF en el modelo celular.

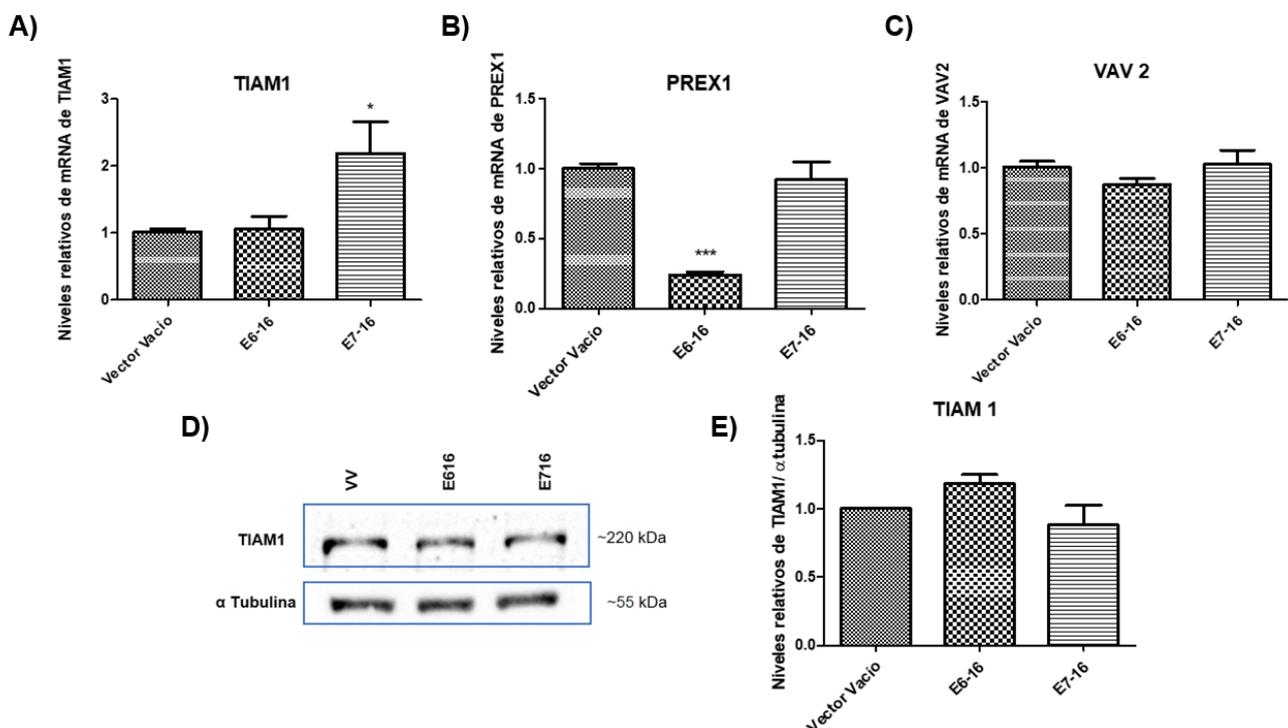


Figura 7. E7 de VPH16 aumenta los niveles de mRNA del GEF TIAM 1, mientras que la presencia de E6 de VPH 16 disminuye los niveles de mRNA del GEF P-REX1.

(A) Gráfica representativa del análisis de los niveles de mRNA de TIAM1, (B) P-REX1 y (C) VAV2 mediante qPCR, los resultados se presentan como cuantificación relativa utilizando el método $\Delta\Delta Ct$, las barras representan la media \pm D.E de los datos de 3 experimentos independientes. Se realizó el análisis estadístico con la prueba t de Student no pareada de dos colas, *** $p < 0.001$ y * $p < 0.05$ comparado con el valor del vector vacío. (D, E) Imagen representativa y gráfica de análisis densitométrico correspondiente de los niveles proteicos mediante inmunodetección por western blot para TIAM1 (~220kDa) y α -tubulina (~55kDa) como control de carga. En el análisis densitométrico se utilizó el software Image J, los datos de tres experimentos independientes fueron promediados y graficados mostrando la media \pm D.E.

9.3 E7 de VPH-16 aumenta los niveles de mRNA de Rac1, Rac 1b, mientras que E6 y E7 de VPH-16 aumentan los niveles de mRNA de Rac3.

Con base en los resultados anteriores, donde se observó que las oncoproteínas cambian los niveles de mRNA de algunos GEF, nos preguntamos si también afectan los niveles de mRNA las Rac GTPasas que, al ser traducidas, son sus blancos de activación río abajo. Las GTPasas actúan como interruptores moleculares que, por efecto de los GEF, oscilan entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP. En su forma activa, desencadenan una señalización clave en procesos celulares que involucran el reordenamiento del citoesqueleto de actina, adhesión celular, migración, proliferación, supervivencia, diferenciación e incluso transformación maligna. (Cherfils, J. et. al. 2013; Parri, M., et, al., 2010). Debido a su importante rol en la célula, se procedió a evaluar los niveles de mRNA y proteicos de las Rac GTPasas.

Se utilizaron células C-33 A establemente transfectadas con las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16, para lo cual se usó como control la transfección con el vector vacío p3x, posteriormente se realizó qPCR para evaluar los niveles de mRNA de los transcritos de las Rac GTPasas 1, 1b, 2 y 3. Observamos que la presencia de E7 de VPH-16 aumenta significativamente los niveles de mRNA de Rac1 Total (Rac1T) (Figura 8A), lo que corresponde a los transcritos Rac1 y Rac1b. Para la amplificación de Rac 1T, se diseñaron *primers* que permiten detectar el transcrito de Rac1 que está conformado por 7 exones, así como su variante de splicing Rac 1b, el cual contiene 8 exones (Figura 8E), este exón adicional le confiere activación constitutiva y se ha reportado sobre-expresada en cánceres de colon y mama (Parri, M., & Chiarugi, P. 2010), por lo que fue de interés evaluar su expresión en este modelo celular de cáncer de cérvix. Con base en los resultados anteriores, se pretendió discernir si el fenómeno de aumento de expresión causado por E7 de VPH-16 corresponde a uno o ambos transcritos que conforman a Rac1T, de manera que se evaluó específicamente los niveles de mRNA de Rac1 y de Rac1b. Interesantemente se observó que el transcrito de Rac1, así como de Rac 1b aumentan significativamente sus niveles en presencia de E7 de VPH16. (Figura 8B y 8C). Lo anterior se logró con ayuda de *primers* que fueron diseñados para flanquear una secuencia única de cada gen, en el caso de Rac 1, se usaron *primers* que flanquean una unión exón-exón, la cual en Rac1b se encuentra separada por un exón adicional, por otra parte, para el caso de Rac1b, se usaron *primers* que permiten amplificar la secuencia del exón adicional que contiene únicamente esta variante de splicing (Figura 8F). Por otra parte, de manera interesante se encontró que el mRNA de Rac3 se encontraba aumentado en presencia de las oncoproteínas E6 o E7 de VPH-16 (Figura 8D). Es importante mencionar que, el transcrito de Rac2 no fue detectada con los *primers* usados,

debido a que, como se ha reportado previamente, este gen se encuentra metilado a nivel DNA en células no hematopoyéticas (Parri, M., & Chiarugi, P. 2010).

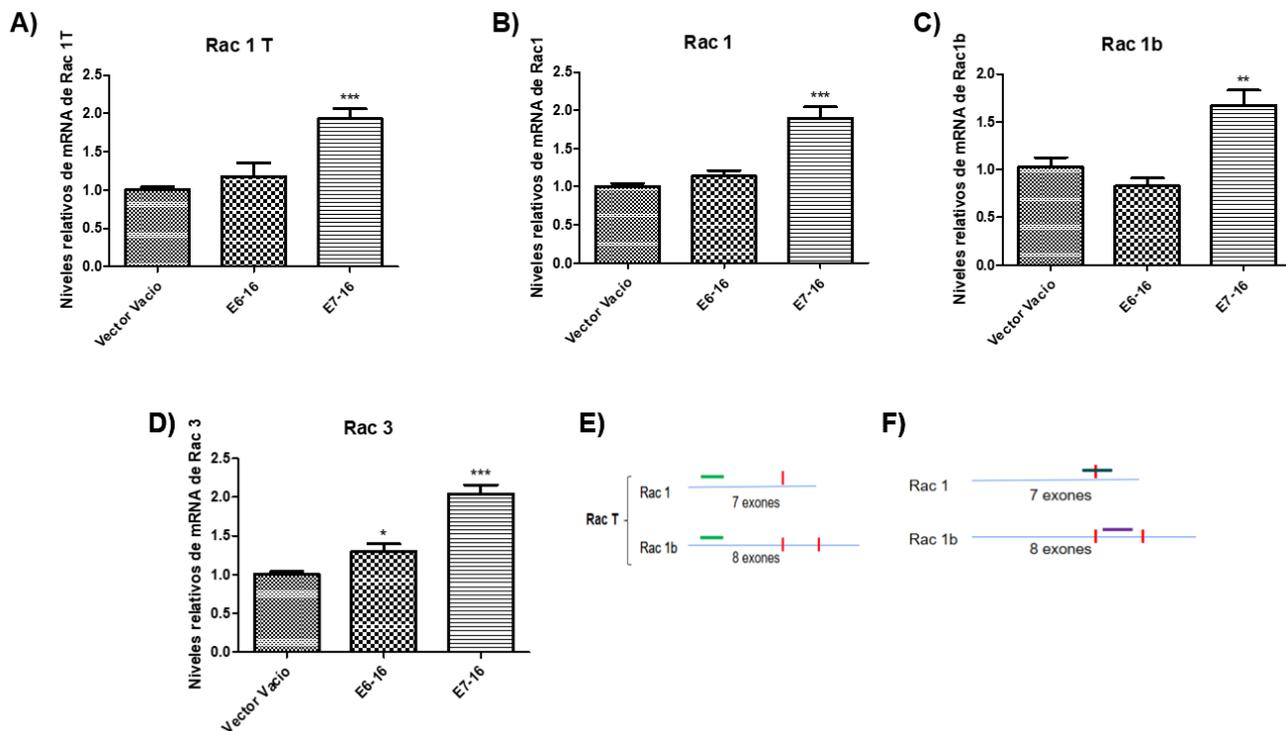


Figura 8. E7 de VPH16 aumenta los niveles de mRNA de Rac 1 y Rac 1b, mientras que E6 o E7 de VPH-16 aumentan los niveles de mRNA de Rac3.

(A) Gráfica representativa del análisis de los niveles de mRNA de Rac1 T, (B) Rac1, (C) Rac1b y (D) Rac3 mediante qPCR, los resultados se presentan como cuantificación relativa utilizando el método $\Delta\Delta Ct$, las barras representan la media \pm D.E de los datos (n=3). Se realizó la prueba estadística t de Student no pareada de dos colas, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ comparado con el valor del vector vacío. (E) Esquema representativo que muestra la región que amplifican los *primers* usados (verde) dentro de la secuencia de Rac1 y Rac1b (ambas en azul), así como la representación de unión exón-exón de Rac1 y el exón adicional Rac 1b (ambas en rojo). (F) Esquema representativo que muestra la región que amplifican los *primers* usados para Rac1 (verde) y Rac1b (morado) dentro de sus secuencias (ambas en azul), así como la representación de unión exón-exón de Rac1 y el exón adicional Rac 1b (ambas en rojo).

Después de observar que las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16 aumentan los niveles de mRNA de Rac 1, 1b y 3, se pretendió evaluar los niveles proteicos de estas isoformas empleando inmunodetección por western blot, para lo cual se usaron extractos totales del mismo modelo celular y se utilizó el anticuerpo Rac1/2/3. De manera interesante, se observa una tendencia de aumento en los niveles proteicos de Rac 1/2/3 en presencia de E7 de VPH-16. No obstante, no se encontraron cambios significativos (Figura 9A y 9B). Cabe señalar que el anticuerpo detecta las 3 isoformas, por lo que posteriormente se usó un anticuerpo para Rac1 (Figura 9C y 9D) y otro para Rac 3 (Figura 9E y 9F), y de manera similar se observa una tendencia en aumento en los niveles proteicos de Rac 1 en presencia de E6-VPH-16, sin

embargo, no se observaron cambios estadísticamente significativos en ambos niveles proteicos en presencia de las oncoproteínas comparando con el vector vacío p3x

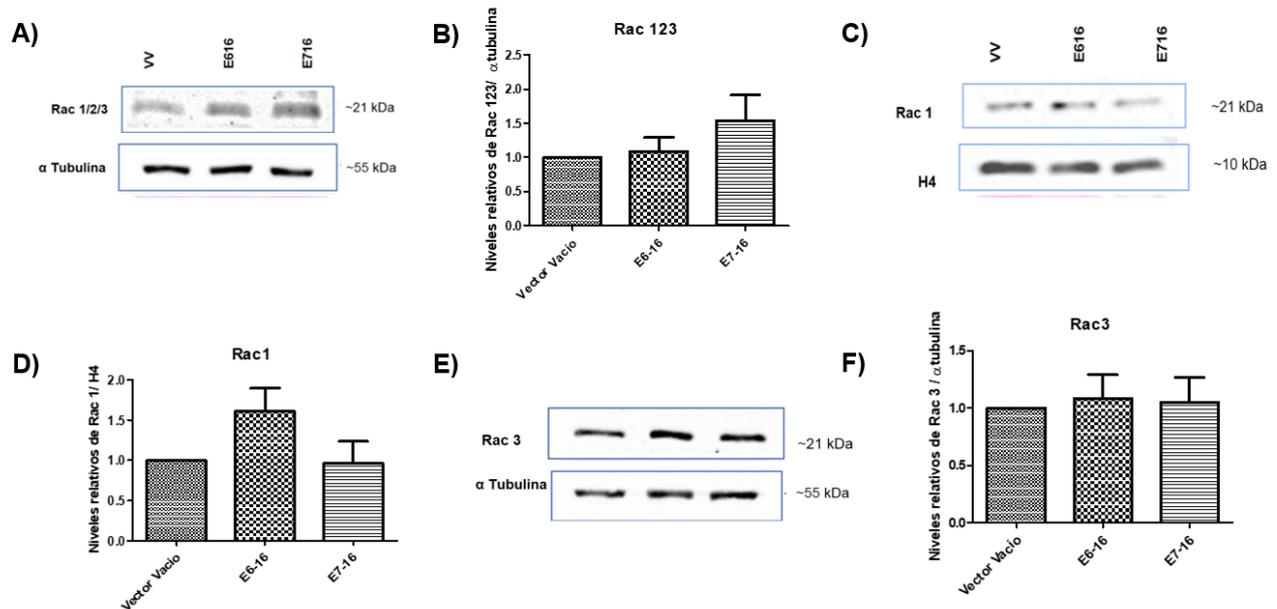


Figura 9. Niveles proteicos de Rac GTPasas en presencia de E6 y E7 de VPH-16.

(A, B) Imagen representativa y gráfica de análisis densitométrico correspondiente de los niveles proteicos mediante inmunodetección por western blot para Rac 1/2/3, (C, D) Rac 1 y (E, F) Rac 3 (~21kDa), utilizando como control de carga α -tubulina (~55kDa) e Histona 4 (~10kDa). En el análisis densitométrico se utilizó el software Image J, los datos de tres experimentos independientes fueron promediados y graficados mostrando la media \pm D.E.

9.4 E7 de VPH-16 aumenta los niveles de mRNA de LIMK 1 y cofilina 1

La regulación de la dinámica del citoesqueleto es esencial para el mantenimiento de la morfología celular, polaridad, adhesión y migración (Parri, M., et al., 2010). El control de la reorganización del citoesqueleto a través de las Rac GTPasas implica principalmente la activación de su efector PAK que a su vez genera una cascada de señalización que activa a cinasas río abajo incluyendo LIMK1, la cual fosforila e inactiva a cofilina1, proceso que da como resultado finalmente la supresión del desensamblaje de los filamentos de actina en el filipodio (Parri, M., et al., 2010). Es por eso por lo que se evaluó la expresión del eje río abajo PAK/LIMK1/Cofilina1 en el modelo celular utilizado.

La cinasa PAK se encuentra como homodímero auto inhibido. De manera que la unión de la GTPasa interrumpe esta autoinhibición y conduce a la dimerización y trans-autofosforilación que resulta en su activación completa (Sorrell, F. et al., 2019). De este modo, las isoformas de PAK activas estarán fosforiladas en residuos de treonina homólogos T423, T402 y T421 respectivamente para PAK 1, 2 y 3. Después de observar que las oncoproteínas E6 o E7 de

VPH-16 aumentan los niveles de mRNA de Rac 1, 1b y 3, se pretendió evaluar a fosfo-PAK1-2 como uno de los principales efectores de su vía, de manera que se utilizaron extractos de proteínas totales del mismo modelo celular empleando western blot, para lo cual se eligió el anticuerpo P-Pak1/2 (T423/T402). Como resultado, no se observaron cambios significativos en los niveles proteicos de las fosfo-formas Pak1/2/3 en presencia de las oncoproteínas (Figura 10A y 10B). Sin embargo, aún es necesario evaluar los niveles de Pak 1, 2 y 3 totales comparados con los niveles fosforilados para determinar de forma más precisa si las cinasas se encuentran activas.

Por otro lado, previamente se observó aumento en los niveles de mRNA de LIMK1 en el transcriptoma del modelo celular en presencia de E6 o E7 de VPH-16, por lo que se realizó qPCR para evaluar los niveles de mRNA de LIMK1 y así también el mRNA de cofilina1. De manera interesante se observó que la presencia de la oncoproteína E7 de VPH16 aumenta significativamente los niveles de mRNA de LIMK1 (Figura 10C) y de cofilina 1 (Figura 10D).

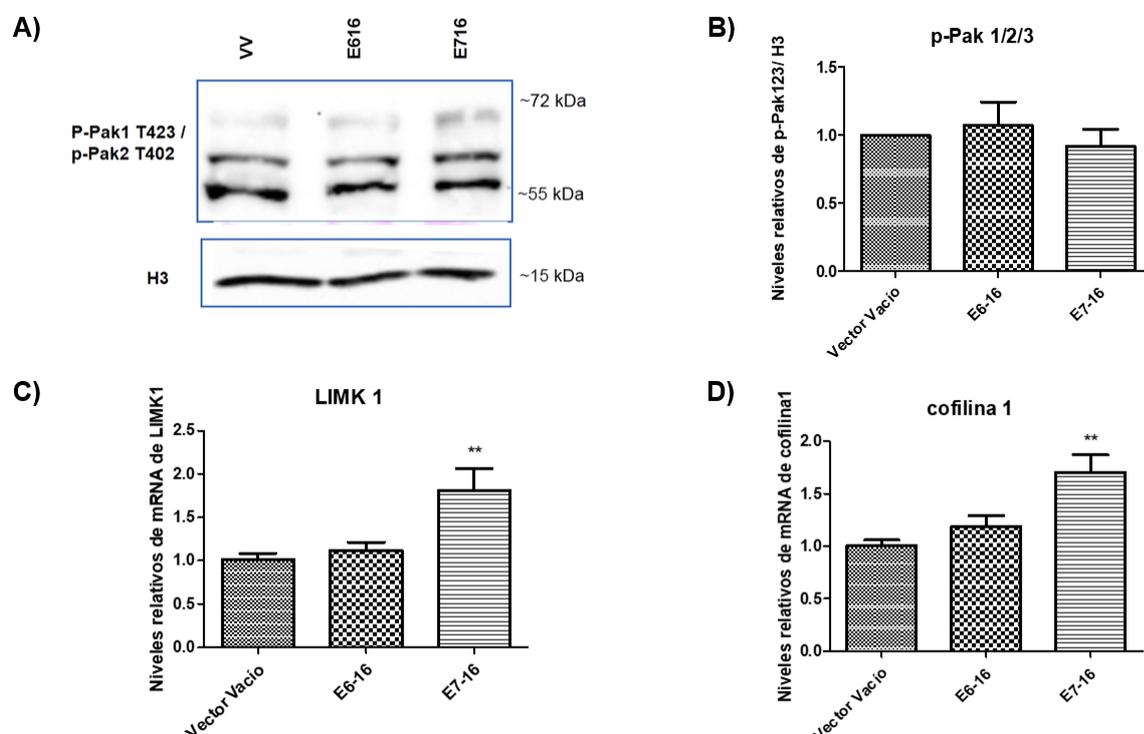


Figura 10. E7 de VPH-16 aumenta los niveles de mRNA de LIMK 1 y cofilina 1

(A, B) Imagen representativa y gráfica de análisis densitométrico correspondiente de los niveles proteicos mediante inmunodetección por western blot para P-Pak1/2 T423/T402 (~55-72 kDa) utilizando como control de carga Histona 3 (~15kDa). En el análisis densitométrico se utilizó el software Image J, los datos de tres experimentos independientes fueron promediados y graficados mostrando la media \pm D.E.. (C) Gráfica representativa del análisis de los niveles de mRNA de LIMK1 y (D) Cofilina1 mediante qPCR, los resultados se presentan como cuantificación relativa utilizando el método $\Delta\Delta Ct$, las barras representan la media \pm D.E de los datos (n=3). Se realizó la prueba estadística t de Student no pareada de dos colas, ** p <0.01 comparado con el valor del vector vacío.

9.5 IC50 de EHT 1864 para la viabilidad de células C-33 A establemente transfectadas con E6 o E7 de VPH-16 y de células HaCat.

Los resultados anteriores señalan que la presencia de las oncoproteínas no afecta de manera significativa los niveles proteicos de Rac GTPasas, sin embargo, la actividad de las GTPasas no depende de su nivel proteico, más bien de la unión con GTP. Con el fin de dar cumplimiento a los objetivos propuestos, se pretendió evaluar la participación de las oncoproteínas sobre la actividad de las Rac GTPasas en el proceso de migración celular. Por lo que se adquirió el inhibidor EHT 1864, el cual coloca a las GTPasas de la familia Rac (Rac1, 1b,2 y 3) en un estado inerte e inactivo, alterando su función y su señalización río abajo mediante un mecanismo novedoso que implica el desplazamiento del nucleótido de guanina (Figura 11A). Primeramente, se calculó la concentración inhibitoria 50 (IC50) para la muerte celular mediante ensayos de viabilidad celular (MTS) sobre el modelo de células C-33 A en presencia de E6 o E7 de VPH-16, así también se decidió evaluar la IC50 del mismo parámetro en células no tumorigénicas HaCat, correspondiente a una línea celular humana de queratinocitos inmortalizados. Se emplearon células no tumorigénicas para evaluar si el fármaco producía porcentajes de viabilidad celular disminuidas en células no cancerosas comparado con el modelo celular empleado de C-33 A, lo cual sería un mal pronóstico para su uso en experimentos posteriores, como en modelos in vivo, encaminados a formar parte de una terapia efectiva en CC.

Como resultado se obtuvo una IC50 de 15.13uM, 13.31uM, 11.67uM y 45.92uM de EHT1864 para células C-33A con el vector vacío, E6 o E7 de VPH-16 y células HaCat respectivamente, que corresponde a las 24 horas post tratamiento (Figura 11B). De manera similar se obtuvo una IC50 de 13.24uM, 11.42uM, 10.73uM y 37.06uM de EHT1864 para células C-33A con el vector vacío, E6 o E7 de VPH-16 y células HaCat respectivamente, que corresponde a las 48 horas post tratamiento (Figura 11C). Y finalmente se encontraron las IC50 de 12.15uM, 11.31uM, 10.63uM y 30.03uM de EHT1864 para células C-33A con el vector vacío, E6 o E7 de VPH-16 y células HaCat respectivamente, que corresponde a las 72 horas post tratamiento (Figura 11D). Estos resultados sugieren que tras el tratamiento con el inhibidor EHT1864, las células C-33 A, así como las células transfectadas con E6 o E7 de VPH-16, tienen porcentajes de viabilidad celular menores que las células no tumorigénicas HaCat.

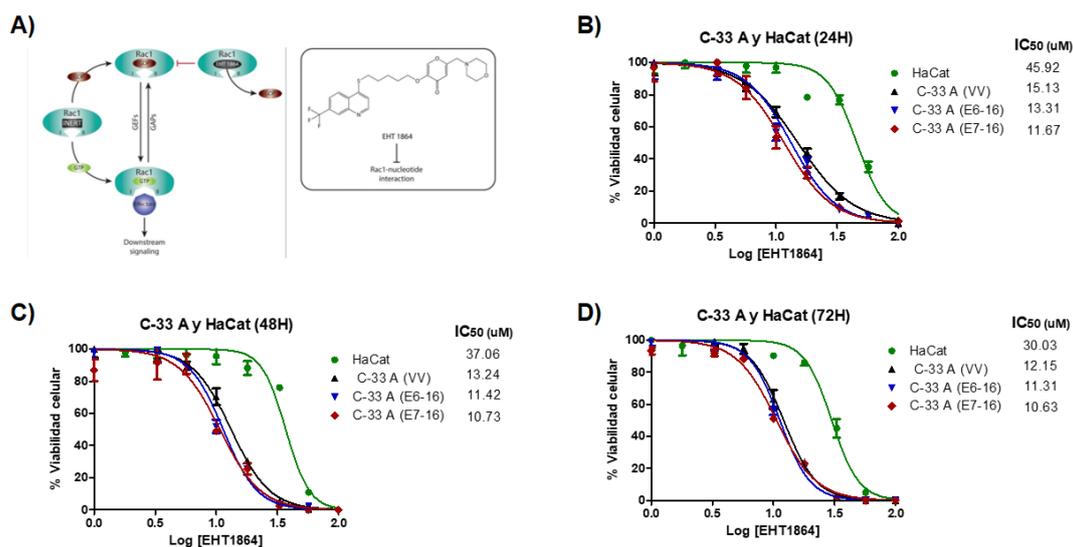


Figura 11. IC50 de EHT 1864 en células C-33 A establemente transfectadas con E6 o E7 de VPH-16 y células HaCat.

(A) Imagen que ilustra la estructura y el mecanismo molecular de desplazamiento del GTP por la molécula pequeña EHT1864 para la formación de Rac GTPasa inactiva. (B) Gráfica que ilustra la IC50 de EHT1864 para células C-33A con el vector vacío (línea negra), E6 (línea azul) o E7 (línea roja) de VPH-16 y HaCat (línea verde) respectivamente correspondiente a las 24 horas, (C) 48 horas y (D) 72 horas de tratamiento. Las barras representan la media \pm D.E de los datos (n=8) de un experimento.

9.6 Proliferación de células C-33 A establemente transfectadas con E6 o E7 de VPH-16.

Se evaluó la participación de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16 sobre la proliferación de C-33 A con tiempos de 24h, 48h y 72h empleando concentraciones de suero fetal bovino (SFB) del 10% y 2%. De manera interesante, observamos que en condiciones de SFB al 10%, ambas oncoproteínas aumentan significativamente la proliferación celular desde las 24h de incubación comparado con el vector vacío (VV) (Figura 12). Lo anterior es concordante con diversos reportes que demuestran el papel de las oncoproteínas de VPH-16 sobre el aumento en la proliferación celular, impulsando la progresión del cáncer (Pal, A., & Kundu, R. 2020). Por otro lado, encontramos que al emplear SFB al 2% se observan porcentajes de proliferación similares entre las células C-33 A transfectadas con el vector vacío, E6 y E7 de VPH-16 a los tiempos evaluados. No obstante, el breve aumento en la proliferación celular por E6 y E7 de VPH-16 son estadísticamente significativos desde las 48h de incubación comparado con el VV al 2% de SFB (Figura 12). Cabe señalar que sólo se realizó un experimento, no obstante, se observa una disminución drástica de la proliferación entre las células C-33 A con SFB al 2% en comparación con las células en condiciones de SFB al 10%.

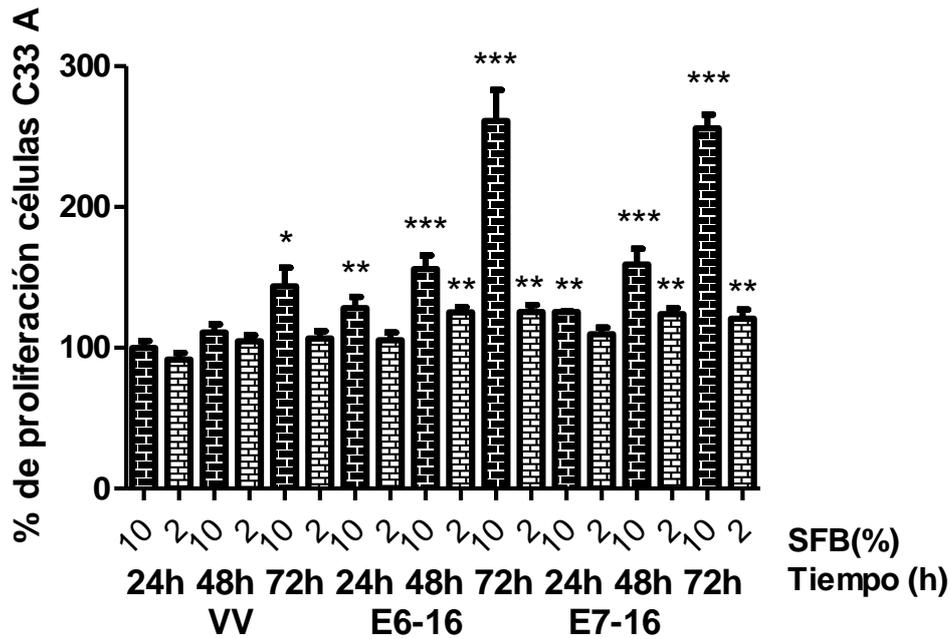


Figura 12. Proliferación de células C-33 A.

Gráfica que muestra el porcentaje de proliferación de células C-33 A, empleando concentraciones del 2% y 10% de SFB a las 24 horas, 48 horas y 72 horas. Las barras representan la media \pm D.E de los datos (n=5) de un experimento. Se realizó la prueba estadística t de Student no pareada de dos colas, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ comparado con el valor del vector vacío correspondiente a la concentración de SFB empleado.

9.7 E6 o E7 de VPH-16 aumentan la migración de manera dependiente de Rac GTPasas.

Tras descartar algún efecto de las oncoproteínas en los niveles proteicos de las Rac GTPasas y sus efectores, nos preguntamos si la presencia de las oncoproteínas E6 o E7 de VPH-16 afectan la actividad de las Rac GTPasas en procesos de migración celular. Con base en los resultados anteriores, se determinaron las condiciones ideales para evaluar la migración celular mediante el ensayo de cierre de herida, de modo que se disminuyó la proliferación celular al máximo, sin afectar la viabilidad celular. Por lo que se utilizó la IC40 de EHT1864 correspondiente a las 24 h de tratamiento para cada línea celular con SFB al 2%. Cabe señalar que, al emplear concentraciones menores del 2% de SFB, hallamos muerte celular desde las 24h post tratamiento con el inhibidor EHT1864.

De manera interesante, se observó que la presencia de las oncoproteínas E6 o E7 de VPH-16 en el control sin tratamiento (E6-, E7-), aumentan significativamente la migración a las 24 y 48 horas en comparación con el control del vector vacío sin tratamiento (VV-) (Figura 13 A y 13 B) Estos datos son congruentes con diversos estudios que subrayan el efecto de las oncoproteínas en la señalización de múltiples vías que subyacen y favorecen los procesos migratorios celulares (Vats, A., et. al. 2021). Por otra parte, este aumento observado en la

migración con el control sin tratamiento en presencia de E6 o E7 de VPH-16 (E6-, E7-), se vio significativamente disminuido tras el tratamiento con el inhibidor EHT1864 (E6+, E7+). Sin embargo, la migración de las células con el vector vacío sin tratamiento (VV-), no se vio alterada tras el tratamiento con el inhibidor EHT1864 (VV+). De este modo se observó que las oncoproteínas E6 o E7 de VPH-16 aumentan la migración de manera dependiente a la actividad de las Rac GTPasas (Figura 13 A y B).

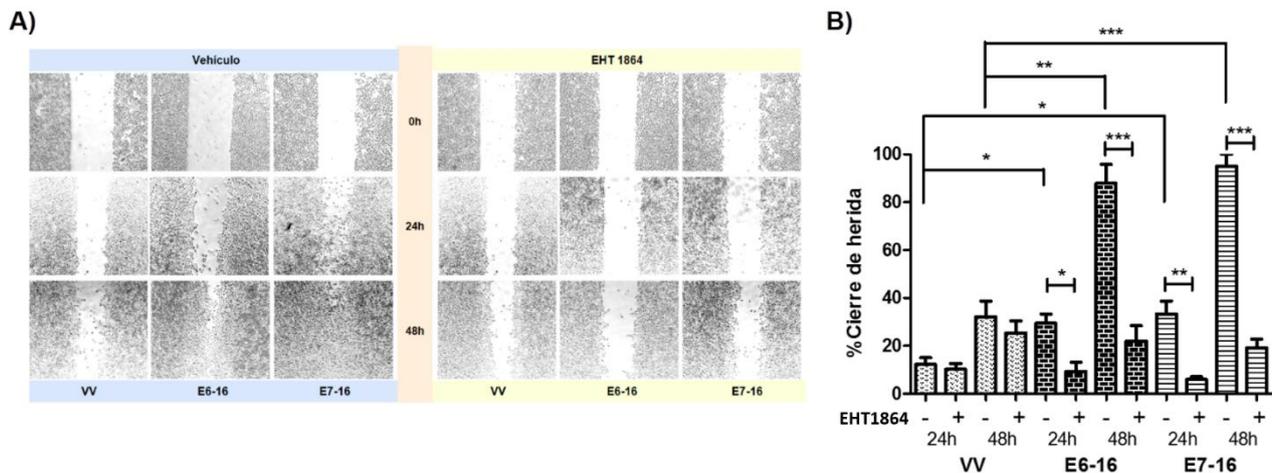


Figura 13. E6 o E7 de VPH-16 aumentan la migración de manera dependiente de Rac GTPasas. (A) Imagen representativa de ensayos de migración por cierre de herida en presencia del inhibidor EHT1864 (amarillo) o con el control vehículo (azul). Imágenes tomadas con microscopio invertido de contraste de fases a las 0h, 24h y 48h. (B) Gráfica que muestra el porcentaje de cierre de herida a los tiempos evaluados; control vehículo (-), tratamiento con EHT1864 (+). Todos los resultados se presentan como el promedio de 4 experimentos independientes, las barras representan la media \pm D.E. Se realizó la prueba estadística t de Student no pareada de dos colas, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ comparado con el valor del vector vacío.

10 Discusión de resultados

Las Rac GTPasas, a través de su señalización río abajo, regulan procesos celulares que involucran el reordenamiento del citoesqueleto de actina, adhesión celular, migración, proliferación, supervivencia, diferenciación e incluso transformación maligna (Parri, M., et al., 2010). Las alteraciones de las Rac GTPasas y sus GEF se han descrito en varios tipos de cáncer humanos, y en algunos casos su sobreexpresión se asocia con la progresión tumoral metastásica y mal pronóstico en cáncer de mama, pulmón, testículo, ovario, melanoma, entre otros (Wertheimer, E. et al. 2012; Kawazu, M., et al., 2013; Marei, H. et al., 2017; Cooke, M., et al., 2020; Casado-Medrano, V. et al. 2018). Sin embargo, se sabe poco sobre el papel de las Rac-GTPasas en el CC.

Xu, A. et. al. en el 2013, demostraron que el abatimiento de Rac1 con shRNA en células HeLa positivas a VPH-18, disminuye la invasión celular, la proliferación y aumenta la quimiosensibilidad al cisplatino. Por otro lado, Mendoza-Catalan M. et. al. en el 2012, encontraron que las GTPasas Rac1 y el GEF TIAM1 aumentan en lesiones intraepiteliales (SIL), y que la expresión alterada de TIAM1 se correlaciona con la infección por VPH-AR. Lo que sugiere que Rac1 es importante en la progresión del CC. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar si el aumento de los niveles proteicos de Rac y sus GEF es el resultado de un evento secundario relacionado con la progresión de la malignidad o es inducido directamente por las oncoproteínas del VPH-AR.

De manera interesante Olmedo-Nieva, L. et. al. en el 2022, analizaron los perfiles de expresión dependientes de las oncoproteínas E6 y E7 en líneas celulares de CC, así como su relación en vías de señalización celular y procesos biológicos involucrados con uniones adherentes, adhesiones focales y polimerización de actina. Dentro de este estudio, datos procedentes de RNAseq en células C-33 A establemente transfectadas con E6 y E7 de VPH-16, mostraron de manera interesante que la presencia de las oncoproteínas aumentó los niveles de mRNA de TIAM1, Rac3 y LIMK1. Del mismo modo la presencia de E7 de VPH-16 aumentó la el mRNA de VAV2, mientras que E6 de VPH-16 disminuyó el mRNA de P-REX1 en el mismo modelo celular. Partiendo de esto, en el presente trabajo se utilizó el mismo modelo celular para evaluar el efecto específico de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16 sobre la señalización de las Rac GTPasas. De manera interesante validamos que la presencia de E7 de VPH-16 aumenta los niveles de mRNA de TIAM1, Rac1,1b y 3, así como de elementos de la vía río abajo, tal como LIMK1 y cofilina1. De manera similar, la presencia de E6 de VPH-16 aumentó la expresión del transcrito Rac3 y disminuyó el transcrito de P-REX1.

Actualmente se conoce que la expresión de PREX1 en muchos tipos de cáncer humanos ocurre a través de cambios en la regulación epigenética y estudios recientes revelaron que en células y tumores de cáncer de mama hay una correlación inversa entre la metilación en las islas CpG del promotor de PREX1 y la expresión del gen (Barrio-Real, L. et. al. 2014). Por otro lado, se ha descrito un mecanismo de silenciamiento génico mediado por E6 HPV-16 en CC, el cual ocurre a través de la sobreexpresión de la DNA metil transferasa 1 (DNMT1), el mecanismo implica la degradación de p53 y la liberación de Sp1. La sobreexpresión de DNMT1 provoca la hipermetilación de las islas CpG en la región promotora de diversos genes supresores de tumores, lo cual favorece al mantenimiento de la neoplasia (Au Yeung, CL. et. al. 2010). Por lo que es posible que la presencia de E6 de VPH-16 pudiera disminuir la expresión de PREX1 por mecanismos epigenéticos preferentes, aunque cabe señalar que los mecanismos epigenéticos son muy amplios y se necesitaría hacer diversos ensayos para

probar esta hipótesis. Por ejemplo, se podría evaluar primeramente los niveles de metilación en la secuencia de PREX1, así como en su región promotora mediante métodos de secuenciación genómica con bisulfito y pirosecuenciación en presencia o ausencia de las oncoproteínas. Aunado a esto, resultaría interesante para experimentos posteriores analizar los niveles proteicos de PREX1, así como su activación, para proporcionar más información sobre esta firma característica en el modelo utilizado, lo que explicaría mejor el rol de las oncoproteínas E6 y E7 VPH-16 sobre la expresión y señalización de PREX1.

Por otro lado, no se ha reportado un mecanismo epigenético preferente en la regulación de la expresión de TIAM1; sin embargo, se sabe que TIAM1 está elevado en varias neoplasias malignas, como linfoma, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, así como en CC (Yang, Y., et. al. 2018), contribuyendo en una serie de procesos involucrados en la progresión tumoral, incluida la apoptosis, la linfangiogénesis, la migración y metástasis (Mendoza-Catalan. et. al. 2012; Yang, Y., et. al. 2018; Lawson C. et. al., 2018). No obstante, se ha encontrado que la proteína de unión C-terminal CtBP2, promueve la migración de células cancerosas humanas mediante la activación transcripcional de TIAM1 (Paliwal, S., et.al. 2012). Así mismo, recientemente se ha encontrado que este regulador transcripcional se encuentra significativamente sobreexpresado en tejidos de pacientes con CC, en comparación con las pacientes con tejido de cuello uterino normal sin VPH (Chen, M., et. al. 2020). Sin embargo, no es posible establecer por ahora una relación entre la sobreexpresión observada de TIAM1 o su regulación mediante CtBP2 en el modelo celular utilizado, debido a que los mecanismos por los cuales la proteína E7 de VPH-16 participa en los procesos de regulación de TIAM1 permanecen desconocidos. En este sentido, otra hipótesis que pudiera explicar el aumento del gen TIAM1 por la presencia de E7 de VPH-16 es a través del factor de transcripción STAT3. Un interesante estudio señala que STAT3 se une al promotor TIAM1 promoviendo su transcripción activa (Buttrick, T., et. al. 2020). Curiosamente los datos del RNAseq del modelo celular empleado en el presente trabajo (Olmedo-Nieva, et. al. 2022), señalan que la presencia de E7 de VPH-16 aumenta los niveles de expresión de STAT3. No obstante, es importante mencionar que Buttrick y colaboradores en el 2020 emplearon para su estudio un modelo con células Th17. Sin embargo, esto abre la oportunidad a estudios posteriores para evaluar el posible mecanismo de E7 de VPH-16 en la regulación transcripcional de TIAM1 mediada por STAT3.

A pesar de que la regulación en la expresión de los genes de las Rac GTPasas no está clara, se ha descrito que los niveles de expresión de RAC3 aumentan a través de una acción directa de NF- κ B sobre el promotor del gen RAC3 tanto *in vitro* como *in vivo*, encontrando así que el promotor de RAC3 tiene una secuencia diana funcional específica para la unión de NF- κ B

(Alvarado, C. et. al. 2014). De manera interesante, otros estudios señalan que RAC3 es un blanco del factor de transcripción E2F para la regulación de su expresión, así mismo funciona como un coactivador de este para promover la progresión del ciclo celular (Gjoerup, O.et.al. 1998). Por otro lado, se conoce que las oncoproteínas E6 y E7 modulan la actividad de la vía de NF- κ B regulando diversos procesos tal como crecimiento celular, supervivencia y la respuesta inmunitaria (Vandermark, E. et. al. 2012). Así mismo E7 promueve la liberación del factor de transcripción E2F a través de la degradación de pRB (Narisawa-Saito, M., et. al. 2007; Yuan, H. et al. 2009). De manera concordante, datos de RNAseq del modelo celular empleado (Olmedo-Nieva. L., et. al. 2022) señalan que ambas oncoproteínas aumentan los niveles de expresión de los miembros de la familia de factores de transcripción E2F (E2F1 y E2F8) así como de NF- κ B (NFK1B y la subunidad NFKB2), por lo tanto, es posible que dichos elementos pudieran participar como factores de transcripción para promover la sobreexpresión observada del gen RAC3 en presencia de ambas oncoproteínas. No obstante, es necesario realizar más estudios para poder establecer dicha relación, así como analizar otros posibles mecanismos dentro de los niveles de regulación transcripcional, potenciadores o represores de su transcripción, eventos en la maduración del mRNA, así como eventos epigenéticos, entre muchos otros posibles.

Por otro lado, no se tiene información sobre la regulación en la expresión de Rac1; sin embargo, se sabe que su promotor tiene características similares a un gen *housekeeping*: una región promotora proximal sin TATA/CCAAT de tamaño pequeño, alto contenido de GC y una pequeña cantidad de secuencias consenso conocidas para factores de transcripción como c-Jun/c-Fos (AP1, AP2, AP4), Ikaros, E2F-2, Sp1 y MZF1 (Benitah, S. et. al. 2004). Curiosamente algunos de estos factores de transcripción son modulados por la oncoproteína E7 de VPH-AR. (McCaffrey, J. et. al. 1999; Peralta-Zaragoza, O. et. al. 2006; Yuan, H. et al. 2009). Debido a que las oncoproteínas alteran una plétora de mecanismos en la célula que modulan la expresión de genes, incluida la regulación epigenética (Narisawa-Saito, M., et. al. 2007), resulta complicado encontrar una asociación directa entre los niveles de expresión de los genes analizados y la presencia de estas oncoproteínas; sin embargo, estos resultados pueden aportar información para el entendimiento de estos mecanismos a través de E6 y E7 de VPH-16 en estudios posteriores.

Se ha demostrado que la expresión de LIMK1, el cual es un efector de las Rac GTPasas, estaba regulada positivamente o activada anormalmente en varios tipos de cáncer, incluidos el cáncer de mama, próstata, colorrectal, gástrico y pulmón (Lu, G. et. al. 2021; Yang, X. et. al. 2021). Así mismo se ha reportado que los niveles de expresión de mRNA y proteína de LIMK1 estaban regulados positivamente en los tejidos y células de CC en comparación con

los tejidos sanos adyacentes y las células epiteliales cervicouterinas normales, respectivamente (Yang, X. et. al. 2021; Pappa, K. et. al. 2017). En este sentido, se describió que uno de los mecanismos de la regulación en la expresión de LIMK1 es a través de RNA no codificantes, particularmente por el eje FOXD3-AS1/miR-128-3p. Sin embargo, aún resulta interesante describir si este efecto es consecuencia de la progresión de la malignidad o es inducido directamente por las oncoproteínas de VPH-AR. De manera interesante, en el modelo celular empleado observamos que la presencia de E7 de VPH-16 aumentó los niveles de mRNA de LIMK1, por lo que resultaría interesante evaluar posteriormente los niveles proteicos de LIMK1, así como el efecto de E7 de VPH-16 sobre el eje FOXD3-AS1/miR-128-3p.

Adicionalmente, la activación de LIMK1 promueve la fosforilación de cofilina1 en la Ser 3, inhibiendo su capacidad para cortar y despolimerizar la actina F (polimerizada), lo que disminuye la concentración celular de actina G (actina globular) y, en consecuencia, disminuye la tasa de recambio de los filamentos de actina, afectando procesos relacionados con la motilidad celular (Li Z. et al., 2020). La sobreexpresión de cofilina1 se asocia estrechamente con el aumento en la proliferación, invasión y migración celular en diversos tipos de cáncer (Xu, J. et. al. 2021), de manera que se han reportado niveles de mRNA y proteicos de cofilina1 aumentados significativamente en cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, próstata, colorrectal, carcinoma de células escamosas de vulva, cáncer de ovario, vejiga, así como en cáncer cervicouterino (Pappa, K. et. al. 2017; Xu, J. et. al. 2021). Un análisis proteómico en células de CC, comparado con células no tumorigénicas demostró que encontraban aumentados diferencialmente diversas proteínas involucradas con la dinámica del citoesqueleto de actina, entre estas se encontró reguladas positivamente a cofilina1 en células de CC (Pappa, K. et. al. 2017). No obstante, en el presente estudio se observó que específicamente E7 de VPH-16 aumenta los niveles de mRNA de cofilina1, por lo que resultará importante evaluar los niveles proteicos y fosforilados de cofilina1 en presencia de la oncoproteínas de VPH-AR para tener un panorama más completo sobre la regulación en la expresión y/o actividad de los reguladores del citoesqueleto de actina y la presencia de los inductores oncogénicos del VPH-AR.

En el presente trabajo no se encontraron cambios significativos en los niveles proteicos del GEF TIAM1, las Rac GTPasas 1/2/3, ni p-PAK 1/2/3 en presencia de las oncoproteínas comparado con el vector vacío. No obstante, E6 y E7 de VPH-16 aumentan la migración de manera dependiente de la actividad de las Rac GTPasas, lo que se demostró al inhibirlas farmacológicamente. Estos resultados concuerdan con lo descrito sobre el funcionamiento clásico de las Rac GTPasas, donde se conoce que su señalización va a depender

principalmente de su activación, es decir, de su unión a GTP independientemente de sus niveles proteicos (Benitah, S. A., et. al. 2003; Kazanietz, M. et. al. 2017). Adicionalmente, se ha reportado que ciertos tipos de tumores muestran niveles de mRNA de la familia RhoGTPasas que no se correlacionan con sus niveles proteicos. Tal es el caso de tumores de colon y mama, donde no se han detectado cambios en los niveles de mRNA de Rho GTPasas en comparación con el tejido normal, pero si se encuentran niveles de proteína mucho más altos, por otro lado, en los tumores germinales testiculares se observa un aumento en el nivel de mRNA de la familia de las Rho GTPasas, mientras que no se observa aumento a nivel proteico. (Sahai, E., et. al. 2002; Benitah, S. A., et. al. 2003). Esto sugiere que aun cuando los niveles de mRNA de las Rac GTPasas se ve aumentada por E6 y por E7 en el modelo celular empleado, no se refleja a nivel proteico quizá por la cantidad relativa de proteína traducida del mRNA o por eventos en el procesamiento y plegamiento de las proteínas que pudieran impactar en su estabilidad, tal como modificaciones postraduccionales que propicien su degradación, o incluso otros posibles mecanismos en donde las oncoproteínas pudieran estar participando. De manera que sería un tema que merece estudios posteriores, tal como evaluar la vida media de las Rac GTPasas y sus efectores en el modelo celular empleado, así como la realización de ensayos FRET para evaluar su localización celular, lo cual nos daría un panorama más amplio del funcionamiento de estas proteínas en conjunto con los presentes resultados.

Sin embargo, de manera muy interesante, encontramos que las oncoproteínas E6 y E7 promueven la migración celular de manera dependiente de las Rac GTPasas. Así mismo, se pretenderá evaluar la migración celular por Transwell, con el fin de eliminar la posible participación de la proliferación celular en el ensayo de cierre de herida. No obstante, estos resultados señalan que aun cuando los niveles proteicos de las Rac GTPasas no cambien en presencia de las oncoproteínas, su actividad sí podría estar siendo modulada. Además, resulta relevante que algunos autores han descrito la existencia una regulación espacio temporal de las Rac GTPasas, la cual es crítica en el proceso de migración (Donnelly, S. K., et. al. 2017; Casado-Medrano, V. et. al. 2018). De esta manera, es indispensable no solo analizar los niveles proteicos de las Rac y su activación, sino también la distribución celular de estas proteínas activas.

Las Rac GTPasas en su forma activa (unida a GTP) interactúan con una gran variedad de proteínas efectoras como PAK1/2/3, MLK-1-3, cinasa p70 S6, CaMKII, entre otras (Sauzeau, V. et. al. 2022), para favorecer la migración celular. Se sabe que las Rac promueven la formación de protuberancias de membrana, incluidos lamellipodia, filipodia e invadopodia, lo que le permiten a la célula ajustar su dirección de migración en respuesta a señales

extracelulares (Liang, J., et. al. 2021). Así mismo, las Rac van a generar una morfología celular asimétrica mediante la polarización anterior-posterior a través de la reorientación del núcleo y el reposicionamiento del centro organizador de microtúbulos (MTOC) (Marei, H. et al., 2017). Por otro lado, estimulan el ensamblaje y recambio de las adhesiones focales para revertir rápidamente el movimiento celular a través del entorno, al mismo tiempo que favorecen a la contractilidad de actomiosina para generar la fuerza de tracción necesaria para el movimiento celular (Liang, J., et. al. 2021; Marei, H. et al., 2017). No obstante, las Rac GTPasas también favorecen la degradación y remodelación de la ECM a través de la acción de metaloproteasas MMP (Xu, A. et. al. en el 2013; Lawson C. et. al., 2018). En esencia, la mayoría de estos eventos que forman parte de la migración celular en los que Rac tiene un rol importante, se llevan a cabo a través de la reorganización del citoesqueleto de actina mediante dos vías principales: La primera vía actúa tras la unión de Rac activo con la cinasa PAK, y la segunda a través de la activación del complejo Arp2/3 cuya función es promover la polimerización de nuevos monómeros de actina (Wertheimer, E., et. al. 2012).

Debido a que, en el modelo celular empleado, la presencia de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16 no alteran cambios en los niveles de la forma activa de la cinasa PAK1/2, la cual es el principal interruptor de la inhibición despolimerizante, se podría inferir que la polimerización de actina que subyace los efectos migratorios evidenciados se podría ser regulada a través del complejo nucleante Arp2/3. Este complejo se une a una familia de proteínas llamadas factores promotores de nucleación, y es activado por Rac a través de su objetivo receptor de sustrato de insulina tirosina cinasa p53 (IRSp53) o a través de un dominio homólogo de Src 3 (SH3) de un miembro de la familia WASP. (Wertheimer, E., et. al. 2012). Una vez activado el complejo Arp2/3, actúa nucleando la adición de nuevos monómeros de actina G, dando lugar a dos nuevos filamentos de actina F. Por lo que será relevante analizar posteriormente el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 sobre la vía del complejo nucleante Arp2/3.

La compleja activación de las Rac GTPasas va a ser resultado de la integración de señales de múltiples reguladores río arriba incluidos los GEF y los receptores celulares tal como EGFR, GPCR, LPA, VEGF, integrinas, entre otros (Kazanietz, M. et. al. 2017; Lee, S. et. al. 2020). Adicionalmente, se ha descrito que las Rac pueden activarse por mecanismos de retroalimentación positiva de múltiples efectores río abajo, tal como PAK e IQGAP1 (Symons, M. 2011; Noritake, J., et.al. 2004). Aunado a esto, la activación de Rac también puede ser regulada por modificaciones intrínsecas de las proteínas, tales como mutaciones puntuales, modificaciones postraduccionales, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación (Parri, M., et, al., 2010; Sauzeau, V. et. al. 2022), lo que le permite adquirir cambios conformacionales que alteran los mecanismos autoinhibidores y/o sufrir cambios alostéricos en el dominio catalítico

que le permitan su activación continua (Lawson C. et. al., 2018). Incluso se ha estudiado que las Rac pueden regularse de manera espaciotemporal en la célula, teniendo activaciones diferenciales dependiendo el proceso biológico, tal como se mencionó anteriormente dentro del marco migratorio, en donde ejecuta señalizaciones distintas en la zona basal como zona apical de la célula (Marei, H. et al., 2017), así mismo pueden activarse por distintos GEF tanto el núcleo como en la periferia de un mismo invadopodio (Donnelly, S. K., et, al. 2017).

Por otro lado, los resultados obtenidos señalan que E6 y E7 de VPH-16 favorecen la migración celular a través de vías que involucran la activación de Rac1/2/3, no obstante, debido a su compleja regulación, el efecto de las oncoproteínas puede ocurrir a múltiples niveles de la cascada de señalización. Por ejemplo, se ha reportado que las oncoproteínas E6 y E7 VPH-AR pueden intervenir mejorando la activación de los receptores como EGFR y VEGF (Subbaramaiah, K., & Dannenberg, A. J. 2007; He, C., et. al. 2015) Como consecuencia, los circuitos de señalización posteriores, incluida la señalización de proteínas adaptadoras permanecerán continuamente activas, así mismo se ha descrito ampliamente su papel para mejorar la señalización de PI3K/AKT (Zhang, E., et. al. 2014). Estos eventos podrían redirigir los estímulos mediados por los receptores hacia el fortalecimiento de la activación de Rac GTPasas, y mejorar las señalizaciones que promueve la migración celular. No obstante, también pueden participar en cualquiera de los niveles de regulación de Rac mencionados por mecanismos aún desconocidos. Sin embargo, estos resultados aportan información del control de las Rac GTPasas en presencia de las oncoproteínas para comprender mejor su papel en CC para estudios posteriores.

Debido a la extensa regulación biológica que modulan los GEF y las Rac GTPasas, así como la evidencia actual que las vincula con la diseminación metastásica y la resistencia a las terapias dirigidas, es interesante evaluar el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 sobre estos elementos en cánceres relacionados a VPH, con el fin de tener un acercamiento más preciso sobre su regulación, así como desarrollar fármacos candidatos para respaldar enfoques de tratamiento individualizados basados en la inhibición de Rac GTPasas.

11 Conclusiones

La presencia de la oncoproteína E7 de VPH-16 en las células C33-A aumenta significativamente los niveles de mRNA de Rac1, LIMK1, cofilina1 y TIAM1. Sin embargo, la presencia de E7 VPH-16 en células C33-A no aumenta los niveles proteicos de las Rac GTPasas 1, 2 y 3, ni de sus efectores p-Pak (T423 /T402) a los tiempos empleados en el presente estudio.

Ambas oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16, aumentan significativamente los niveles del mRNA de Rac3, mientras que E6 de VPH-16 disminuye significativamente los niveles del mRNA de PREX-1.

Ambas oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16, aumentan la migración de manera dependiente de la activación de Rac GTPasas.

12 Perspectivas

Con base a los resultados observados en el presente estudio, resulta imprescindible evaluar invasión celular promovida por las oncoproteínas de VPH tras el abatimiento de la actividad de Rac GTPasas. Así mismo, se deben estandarizar las condiciones para analizar la activación de las Rac GTPasas en presencia de las oncoproteínas, así como en presencia de un estímulo de la vía.

Por otro lado, resultará interesante evaluar la vida media de las Rac GTPasas en presencia de E6 y E7 VPH-AR, así como las posibles interacciones de las Rac GTPasas con las oncoproteínas virales.

13 Referencias

Adam, L., Vadlamudi, R. K., McCrea, P., & Kumar, R. (2001). Tiam1 overexpression potentiates heregulin-induced lymphoid enhancer factor-1/beta -catenin nuclear signaling in breast cancer cells by modulating the intercellular stability. *The Journal of biological chemistry*, 276(30), 28443–28450. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009769200>

Alvarado, C. V., Rubio, M. F., Fernández Larrosa, P. N., Panelo, L. C., Azurmendi, P. J., Ruiz Grecco, M., Martínez-Nöel, G. A., & Costas, M. A. (2014). The levels of RAC3 expression are up regulated by TNF in the inflammatory response. *FEBS open bio*, 4, 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.04.009>

Barrio-Real, L., Benedetti, L. G., Engel, N., Tu, Y., Cho, S., Sukumar, S., & Kazanietz, M. G. (2014). Subtype-specific overexpression of the Rac-GEF P-REX1 in breast cancer is associated with promoter hypomethylation. *Breast cancer research: BCR*, 16(5), 441. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0441-7>

Barrows, D., He, J. Z., & Parsons, R. (2016). PREX1 Protein Function Is Negatively Regulated Downstream of Receptor Tyrosine Kinase Activation by p21-activated Kinases (PAKs). *The Journal of biological chemistry*, 291(38), 20042–20054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.723882>

Baugher, P. J., Krishnamoorthy, L., Price, J. E., & Dharmawardhane, S. F. (2005). Rac1 and Rac3 isoform activation is involved in the invasive and metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Breast cancer research: BCR*, 7(6), R965–R974. <https://doi.org/10.1186/bcr1329>

Belov, A. A., & Mohammadi, M. (2012). Grb2, a double-edged sword of receptor tyrosine kinase signaling. *Science signaling*, 5(249), pe49. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003576>

Benitah, S. A., Espina, C., Valerón, P. F., & Lacal, J. C. (2003). Rho GTPases in human carcinogenesis: a tale of excess. *Revista de Oncología*, 5(2), 70-78.

Benitah, S. A., Valerón, P. F., van Aelst, L., Marshall, C. J., & Lacal, J. C. (2004). Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochimica et biophysica acta*, 1705(2), 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2004.10.002>

Bos, J. L., Rehmann, H., & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129(5), 865–877. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018>

Buttrick, T., Khoury, S. J., & Elyaman, W. (2020). Opposite functions of STAT3 and Smad3 in regulating Tiam1 expression in Th17 cells. *Small GTPases*, 11(1), 62–68. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1341365>

Casado-Medrano, V., Baker, M. J., Lopez-Haber, C., Cooke, M., Wang, S., Caloca, M. J., & Kazanietz, M. G. (2018). The role of Rac in tumor susceptibility and disease progression: from biochemistry to the clinic. *Biochemical Society transactions*, 46(4), 1003–1012. <https://doi.org/10.1042/BST20170519>

Chan, C. K., Aimagambetova, G., Ukybassova, T., Kongrtay, K., & Azizan, A. (2019). Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination-

Review of Current Perspectives. *Journal of oncology*, 2019, 3257939. <https://doi.org/10.1155/2019/3257939>

Chen, M., Wang, H., Liang, Y., Hu, M., & Li, L. (2020). Establishment of multifactor predictive models for the occurrence and progression of cervical intraepithelial neoplasia. *BMC cancer*, 20(1), 926. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07265-7>

Cherfils, J., & Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological reviews*, 93(1), 269–309. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2012>

Clayton, N. S., & Ridley, A. J. (2020). Targeting Rho GTPase Signaling Networks in Cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 222. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00222>

Cook, D. R., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2014). Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene*, 33(31), 4021–4035. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.362>

Cooke, M., Baker, M. J., & Kazanietz, M. G. (2020). Rac-GEF/Rac Signaling and Metastatic Dissemination in Lung Cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 118. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00118>

de Martel, C., Plummer, M., Vignat, J., & Franceschi, S. (2017). Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *International journal of cancer*, 141(4), 664–670. <https://doi.org/10.1002/ijc.30716>

de Sanjosé, S., Brotons, M., & Pavón, M. A. (2018). The natural history of human papillomavirus infection. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 47, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015>

Donnelly, S. K., Cabrera, R., Mao, S. P. H., Christin, J. R., Wu, B., Guo, W., Bravo-Cordero, J. J., Condeelis, J. S., Segall, J. E., & Hodgson, L. (2017). Rac3 regulates breast cancer invasion and metastasis by controlling adhesion and matrix degradation. *The Journal of cell biology*, 216(12), 4331–4349. <https://doi.org/10.1083/jcb.201704048>

Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H., & Doorbar, J. (2015). Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*, 7(7), 3863–3890. <https://doi.org/10.3390/v7072802>

Estêvão, D., Costa, N. R., Gil da Costa, R. M., & Medeiros, R. (2019). Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms*, 1862(2), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.01.001>

Fleming, I. N., Elliott, C. M., Buchanan, F. G., Downes, C. P., & Exton, J. H. (1999). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates Tiam1 by reversible protein phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 274(18), 12753–12758. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12753>

Foxall, E., Pipili, A., Jones, G. E., & Wells, C. M. (2016). Significance of kinase activity in the dynamic invadosome. *European journal of cell biology*, 95(11), 483–492. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.07.002>

Fryer, B. H., & Field, J. (2005). Rho, Rac, Pak and angiogenesis: old roles and newly identified responsibilities in endothelial cells. *Cancer letters*, 229(1), 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.12.009>

Gjoerup, O., Lukas, J., Bartek, J., & Willumsen, B. M. (1998). Rac and Cdc42 are potent stimulators of E2F-dependent transcription capable of promoting retinoblastoma susceptibility gene product hyperphosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 273(30), 18812–18818. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.30.18812>

Global Cancer Observatory 2020. Recuperado y modificado el 23/05/21 de <https://gco.iarc.fr/>

Hamelers, I. H., Olivo, C., Mertens, A. E., Pegtel, D. M., van der Kammen, R. A., Sonnenberg, A., & Collard, J. G. (2005). The Rac activator Tiam1 is required for (alpha)3(beta)1-mediated laminin-5 deposition, cell spreading, and cell migration. *The Journal of cell biology*, 171(5), 871–881. <https://doi.org/10.1083/jcb.200509172>

He, C., Mao, D., Hua, G., Lv, X., Chen, X., Angeletti, P. C., Dong, J., Remmenga, S. W., Rodabaugh, K. J., Zhou, J., Lambert, P. F., Yang, P., Davis, J. S., & Wang, C. (2015). The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression. *EMBO molecular medicine*, 7(11), 1426–1449. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404976>

Hu, D., Zhou, J., Wang, F., Shi, H., Li, Y., & Li, B. (2015). HPV-16 E6/E7 promotes cell migration and invasion in cervical cancer via regulating cadherin switch in vitro and in vivo. *Archives of gynecology and obstetrics*, 292(6), 1345–1354. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3787-x>

Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, J. Y., Libermann, T. A., Jin, J., Harper, J. W., & Munger, K. (2007). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *Journal of virology*, 81(18), 9737–9747. <https://doi.org/10.1128/JVI.00881-07>

Human Papillomavirus and Related Diseases Report WORLD. (2019). Recuperado 13 de Junio de 2020, de HPV information centre website: <https://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf?t=1612651063246>

Jang, I., Jeon, B. T., Jeong, E. A., Kim, E. J., Kang, D., Lee, J. S., Jeong, B. G., Kim, J. H., Choi, B. H., Lee, J. E., Kim, J. W., Choi, J. Y., & Roh, G. S. (2012). Pak1/LIMK1/Cofilin Pathway Contributes to Tumor Migration and Invasion in Human Non-Small Cell Lung Carcinomas and Cell Lines. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 16(3), 159–165. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2012.16.3.159>

Kawazu, M., Ueno, T., Kontani, K., Ogita, Y., Ando, M., Fukumura, K., Yamato, A., Soda, M., Takeuchi, K., Miki, Y., Yamaguchi, H., Yasuda, T., Naoe, T., Yamashita, Y., Katada, T., Choi, Y. L., & Mano, H. (2013). Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(8), 3029–3034. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216141110>

Kazanietz, M. G., & Caloca, M. J. (2017). The Rac GTPase in Cancer: From Old Concepts to New Paradigms. *Cancer research*, 77(20), 5445–5451. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1456>

King, S. J., Nowak, K., Suryavanshi, N., Holt, I., Shanahan, C. M., & Ridley, A. J. (2014). Nesprin-1 and nesprin-2 regulate endothelial cell shape and migration. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 71(7), 423–434. <https://doi.org/10.1002/cm.21182>

Knapp, A. A., McManus, P. M., Bockstall, K., & Moroianu, J. (2009). Identification of the nuclear localization and export signals of high risk HPV16 E7 oncoprotein. *Virology*, 383(1), 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.09.037>

Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B. H., Evans, P., Bacchicchi, A., McCusker, J. P., Cheng, E., Davis, M. J., Goh, G., Choi, M., Ariyan, S., Narayan, D., Dutton-Regester, K., Capatana, A., Holman, E. C., Bosenberg, M., Sznol, M., Kluger, H. M., Brash, D. E., Stern, D. F., ... Halaban, R. (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nature genetics*, 44(9), 1006–1014. <https://doi.org/10.1038/ng.2359>

- Lawson, C. D., & Ridley, A. J. (2018). Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *The Journal of cell biology*, 217(2), 447–457. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612069>
- Lee, S. W., & Commisso, C. (2020). Rac1 and EGFR cooperate to activate Pak in response to nutrient stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 533(3), 437–441. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.09.043>
- Li, H., Wu, X., & Cheng, X. (2016). Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer. *Journal of gynecologic oncology*, 27(4), e43. <https://doi.org/10.3802/jgo.2016.27.e43>
- Li, S., Couvillon, A. D., Brasher, B. B., & Van Etten, R. A. (2001). Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *The EMBO journal*, 20(23), 6793–6804. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6793>
- Li, Z., Liu, Q., Piao, J., Hua, F., Wang, J., Jin, G., Lin, Z., & Zhang, Y. (2016). Clinicopathological implications of Tiam1 overexpression in invasive ductal carcinoma of the breast. *BMC cancer*, 16(1), 681. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2724-0>
- Li, Z. F., Yao, Y. D., Zhao, Y. Y., Liu, Y., Liu, Z. H., Hu, P., & Zhu, Z. R. (2020). Effects of PAK4/LIMK1/Cofilin-1 signaling pathway on proliferation, invasion, and migration of human osteosarcoma cells. *Journal of clinical laboratory analysis*, 34(9), e23362. <https://doi.org/10.1002/jcla.23362>
- Liang, J., Oyang, L., Rao, S., Han, Y., Luo, X., Yi, P., Lin, J., Xia, L., Hu, J., Tan, S., Tang, L., Pan, Q., Tang, Y., Zhou, Y., & Liao, Q. (2021). Rac1, A Potential Target for Tumor Therapy. *Frontiers in oncology*, 11, 674426. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.674426>
- López-Revilla, R., Martínez-Contreras, L. A., & Sánchez-Garza, M. (2008). Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infectious agents and cancer*, 3, 3. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-3-3>
- Lu, G., Zhou, Y., Zhang, C., & Zhang, Y. (2021). Upregulation of LIMK1 Is Correlated With Poor Prognosis and Immune Infiltrates in Lung Adenocarcinoma. *Frontiers in genetics*, 12, 671585. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.671585>
- Marei, H., & Malliri, A. (2017). GEFs: Dual regulation of Rac1 signaling. *Small GTPases*, 8(2), 90–99. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1202635>

Malliri, A., van der Kammen, R. A., Clark, K., van der Valk, M., Michiels, F., & Collard, J. G. (2002). Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature*, *417*(6891), 867–871. <https://doi.org/10.1038/nature00848>

Matarrese, P., Abbruzzese, C., Mileo, A. M., Vona, R., Ascione, B., Visca, P., Rollo, F., Benevolo, M., Malorni, W., & Paggi, M. G. (2016). Interaction between the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein and gelsolin ignites cancer cell motility and invasiveness. *Oncotarget*, *7*(32), 50972–50985. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8646>

Matos, P., Skaug, J., Marques, B., Beck, S., Veríssimo, F., Gespach, C., Boavida, M. G., Scherer, S. W., & Jordan, P. (2000). Small GTPase Rac1: structure, localization, and expression of the human gene. *Biochemical and biophysical research communications*, *277*(3), 741–751. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3743>

McCaffrey, J., Yamasaki, L., Dyson, N. J., Harlow, E., & Griep, A. E. (1999). Disruption of retinoblastoma protein family function by human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein inhibits lens development in part through E2F-1. *Molecular and cellular biology*, *19*(9), 6458–6468. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.9.6458>

McLaughlin-Drubin, M. E., & Münger, K. (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, *384*(2), 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.10.006>

Mendoza-Catalan, M. A., Cristóbal-Mondragón, G. R., Adame-Gómez, J., del Valle-Flores, H. N., Coppe, J. F., Sierra-López, L., Romero-Hernández, M. A., del Carmen Alarcón-Romero, L., Illades-Aguilar, B., & Castañeda-Saucedo, E. (2012). Nuclear expression of Rac1 in cervical premalignant lesions and cervical cancer cells. *BMC cancer*, *12*, 116. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-116>

Mertens, A. E., Roovers, R. C., & Collard, J. G. (2003). Regulation of Tiam1-Rac signalling. *FEBS letters*, *546*(1), 11–16. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00435-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00435-6)

Mesplède, T., Gagnon, D., Bergeron-Labrecque, F., Azar, I., Sénéchal, H., Coutlée, F., & Archambault, J. (2012). p53 degradation activity, expression, and subcellular localization of E6 proteins from 29 human papillomavirus genotypes. *Journal of virology*, *86*(1), 94–107. <https://doi.org/10.1128/JVI.00751-11>

Montalvo G., Coronel J. A., Alvarado A., Cantú D., Flores D., Ortega A., González A., Isla D., Muñoz D. E., Robles J. U., Solorza G., Mota A., Gallardo D., Morales F., Cetina M. L. y Herrera A. (2011). Oncología: Cervical cancer. *Cancerology*; *6*: 61-69.

Narisawa-Saito, M., & Kiyono, T. (2007). Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer science*, 98(10), 1505–1511. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00546.x>

Noritake, J., Fukata, M., Sato, K., Nakagawa, M., Watanabe, T., Izumi, N., Wang, S., Fukata, Y., & Kaibuchi, K. (2004). Positive role of IQGAP1, an effector of Rac1, in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact. *Molecular biology of the cell*, 15(3), 1065–1076. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-08-0582>

Nussinov, R., Jang, H., & Tsai, C. J. (2014). The structural basis for cancer treatment decisions. *Oncotarget*, 5(17), 7285–7302. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2439>

Olmedo-Nieva, L., Muñoz-Bello, J. O., Martínez-Ramírez, I., Martínez-Gutiérrez, A. D., Ortiz-Pedraza, Y., González-Espinosa, C., Madrid-Marina, V., Torres-Poveda, K., Bahena-Roman, M., & Lizano, M. (2022). RIPOR2 Expression Decreased by HPV-16 E6 and E7 Oncoproteins: An Opportunity in the Search for Prognostic Biomarkers in Cervical Cancer. *Cells*, 11(23), 3942. <https://doi.org/10.3390/cells11233942>

Pal, A., & Kundu, R. (2020). Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Frontiers in microbiology*, 10, 3116. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03116>

Paliwal, S., Ho, N., Parker, D., & Grossman, S. R. (2012). CtBP2 Promotes Human Cancer Cell Migration by Transcriptional Activation of Tiam1. *Genes & cancer*, 3(7-8), 481–490. <https://doi.org/10.1177/1947601912463695>

Pappa, K. I., Lygirou, V., Kontostathi, G., Zoidakis, J., Makridakis, M., Vougas, K., Daskalakis, G., Polyzos, A., & Anagnou, N. P. (2017). Proteomic Analysis of Normal and Cancer Cervical Cell Lines Reveals Deregulation of Cytoskeleton-associated Proteins. *Cancer genomics & proteomics*, 14(4), 253–266. <https://doi.org/10.21873/cgp.20036>

Parri, M., & Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell communication and signaling : CCS*, 8, 23. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-23>

Pegtel, D. M., Ellenbroek, S. I., Mertens, A. E., van der Kammen, R. A., de Rooij, J., & Collard, J. G. (2007). The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by stabilizing microtubule-dependent front-rear polarity. *Current biology: CB*, 17(19), 1623–1634. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.035>

Peralta-Zaragoza, O., Bermúdez-Morales, V., Gutiérrez-Xicotencatl, L., Alcocer-González, J., Recillas-Targa, F., & Madrid-Marina, V. (2006). E6 and E7 oncoproteins from human papillomavirus type 16 induce activation of human transforming growth factor beta1 promoter throughout Sp1 recognition sequence. *Viral immunology*, *19*(3), 468–480. <https://doi.org/10.1089/vim.2006.19.468>

Razidlo, G. L., Schroeder, B., Chen, J., Billadeau, D. D., & McNiven, M. A. (2014). Vav1 as a central regulator of invadopodia assembly. *Current biology: CB*, *24*(1), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.013>

Sahai, E., & Marshall, C. J. (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nature reviews. Cancer*, *2*(2), 133–142. <https://doi.org/10.1038/nrc725>

Sander, E. E., van Delft, S., ten Klooster, J. P., Reid, T., van der Kammen, R. A., Michiels, F., & Collard, J. G. (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of cell biology*, *143*(5), 1385–1398. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.5.1385>

Sauzeau, V., Beignet, J., & Bailly, C. (2022). Rac1 as a Target to Treat Dysfunctions and Cancer of the Bladder. *Biomedicines*, *10*(6), 1357. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061357>

Scarth, J. A., Patterson, M. R., Morgan, E. L., & Macdonald, A. (2021). The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. *The Journal of general virology*, *102*(3), 001540. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001540>

Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., & Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, *75*(3), 495–505. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90384-3)

Sen, P., Ganguly, P., & Ganguly, N. (2018). Modulation of DNA methylation by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer. *Oncology letters*, *15*(1), 11–22. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7292>

Serrano, B., Brotons, M., Bosch, F. X., & Bruni, L. (2018). Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, *47*, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.006>

Shutes A, Onesto C, Picard V, Leblond B, Schweighoffer F, Der CJ. Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *J Biol Chem*. 2007 Dec 7;282(49):35666-78. doi: 10.1074/jbc.M703571200. Epub 2007 Oct 11. PMID: 17932039.

Small, W., Jr, Bacon, M. A., Bajaj, A., Chuang, L. T., Fisher, B. J., Harkenrider, M. M., Jhingran, A., Kitchener, H. C., Mileskin, L. R., Viswanathan, A. N., & Gaffney, D. K. (2017). Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*, 123(13), 2404–2412. <https://doi.org/10.1002/cncr.30667>

Sorrell, F. J., Kilian, L. M., & Elkins, J. M. (2019). Solution structures and biophysical analysis of full-length group A PAKs reveal they are monomeric and auto-inhibited in *cis*. *The Biochemical journal*, 476(7), 1037–1051. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180867>

Srijakotre, N., Man, J., Ooms, L. M., Lucato, C. M., Ellisdon, A. M., & Mitchell, C. A. (2017). P-Rex1 and P-Rex2 RacGEFs and cancer. *Biochemical Society transactions*, 45(4), 963–977. <https://doi.org/10.1042/BST20160269>

Subbaramaiah, K., & Dannenberg, A. J. (2007). Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. *Cancer research*, 67(8), 3976–3985. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4273>

Suryavanshi, N., & Ridley, A. J. (2013). Determining Rho GTPase activity by an affinity-precipitation assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1046, 191–202. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-538-5_11

Symons M. (2011). Rac1 activation comes full circle. *The EMBO journal*, 30(19), 3875–3877. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.330>

Tamás, P., Solti, Z., Bauer, P., Illés, A., Sipeki, S., Bauer, A., Faragó, A., Downward, J., & Buday, L. (2003). Mechanism of epidermal growth factor regulation of Vav2, a guanine nucleotide exchange factor for Rac. *The Journal of biological chemistry*, 278(7), 5163–5171. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207555200>

Terawaki, S., Kitano, K., Mori, T., Zhai, Y., Higuchi, Y., Itoh, N., Watanabe, T., Kaibuchi, K., & Hakoshima, T. (2010). The PHCCEX domain of Tiam1/2 is a novel protein- and membrane-binding module. *The EMBO journal*, 29(1), 236–250. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.323>

Urano, D., Nakata, A., Mizuno, N., Tago, K., & Itoh, H. (2008). Domain-domain interaction of P-Rex1 is essential for the activation and inhibition by G protein betagamma subunits and PKA. *Cellular signalling*, 20(8), 1545–1554. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.04.009>

Vaghi, V., Pennucci, R., Talpo, F., Corbetta, S., Montinaro, V., Barone, C., Croci, L., Spaiardi, P., Consalez, G. G., Biella, G., & de Curtis, I. (2014). Rac1 and rac3 GTPases control synergistically the development of cortical and hippocampal GABAergic interneurons. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 24(5), 1247–1258. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs402>

Van Doorslaer K. (2013). Evolution of the papillomaviridae. *Virology*, 445(1-2), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.012>

Vats, A., Trejo-Cerro, O., Thomas, M., & Banks, L. (2021). Human papillomavirus E6 and E7: What remains?. *Tumour virus research*, 11, 200213. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2021.200213>

Walker, F., Kato, A., Gonez, L. J., Hibbs, M. L., Pouliot, N., Levitzki, A., & Burgess, A. W. (1998). Activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway by kinase-defective epidermal growth factor receptors results in cell survival but not proliferation. *Molecular and cellular biology*, 18(12), 7192–7204. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.12.7192>

Wang, J., Feng, Y., Chen, X., Du, Z., Jiang, S., Ma, S., & Zou, W. (2018). SH3BP1-induced Rac-Wave2 pathway activation regulates cervical cancer cell migration, invasion, and chemoresistance to cisplatin. *Journal of cellular biochemistry*, 119(2), 1733–1745. <https://doi.org/10.1002/jcb.26334>

Welch H. C. (2015). Regulation and function of P-Rex family Rac-GEFs. *Small GTPases*, 6(2), 49–70. <https://doi.org/10.4161/21541248.2014.973770>

Wertheimer, E., Gutierrez-Uzquiza, A., Roseblit, C., Lopez-Haber, C., Sosa, M. S., & Kazanietz, M. G. (2012). Rac signaling in breast cancer: a tale of GEFs and GAPs. *Cellular signalling*, 24(2), 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.08.011>

World Health Organization (2022). Cervical cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer#:~:text=Nearly%20all%20cases%20of%20cervical,progress%20to%20invasive%20cervical%20cancer.>

- Wu, J., Xiao, F., Zheng, Y., Lin, Y., & Wang, H. L. (2021). Worldwide trend in human papillomavirus-attributable cancer incidence rates between 1990 and 2012 and Bayesian projection to 2030. *Cancer*, *127*(17), 3172–3182. <https://doi.org/10.1002/cncr.33628>
- Wu, Y. J., Tang, Y., Li, Z. F., Li, Z., Zhao, Y., Wu, Z. J., & Su, Q. (2014). Expression and significance of Rac1, Pak1 and Rock1 in gastric carcinoma. *Asia-Pacific journal of clinical oncology*, *10*(2), e33–e39. <https://doi.org/10.1111/ajco.12052>
- Xu, A. L., Yu, G. Q., Kong, X. C., Qiu, X. H., & Li, P. L. (2013). Effect of Rac1 downregulation mediated by shRNA on the biological behaviour of human cervical cancer cells. *The Journal of international medical research*, *41*(4), 1037–1048. <https://doi.org/10.1177/0300060513479875>
- Xu, J., Huang, Y., Zhao, J., Wu, L., Qi, Q., Liu, Y., Li, G., Li, J., Liu, H., & Wu, H. (2021). Cofilin: A Promising Protein Implicated in Cancer Metastasis and Apoptosis. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 599065. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.599065>
- Yang, X., Du, H., Bian, W., Li, Q., & Sun, H. (2021). FOXD3- AS1/miR- 128- 3p/LIMK1 axis regulates cervical cancer progression. *Oncology reports*, *45*(5), 62. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8013>
- Yang, Y., Wu, Q., Li, N., Che, S., Jin, T., Nan, Y., Lin, Z., & Chen, L. (2018). Upregulation of Tiam1 contributes to cervical cancer disease progression and indicates poor survival outcome. *Human pathology*, *75*, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.02.006>
- Zhang, E., Feng, X., Liu, F., Zhang, P., Liang, J., & Tang, X. (2014). Roles of PI3K/Akt and c-Jun signaling pathways in human papillomavirus type 16 oncoprotein-induced HIF-1 α , VEGF, and IL-8 expression and in vitro angiogenesis in non-small cell lung cancer cells. *PloS one*, *9*(7), e103440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103440>
- Zhou, S., & Peng, F. (2020). Patterns of metastases in cervical cancer: a population-based study. *International journal of clinical and experimental pathology*, *13*(7), 1615–1623.
- Zubor, P., Dankova, Z., Kolkova, Z., Holubekova, V., Brany, D., Mersakova, S., Samec, M., Liskova, A., Koklesova, L., Kubatka, P., Bujnak, J., Kajo, K., Mlyncek, M., Giordano, F. A., & Golubnitschaja, O. (2020). Rho GTPases in Gynecologic Cancers: In-Depth Analysis toward the Paradigm Change from Reactive to Predictive, Preventive, and Personalized Medical Approach Benefiting the Patient and Healthcare. *Cancers*, *12*(5), 1292. <https://doi.org/10.3390/cancers12051292>