



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

T E S I S

**EFFECTO DE LAS VARIANTES DE LA ONCOPROTEÍNA
E6 DEL VPH 16 EN LA ADHESIÓN CELULAR EN
CÉLULAS C33-A**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

QBP. ANA LAURA SANTIAGO NAZARIO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BERENICE ILLADES AGUIAR

CO-DIRECTOR: DR. OSCAR DEL MORAL HERNÁNDEZ



Chilpancingo de los Bravo, Guerrero. Enero 2019

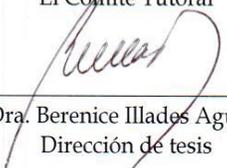


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

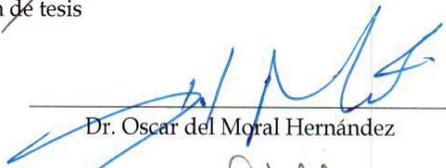
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

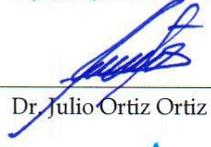
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 30 días del mes de octubre de dos mil dieciocho, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 en la adhesión celular en células C33-A", presentada por la alumna Ana Laura Santiago Nazario, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

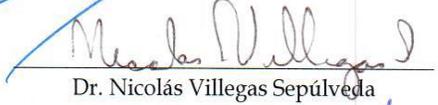
El Comité Tutorial


Dra. Berenice Illados Aguiar
Dirección de tesis


Dr. Daniel Hernández Sotelo

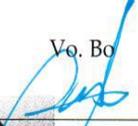

Dr. Oscar del Moral Hernández

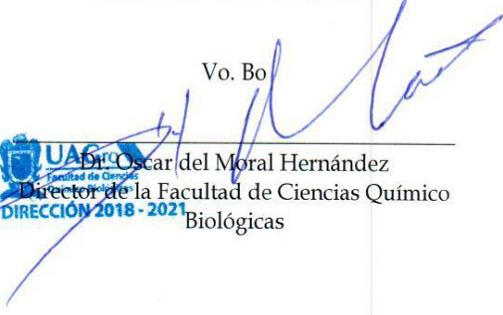

Dr. Julio Ortiz Ortiz


Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Vo. Bo

Vo. Bo


**UAGro**
FCQBE Coordinador de la Maestría en Ciencias Biomédicas
DIRECCIÓN 2018 - 2021


**UABQ**
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas
DIRECCIÓN 2018 - 2021

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología y en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro) en Chilpancingo de los Bravo, Gro.

Bajo la dirección de

Dra. Berenice Illades Aguiar

La Co-dirección de

Dr. Oscar Del Moral Hernández

La asesoría de

Dr. Daniel Hernández Soleto

Dr. Julio Ortiz Ortiz

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

El financiamiento para esta investigación se obtuvo del proyecto “Evaluación *in vitro* de los procesos de adhesión celular y apoptosis por efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de variantes del VPH16 “Fondos SEP-CONACYT **Clave:** CB-2015-01-257857.

Durante el periodo en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Ana Laura Santiago Nazario recibió la beca (No. 773999) del 01 de septiembre de 2016 al 31 de agosto de 2018 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a los programas del Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

Formando además parte del “Programa de Incorporación de Mujeres Indígenas para el Fortalecimiento Regional del Estado de Guerrero” perteneciente al CONACYT y coordinado por la UAGro, convocatoria 2016.

Dedicatorias

A mi madre Clementina y a mi padre Víctor siento una enorme admiración por ustedes por todo lo que han logrado a pesar de las limitaciones. A ustedes que me han enseñado que todo es posible cuando se quiere y se trabaja por lo que vale la pena tener. Gracias por haberme dado la oportunidad de vivir, gracias por el apoyo brindado desde siempre, ambos hicieron un gran esfuerzo, es una dicha ser su hija y espero que se sientan orgulloso de mi. A mis hermanos Mari, Fer, Adri y mi Caracol favorito, aunque estamos lejos, sé que están conmigo en la distancia, juntos seguiremos creciendo, todo lo realizado también es por ustedes. Los quiero y extraño mucho. A mis sobrinos por todo el cariño que me brindan, ustedes ocupan un lugar especial en mi vida y espero poder ser un ejemplo para ustedes y mostrarle que pueden soñar y sobre todo hacer realidad ese sueño. Los ama Ana ♥

Agradecimientos

A mi directora de tesis, a la Dra. Berenice Illades Aguiar, siento una gran admiración por usted, gracias. Como coordinadora del programa de mujeres indígenas le agradezco por esta gran labor social que hace en nuestro estado de Guerrero por nuestras mujeres y en nuestra universidad. Como directora de tesis por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, firmemente puedo decir que esta experiencia me ayudará a mi crecimiento personal y académico.

A mi co-director de tesis, al Dr. Oscar del Moral Hernández, gracias por el voto de confianza y por brindarme un lugar en el LV, gracias por guiarme durante el desarrollo de este proyecto, en conclusión mi agradecimiento infinito por el apoyo durante este periodo, trabajar con usted ha sido una gran experiencia, todo lo aprendido es enriquecedor. Mi admiración y respeto siempre, gracias.

A mi tutor, Dr. Daniel Hernández, gracias por los consejos brindados durante las tutorías, por la orientación durante el periodo de la maestría, y como sinodal gracias por las aportaciones hechas al trabajo y por la asesoría brindada durante la realización del mismo.

Al Dr. Julio Ortiz, gracias por todas las aportaciones a este trabajo, sus aportaciones se tomaron en cuenta para mejorar este trabajo, gracias por su disponibilidad, gracias.

A la Dr. Miguel de Ángel Mendoza Catalán gracias por el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo, por la asesoría, por ayudarme a resolver las dudas, por su amistad brindada desde que fue mi director de tesis en la licenciatura. Mi admiración y respeto, gracias.

A la Dra. Luz del Carme Alarcón, Dra. Olga Garibay, Dra. Eugenia, gracias por la orientación académica durante el desarrollo de este proyecto, por todas las aportaciones que de alguna manera ayudaron a la realización de este trabajo, por las enseñanzas en el salón de clases y por haber compartido agradables experiencias. Mi admiración y respeto, gracias. Dra. Mónica Espinoza mi profesora de seminario, gracias por todas las aportaciones a este trabajo, por su apoyo, gracias a los chicos de mi clase de seminario Fer, Wendy, Walter, David.

A mi compañera de maestría, casi compañera de tesis, amiga, mujer de cabello corto, Doritos, gracias por el tiempo compartido, por el apoyo brindado en el laboratorio, gracias Doritos, te deseo éxito en todo lo que decidas realizar y espero sigamos en comunicación y conservar tu amistad. Se te aprecia.

A los del LV, aquí empezaré por orden de antigüedad, a la maestra Norma gracias por el apoyo brindado en el tiempo que permaneció en el LV y la orientación en las técnicas del laboratorio. Para el siempre químico y señor Diego gracias por brindarme su amistad, por todas las canciones compartidas (ya me sé todas las canciones del Caloncho, Luismi, etc), y Huri gracias por los momentos compartidos, por la orientación en el área de cultivo celular., A la señora, casi química, secretaria, mamá luchona (esto no jajajaja), poeta, Ame, gracias por los momentos compartidos, por los poemas recitados, por las historias compartidas, por ser parte del LV en este periodo. A Bacho y Juan o Bacho 1 y Bacho 2, gracias chicos por la asistencia técnica, aunque a veces me daban miedo jajajaja, muchas gracias por su ayuda brindada en los ensayos de adhesión y durante el tiempo que coincidimos en el laboratorio. Gracias a Erick, Karem

y Anita por el tiempo compartido y por estar siempre disponibles a ayudar. A las chicas del servicio (Lupita y Liz) gracias por el apoyo brindado. En general fue un placer haber coincidido, les deseo éxito en todo lo que decidan emprender.

A mi tío Jesús y mi tía Viki, gracias porque me han brindado su apoyo durante este tiempo y por permitirme convivir con ustedes todo este tiempo, gracias. A mis primas Sofi y Rubi, gracias por hacerme sentir como en casa, por los momentos compartidos.

La bióloga Paola asistente del posgrado, gracias por la paciencia que mostró antes las dudas durante todo este periodo y por su ayuda brindada. Gracias Pao.

Y por último, pero no menos importante, a mis entrañables amigos, de hace mucho tiempo, Enfermish gracias por tantas cosas buenas compartidas, por conservar la amistad después de muchos tiempo. Sandybell gracias por los momentos compartidos, también conservamos la amistad de hace tiempo. Tax por el apoyo brindado siempre y por estar ahí en todos los momentos, siento una gran admiración por ti y a lado de Mateo sé que van a construir muchas cosas, deseo éxito en tu vida. Bebé gracias por todas esas pláticas enriquecedoras, por los momentos agradables compartidos, por estar en los buenos y malos momentos, que todo lo que decidas hacer sea exitoso, gracias bebé. A ustedes los deje al final ya que estaba sin inspiración (jajaja), Leilany and Don Os, un agradecimiento especial para ustedes, gracias por brindarme su amistad, amiguita extrañaré tus locuras y tus 30 personalidades fragmentadas, Amiguita y Dos Os en la película la vida es bella menciona la frase "Por muy dura que se la vida, siempre habrá alguien a tu lado que hará todo lo posible para conseguir que sonrías" y ustedes lo fueron en muchos momentos durante estos dos años, he aprendido tanto de ustedes señores. En general, espero conservar su amistad a pesar de los años que pasen y deseo éxito en todo lo que decidan emprender. Se les aprecia.

Gracias a los del laboratorio de biomedicina por permitirme realizar parte de mis experimentos. Al maestro Hugo gracias por brindarme su apoyo y parte de su amistad. Gracias a los del laboratorio de biología celular por permitirme trabajar en el cuarto de cultivo.

**EFEECTO DE LAS VARIANTES DE LA
ONCOPROTEÍNA E6 DEL VPH 16 EN
LA ADHESIÓN CELULAR EN
CÉLULAS C33-A**

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	9
II. ABSTRACT.....	10
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	13
V. RESULTADOS	16
VI. DISCUSIÓN.....	22
VII. CONCLUSIÓN	30
VIII. REFERENCIAS	31

I. RESUMEN

Objetivo: Analizar el efecto de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16, AA-a, AA-c, E-A176/G350, E-C188/G350, E-G350 en la adhesión celular en células C33-A. **Métodos:** Se realizó cultivo de las células C33-A transfectadas con el gen E6 de las variantes of E-G350, AA-a, AA-c, E-C188/G350, E-A176/G350 y E-Prototipo, se analizó el nivel de expresión de los genes de adhesión (SRPX, PCDH9, ITGA6, ABL2, PCDHB3, CDH18 y CDH6) por PCR en tiempo real (RT-qPCR), los niveles de expresión relativa fueron obtenidos utilizando el método $2^{-\Delta\Delta ct}$, se evaluó la capacidad de adhesión celular de las células transfectadas mediante el kit CytoSelect™. **Resultados:** Se encontró que la variante AA-c de la oncoproteína E6 del VPH 16 induce la sobreexpresión de los genes SRPX y PCDH9 ($p < 0.001$), mientras que disminuye la expresión de ITGA6, ABL2, CDH18, PCDHB3 y ($p < 0.001$). En cambio la variante AA-a de la oncoproteína E6 del VPH 16 disminuye la expresión de todos los genes de adhesión evaluados. Por otro lado la variante E-C176/G350 incrementa la expresión de ABL2 y disminuye la expresión de PCDH9, ITGA6, CDH18, PCDHB3 y CDH6, contrariamente a la variante E-C188/G350 que induce la sobreexpresión de los genes PCDH9, CDH18 y PCDHB3, y reduce la expresión de los genes SRPX, ITGA6, ABL2 y CDH6. **Finalmente** la variante E-G350 disminuye la expresión de los genes ITGA6, ABL2 y CDH6, e induce la sobreexpresión de gen PCDH9 y CDH18 ($p < 0.001$), en comparación con la E-prototipo. Las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16 aumentan la capacidad de las células C33-A para adherirse al colágeno I y IV en comparación con la E-Prototipo, siendo la variante AA-c quien más se unió al colágeno I y IV ($p = 0.05$ y $p = 0.025$, respectivamente). **Conclusión:** Las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16 afectan diferencialmente la expresión de genes relacionados con la adhesión celular en células C33-A. A diferencia de la E-prototipo, todas las variantes inducen aumento de la adherencia de las células C33-A a los colágenos I y IV. **Palabras clave:** Adhesión celular, VPH 16, oncoproteína E6, células C33-A.

II. ABSTRACT

Objective: To analyze the effect of HPV16 E6 oncoprotein variants E-G350, AA-a, AA-c, E-C188/G350 and E-A176/G350 in cell adhesion in C33-A cells. **Methods:** From cultures of C33-A cells transfected with HPV16 E6 gene of E-G350, AA-a, AA-c, E-C188/G350, E-A176/G350 variants and E-prototype, we analyzed the level expression of adhesion genes (*SRPX*, *PCDH9*, *ITGA6*, *ABL2*, *PCDHB3*, *CDH18* and *CDH6*) by RT-qPCR in C33-A cells, relative expression levels were obtained using the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method. The cell adhesion capacity of the transfected cells was evaluated by the CytoSelect™ kit. **Results:** We was found that the AA-c E6 oncoprotein variant of HPV 16 induces the overexpression of the *SRPX* and *PCDH9* genes ($p < 0.001$), while decreasing the expression of *ITGA6*, *ABL2*, *CDH18*, and *PCDHB3* in C33-A cells ($p < 0.001$). On the other hand, the AA-a variant of the E6 oncoprotein of HPV 16 causes the decrease of the expression of all the adhesion genes evaluated. On the other hand the variant E-C176/G350 increases the expression of *ABL2* and decreases the expression of *PCDH9*, *ITGA6*, *CDH18*, *PCDHB3* and *CDH6*, contrary to the variant E-C188/G350 that induces the overexpression of the *PCDH9*, *CDH18* and *PCDHB3* genes, and reduces the expression of the *SRPX*, *ITGA6*, *ABL2* and *CDH6* genes. Finally the variant E-G350 decreases the expression of the *ITGA6*, *ABL2* and *CDH6* genes, and induces the overexpression of the *PCDH9* and *CDH18* gene ($p < 0.001$), compared to the E-prototype. The E6 oncoprotein variants of HPV 16 increases the ability of C33-A cells to adhere to collagen I and IV in comparison to the E-Prototype, with the variant AA-c being the one that most joined collagen I and IV ($p = 0.05$ and $p = 0.025$, respectively). **Conclusion:** The results suggest that the HPV16 E6 oncoprotein variants differentially affect the expression of genes related to cell adhesion in C33-A cells. Unlike the E-prototype, all variants induce increased adhesion of C33-A cells to collagens I and IV.

Key words: Cell adhesion, HPV16, E6 oncoprotein, C33-A cells.

III. INTRODUCCIÓN

El Virus del Papiloma Humano (VPH) tipo 16 pertenece a la familia *Papillomaviridae* y se encuentra dentro de los VPH de Alto Riesgo (HPV-AR) oncogénico (Bravo y Félez-Sánchez, 2015), el VPH 16 es el principal agente causal del cáncer cervical (CC) (Muñoz *et al.*, 2003). Hasta la fecha se han descrito un gran número de variantes del VPH 16, actualmente se dividen en 4 linajes principales: Asiática-Europea (EAS); Africana 1 (AFR1) Africana 2 (AFR2) y Asiática Americana/ Norte Americana (AA/NA) (Cornet *et al.*, 2012). Recientemente, en un estudio previo en nuestro grupo de trabajo, se encontró que las variantes AA-a, AA-c, E-A176/G350, E-C188/G350 y E-G350 se asocian con un riesgo mayor de desarrollar cáncer cervical (Ortiz-Ortiz *et al.*, 2015). Varios estudios han sugerido que la variabilidad intratípica natural que presentan las variantes del VPH16 podrían influir en su capacidad tumorigénica (Jackson *et al.*, 2014; Sichero *et al.*, 2012; Zhebe *et al.*, 2009). Se ha reportado que las variantes del VPH16 pueden afectar moléculas que participan en la proliferación (Jackson *et al.*, 2014) diferenciación y apoptosis (Zhebe *et al.*, 2009), reconocimiento inmune, regulación de la transcripción y estabilidad cromosómica (Tungteakkhum y Duerksen-Hughes, 2008), en la inmortalización y transformación celular (Sichero *et al.*, 2012; Niccoli *et al.*, 2012), en comparación con la E-Prototipo.

En un estudio previo en nuestro grupo de trabajo se analizó el efecto de la expresión de las variantes de la oncoproteína E6 en el perfil global de expresión génica en un modelo *in vitro* (células C33-A). Se encontró que la adhesión celular es el proceso celular con mayor número de genes alterados (Zacapala-Gómez *et al.*, 2016). Sin embargo, no hay suficiente evidencia experimental que evalúe el efecto de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 sobre la adhesión celular.

Se sabe que la oncoproteína E-Prototipo del VPH16 interactúa directamente con moléculas que participan en el mantenimiento de la polaridad celular como la proteína hDlg, B-2 syntropin (SNTB2) (Sun *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2016) y en la formación de las adhesiones celulares como el complejo ZO-1/ZO-2 (Thomas *et al.*, 2016), paxilina (Chakrabarti y Krishna, 2003), además de influir en la regulación

transcripcional de E-cadherina disminuyendo su expresión (D'Costa *et al.*, 2012) y en el cambio de la expresión de las cadherinas (Hu *et al.*, 2015).

También se sabe que para la transición epitelio mesénquima es necesario remodelar la matriz extracelular (MEC), cambiar la dinámica del citoesqueleto y desestabilizar las uniones celulares; la pérdida de la adhesión celular altera la homeostasis celular y es un paso crítico para el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Balzer y Konstantopoulos, 2012). Un factor crítico en la progresión maligna en la mayoría de los tumores epiteliales es la desregulación en la expresión de moléculas implicadas en la adhesión célula-célula como E-cadherina. Se ha demostrado que la disminución de E-cadherina y el aumento de la expresión de N-cadherina promueve la motilidad, invasión y metástasis (Hazan *et al.*, 2000).

Por lo anterior, en este estudio se evaluó el efecto de la expresión de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16 en la adhesión celular para poder sugerir o entender el papel de las variantes de la oncoproteína E6 en la adhesión de las células tumorales en el CC. Las variantes que se analizaron son las más frecuentes en la población guerrerense (AA-a, AA-c, E-A176/G350, E-C188/G350 y E-G350).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Las células C33-A transfectadas establemente con el gen E6 de las variantes (AA-a, AA-c, E-A176/G350, E-C188/G350 y E-G350) y E-prototipo del VPH 16 (Zacapala *et al.*, 2016) fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) (Corning Subsidiary Manassas, USA, Cat. No. 50-003-PBR), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FSB) (Byproductos, México), 1% de estreptomicina/penicilina (CAISSON LABORATORIES Inc., USA, Cat. No. PSL01) y 1% de geneticina G418 (EMD Millipore corp., USA, Cat. No. 345812) Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂.

Cuantificación del mRNA por RT-qPCR

El RNA fue extraído de las células transfectadas usando el reactivo TRizol® LS Reagent (Ambion® by Life Technologies™, Cat. No. 10296028, USA). El cDNA se obtuvo por transcripción reversa utilizando 500ng de RNA, enzima *SuperScript™ III* (200U/μl), DTT (4μl) (INVITROGEN, Thermo Fisher Scientific, Cat. No 18080-044, USA) y oligo dT (0.5 μg/μl) (Thermo Scientific, Cat. No. MAN0013109, USA). Para llevar a cabo la amplificación y cuantificación de los genes de adhesión (tabla 2) se realizó qRT-PCR empleando SYBR®Green (Thermo Scientific, Cat. No. K0222, USA.), y el sistema *7500 Real Time PCR System* de *Applied Biosystem*. Los valores de expresión relativa fueron obtenidos mediante el método $2^{-\Delta\Delta ct}$, ajustados a la expresión del gen endógeno Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los oligonucleótidos se diseñaron usando la herramienta IDT (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES) y se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la amplificación de genes de adhesión celular.

Gen	Secuencia (5'-3')	Longitud de amplicón (pb)	ID GenBank
GAPDH	F 5'- GACCCCTTCATTGACCTCAAC -3'	449	NM_001289745.1
	R 5'- GTGGCAGTGATGGCATGGAC -3'		
SRPX	F 5'-TCCAGAAGGAGACCACAAGA-3'	99	NM_006307.4
	R 5'-CCACAGCGTTTGACTCTTACT-3'		
CDH18	F 5'-TGAACGCCTGCCTGTAAAT-3'	87	XM_005248228.2
	R 5'-CTAAATCTCCTCCGCCTTGTC-3'		
PCDH9	F 5'-AAGCTGTGACTCTTTCCATTCT-3'	109	NM_203487.2
	R 5'-ATAGAGAGCAGCAGAGTTCTA-3'		
CDH6	F 5'-GGAAGCCTCCAATCCTTATGT-3'	93	NM_004932.3
	R 5'-TCTACATCCTCCACCACAATTC-3'		
ITGA6	F 5'-TTTTATCGGTCTCGGGAGTTG-3'	180	NM_001316306.1
	F 5'-ACCTTGAACATTCAGTGGCC-3'		
ABL2	F 5'-CAGGTAACCCACAGCCAGT-3'	174	NM_001168239.1
	R 5'-GTCCACCTTCTCAGCCAG-3'		
PCDHB3	F 5'-CTCCCCTTCTCCTGAAACC-3'	162	NM_018937.4
	R 5'-ACATAACCGTGCTGGTCTCC-3'		

Ensayo de adhesión

Para evaluar la capacidad de adhesión celular se utilizó el kit CytoSelect™ 48-Well Cell Adhesion Assay (ECM Array, Colorimetric Format) assay kits (Cell Biolabs Inc., CA USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células (1.0×10^6) se cultivaron en una placa de 48 pozos cubiertos con Fibronectina, colágeno I, Colágeno IV, Laminina, Fibrinogeno y albumina sérica bovina (BSA), después fueron incubadas a 37° C por 60 minutos, las células no adheridas fueron removidas, mientras que, las que permanecieron adheridas fueron teñidas con la solución *cell stain* 10 minutos a temperatura ambiente y extraídas con la solución *extracction*. Las muestras extraídas fueron transferidas a placas de 96 pozos y se midió la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro de microplacas Epoch™ (Biotek).

Análisis de estadístico

Los datos se presentan como medias \pm error estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas en los modelos de estudio se determinaron con la prueba ANOVA de una vía, mediante la prueba de comparación múltiple de Dunette utilizando el programa STATA v.11, los datos se graficaron utilizando el programa *GraphPad Prism* v.7, un valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

V. RESULTADOS

Las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16 modulan diferencialmente la expresión de genes de adhesión

Con la finalidad de evaluar el efecto que tienen las variantes AA-a, AA-c, E-A176/G350, E-C188/G350 y E-G350 de la oncoproteína E6 del VPH 16 sobre la expresión de genes relacionados con adhesión celular, se determinó el nivel de expresión del mRNA de los genes SRPX, PCDH9, ITGA6, ABL2, CDH18, PCDHB3 y CDH6 por PCR en tiempo real (qPCR).

Se encontró que la variante AA-a induce la disminución de la expresión de los genes SRPX ($p=0.05$), PCDH9, ITGA6, ABL2, CDH18, PCDHB3 y CDH6 ($p<0.001$) en comparación con la E-Prototipo (figura 1).

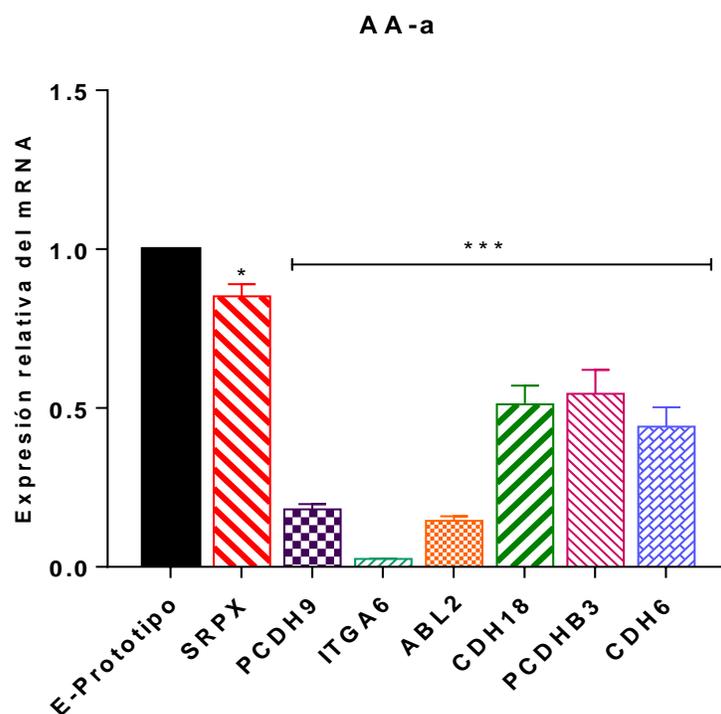


Figura 1. Nivel de expresión relativa del mRNA de los genes de adhesión modulados por la variante AA-a de la oncoproteína E6 del VPH 16. Se muestra la expresión relativa del mRNA de los genes de adhesión en las células C33-A con la E-prototipo y la variante AA-a. Los niveles de mRNA fueron determinados por RT-qPCR y normalizados con el gen GAPDH. Los datos se reportaron con media y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La prueba estadística utilizada para comparación de medias fue ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Dunette $p\leq 0.05$ (* $p<0.05$; ** $p<0.025$ ***; $p<0.001$).

Por el contrario, se encontró que la variante AA-c de la oncoproteína E6 del VPH 16 aumenta significativamente los niveles del mRNA de los genes SRPX y PCDH9 ($p < 0.001$) en comparación con la E-prototipo, mientras que el mRNA de los genes ITGA6, ABL2, CDH18, PCDHB3 y CDH6 disminuye significativamente ($p < 0.001$), como se observa en la figura 2.

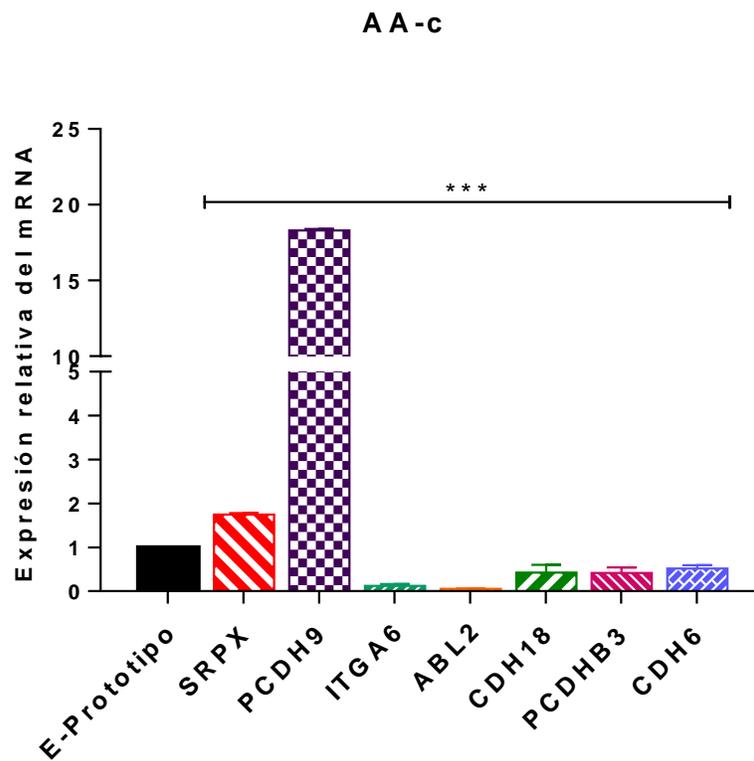


Figura 2. Nivel de expresión relativa del mRNA de los genes de adhesión modulados por la variante AA-c de la oncoproteína E6 del VPH 16. Se muestra la expresión relativa del mRNA de los genes de adhesión en las células C33-A con la E-prototipo y variante AA-c. Los niveles de mRNA fueron determinados por RT-qPCR y normalizados con el gen GAPDH. Los datos se reportaron con media y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La prueba estadística utilizada para comparación de medias fue ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Dunette $p \leq 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.025$ ***; $p < 0.001$).

Respecto a las variantes europeas, en las células C33-A/E-C176/G350 incremento significativamente la expresión del gen ABL2 en comparación con la E-Prototipo ($p < 0.001$), sin embargo los genes PCDH9, ITGA6, CDH18, PCDHB3 y CDH6, disminuyen su expresión ($p < 0.001$) figura 3.

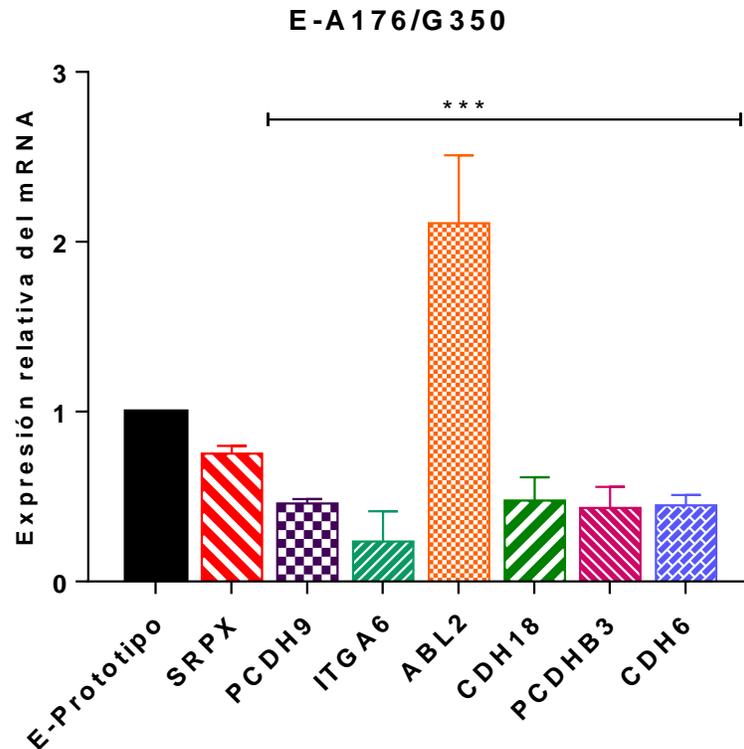


Figura 3. Nivel de expresión relativa del mRNA de los genes de adhesión modulados por la variante E-A176/G350 de la oncoproteína E6 del VPH 16. Se muestra la expresión relativa del mRNA de los genes de adhesión en las células C33-A con la E-prototipo y la variante E-A176/G350. Los niveles de mRNA fueron determinados por RT-qPCR y normalizados con el gen GAPDH. Los datos se reportaron con media y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La prueba estadística utilizada para comparación de medias fue ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Dunette $p \leq 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.025$ ***; $p < 0.001$).

Por otro lado la variante E-C188/G350 aumentó significativamente a expresión el mRNA de los genes PCDH9, CDH18 y PCDHB3 en comparación con la E-Prototipo ($p < 0.001$), en contraste se observó que hubo una reducción significativa de la expresión del mRNA de los genes SRPX, ITGA6, ABL2 y CDH6 ($p < 0.001$), como se observa en la figura 4.

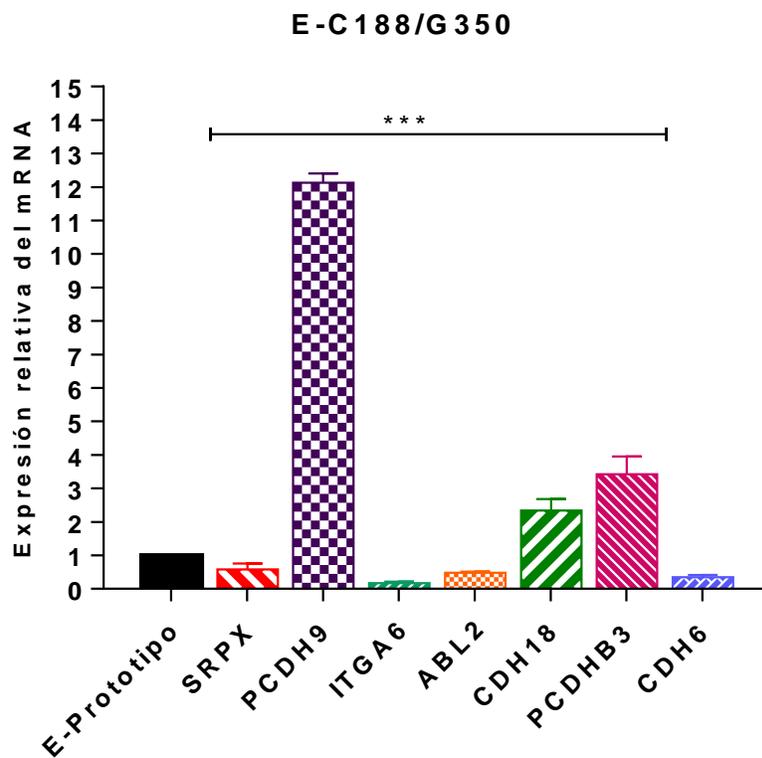


Figura 4. Nivel de expresión relativa del mRNA de los genes de adhesión modulados por la variante E-C188/G350 de la oncoproteína E6 del VPH 16. Se muestra la expresión relativa del mRNA de los genes de adhesión en las células C33-A con la E-prototipo y la variante E-C188/G350. Los niveles de mRNA fueron determinados por RT-qPCR y normalizados con el gen GAPDH. Los datos se reportaron con media y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La prueba estadística utilizada para comparación de medias fue ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Dunette $p \leq 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.025$ ***; $p < 0.001$).

La variante E-G350 aumentó significativamente la expresión del gen PCDH9 y CDH18 ($p < 0.001$), pero se reduce significativamente la expresión de los genes ITGA6, ABL2 y CDH6 ($p < 0.001$), como se observa en la figura 5.

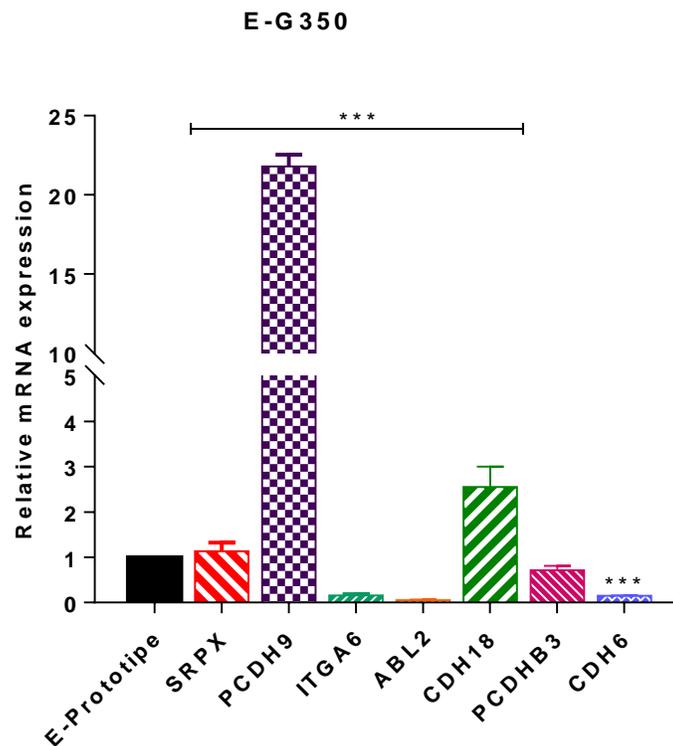


Figura 5. Nivel de expresión relativa del mRNA de los genes de adhesión modulados por la variante E-G350 de la oncoproteína E6 del VPH 16. Se muestra la expresión relativa del mRNA de los genes de adhesión en las células C33-A con la E-prototipo y la variante AA-a. Los niveles de mRNA fueron determinados por RT-qPCR y normalizados con el gen GAPDH. Los datos se reportaron con media y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La prueba estadística utilizada para comparación de medias fue ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Dunette $p \leq 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.025$ ***; $p < 0.001$).

Las variantes AA-a, AA-c, E-A176/G350, E-C188/G350 y E-G350 de la oncoproteína E6 del VPH 16 incrementan la adhesión de las células C33-A al colágeno I y IV de la MEC en comparación con la E-Prototipo

Se evaluó el efecto de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16 en la adhesión celular a componentes de la MEC. Interesantemente, se encontró que todas las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16 aumentan la capacidad de las células C33-A para adherirse al colágeno I y IV en comparación con la E-Prototipo, siendo la variante AA-c quien más se unió al colágeno I y IV ($p=0.05$ y $p=0.025$, respectivamente). Por el contrario, no se observan diferencias significativas respecto a los otros componentes de la matriz extracelular analizados (figura 6).

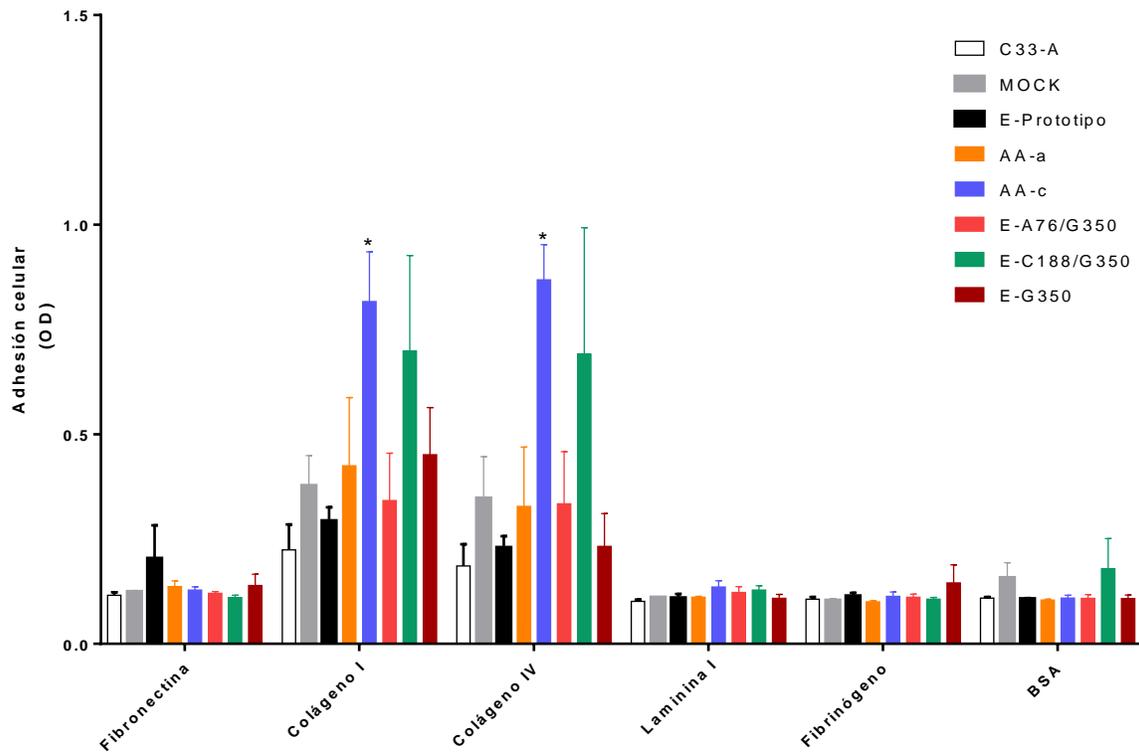


Figura 6. Cambios en la adhesión a componentes de la matriz extracelular de las C33-A transfectadas con variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16. Se muestra la densidad óptica que es proporcional a las células adheridas a los diferentes componentes de la matriz extracelular. Los datos se presentan como media y error estándar de tres experimentos independientes. La prueba estadística utilizada para comparación de medias fue ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Dunnett $p \leq 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.025$; *** $p < 0.001$).

VI. DISCUSIÓN

Ya se ha establecido la relación entre la infección del VPH 16 y el desarrollo del cáncer cervical, estudios recientes han encontrado que existen variaciones en la secuencia del genoma del VPH16 y por lo tanto cambios en la secuencia de aminoácidos. Como consecuencia de esos cambios se altera la función de la proteína y su participación en el desarrollo del CC. En la actualidad se sabe poco sobre el papel que juegan estas variantes en procesos celulares como la adhesión celular, la cual es muy importante para la carcinogénesis cervical.

La adhesión celular es importante para la homeostasis celular, del tejido y el organismo, en diferentes tipos de cáncer y especialmente en CC, donde se ha relacionado con la migración e invasión de las células cancerosas y con un peor pronóstico del paciente. En este estudio nos propusimos identificar que variante del VPH 16 induce más eficientemente pérdida de la adhesión celular y que genes están regulando este proceso en un modelo celular *in vitro*. Es por ello, que se evaluó la capacidad de las células para adherirse a diferentes proteínas de la matriz extracelular y la expresión de los genes SRPX, PCDH9, ITGA6, ABL2, CDH18, PCDHB3 y CDH6 en células C33-A que expresan las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16.

Encontramos que la oncoproteína E6 prototipo y sus variantes inducen un aumento en la capacidad de las células C33-A para adherirse a colágeno I y colágeno IV comparándolas con las células MOCK y C33-A sin transfectar. Interesantemente, la variante AA-c induce un mayor aumento en la capacidad de adherencia a los colágenos en comparación con la E-prototipo y las otras variantes analizadas. La desregulación de proteínas que remodelan la MEC es una característica común en la historia natural de cánceres humanos, que resulta en el colapso total en la composición normal y mantenimiento de la MEC. (Herbster *et al.*, 2018). Se han observado alteraciones en diferentes moléculas de la ECM en lesiones premalignas asociadas al VPH (Herbster *et al.*, 2018). Además se ha reportado que el colágeno I se encuentra sobre expresado en el estroma de tejidos de cáncer cervical en comparación con lesiones premalignas. (Cui *et al.*, 2017). En la actualidad no

existen reportes sobre las variantes de la oncoproteína E6 y su relación con los colágenos, este es el primer estudio que analiza este proceso.

Una posible explicación de nuestros resultados es que las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16 podrían conferir a las células C33-A características de células pluripotentes. Existen evidencias que sugieren que mediante la adherencia al colágeno IV se pueden aislar células con características “*stem cell*” o pluripotentes. Se ha demostrado que mediante el enriquecimiento de colágeno IV se pueden aislar poblaciones progenitoras que contienen células troncales putativas a partir de la mucosa oral (Igarashi *et al.*, 2008). También encontraron que las células que se adhieren rápidamente (RAC) tienen características morfológicas específicas, muestran una forma redonda regular, son más homogéneas y tienen un diámetro más pequeño en comparación con las células de adherencia tardía (Igarashi *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2014). Una limitante del ensayo de adhesión que utilizamos es que no pudimos observar las características morfológicas de las células después de adherirse al colágeno. También encontraron que las RAC cumplen con otras características de “*stem cell*” como habilidad de autorenovación, alta habilidad de iniciar el tumor, expresión de marcadores relacionados con *stem Cell* y mayor tasa de migración. En un futuro sería interesante evaluar en nuestro modelo parámetros o marcadores de células troncales para confirmar esta hipótesis. Nuestros resultados representan solo un primer acercamiento para dilucidar los mecanismos oncogénicos de las variantes del VPH 16.

Por otro lado, una consecuencia del aumento de la adhesión al colágeno, por parte de las células C33-A que expresan las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16, es que podría influir en el potencial de migración e invasión de dichas células mediante la modulación de la unión a colágeno. Se ha reportado que en los tumores metastásicos, las células están asociadas con fibras de colágeno y la motilidad celular lineal se observa a lo largo de las fibras de colágeno en comparación con las células de los tumores no metastásicos (Wang *et al.*, 2002).

La reorganización del colágeno es importante para el comportamiento celular y la invasión celular; en cáncer de mama se han identificado fibras de colágeno

alineadas radialmente que facilitan la invasión, lo que puede ser indicativo del potencial de crecimiento invasivo y metastásico de un tumor, además se observó que las células pueden experimentar invasión individual y colectiva (Provenzano *et al.*, 2006).

Por otro lado, encontramos que la variante E-A176/G350 induce el aumento de la expresión del gen ABL2, previos estudios han reportado sobre expresión de la proteína ABL2 en cáncer gástrico, principalmente en el citoplasma (Liu *et al.*, 2018), así como también en tumores de carcinoma hepatocelular, en donde la sobre expresión de ABL2 se relaciona con un tiempo de supervivencia más corto a diferencia de aquellos con baja expresión (Xing *et al.*, 2014). Esta variante tiene el cambio de aminoácido (D25N) a diferencia de las variantes Europeas, y este cambio le podría dar esta especificidad en la regulación de ABL2. Basado en estos reportes, podríamos suponer que la variante E-A176/G350 a través de la sobre expresión de ABL2 podría favorecer la migración e invasión celular mediante la formación de estructuras de tipo invadopodio, ya que se ha demostrado que el aumento en la expresión constitutiva de ABL2 favorece la formación de dichas estructuras celulares (Smith-Pearson, 2010).

En contraste, encontramos que las variantes AA-a, AA-c, E-G350, E-C188/G350 inducen la disminución de la expresión de ABL2. Una posible explicación es por la participación de microRNAs, como por ejemplo miR-125a-5p que es un regulador negativo de ABL2 (Qin *et al.*, 2016), en la actualidad no hay estudios en donde evidencien la relación de las variantes de la oncoproteína E6, miR-125a-5p y ABL2, sería interesante elucidar este mecanismo de regulación, ya que se ha reportado que las variantes asiáticas del VPH 16 pueden alterar la expresión de microRNAs (Chopjitt *et al.*, 2015). También en cáncer de próstata se ha reportado que ABL2 es regulado negativamente por MIR-20a y su disminución promueve la invasión celular y migración (Qiang *et al.*, 2014). Controversialmente tanto la disminución y el aumento en la expresión de ABL2 se ha relacionado con invasión y migración en diferentes tipos de cáncer (Qiang *et al.*, 2014; Smith-Pearson, 2010). Sin embargo

en carcinoma cervical sugieren que la regulación negativa de ABL2 disminuye la proliferación y migración de las células cancerosas (Qin *et al.*, 2016).

En este estudio encontramos que las variantes AA-c, E-C188/G350 y E-G350 aumentan la expresión del mRNA de PCDH9, sin embargo, no hay antecedentes que respalden estos hallazgos. Contrariamente a lo observado en el modelo *in vitro*, en nuestro grupo de trabajo se encontró que en las biopsias cervicales positivas al VPH 16 no hubo expresión del mRNA del gene PCDH9, mientras que en el tejido normal se encontró sobre expresión del mRNA de PCDH9. El gen PCDH9 codifica para la proteína protocadherina 9 que pertenece al grupo de las PCDH no-agrupadas, la protocadherina 9 participa en la formación de las uniones celulares en los tejidos neuronales (Keeler *et al.*, 2015). Su disminución se ha reportado en carcinoma hepatocelular (Jun *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2014), cáncer de ovario epitelial (Can *et al.*, 2017) y gliomas, (Wang *et al.*, 2016). Estos reportes son consistentes con lo observado en las variantes AA-a y E-A176/G350 que disminuyeron la expresión de PCDH9, un posible mecanismo por el cual, las variantes disminuyen la expresión de PCDH9, es a través de microRNAs, ya que se ha reportado que la variante asiática (con el cambio de aminoácido D25E) induce el aumento del microRNA miR-21 y como consecuencia regula negativamente sus genes blanco en células C33-A (Chopjitt *et al.*, 2015). Es importante agregar que se ha reportado que la oncoproteína E6 prototipo altera la expresión de microRNAs en cáncer cervical (Harden *et al.*, 2017; Honegger *et al.*, 2015). En otros tipos de cáncer como glioma PCDH9 también es regulado negativamente por microRNAs (Wang *et al.*, 2017). Es probable que las variantes utilicen este mecanismo epigenético para regular la expresión de PCDH9 y otros genes de adhesión. Otro mecanismo epigenético que podría estar participando en disminuir la expresión de PCDH9, es la metilación del DNA, en cáncer gástrico (Chen *et al.*, 2015) y carcinoma hepatocelular (Lv *et al.*, 2016) se ha encontrado metilación del promotor de PCDH9 y la pérdida de la expresión de PCDH9 se ha asociado con la progresión metastásica en cáncer gástrico (Chen *et al.*, 2015).

También encontramos que las variantes Europeas E-C188/G350 y E-G350 aumentaron la expresión del gen CDH18, curiosamente estas variantes comparten la variación L83V, sin embargo la E-A176/G350 que también contiene este cambio, indujo una disminución de CDH18, así como las variantes restantes. Hasta la fecha no hay reportes del aumento de la expresión de CDH18 en cáncer que sustenten nuestros hallazgos. Las variantes asiáticas disminuyeron la expresión de CDH18, de igual forma, se ha reportado que la expresión del ARNm de CDH18 se suprime gradualmente de los tejidos cerebrales normales a glioblastoma y la baja expresión se relaciona con una pobre supervivencia. Se sugiere que CDH18 podría regular negativamente la tumorigénesis de los gliomas como supresores de tumores, ya que al restaurar la expresión de CDH18 en células de glioma se inhibe la capacidad de invasión y migración, además se mejoró el efecto citotóxico de temozolomida, por lo tanto sugieren que CDH18 podría influir en la función de las mitocondrias a través de UQCRC2, y por lo tanto inhibir la invasividad y la quimio-resistencia de las células de glioma. (Bai *et al.*, 2018). Además en cáncer colorrectal el gen CDH18 se encuentra mutado (variación en el número de copias) (Venkatachalam *et al.*, 2010). En cáncer de ovario encontraron pérdida de metilación en un sitio CpG analizado del gen CDH18 comparándolo con las muestras de control, sugieren que la pérdida de metilación en este sitio en CDH18 puede participar en la expansión del cáncer de ovario (Chmelarova *et al.*, 2018). Esta podría ser una probable explicación sobre la regulación negativa de los genes analizados por efecto de las variantes de E6 del VPH16, no hay reportes que indiquen que las variantes de E6 del VPH 16 alteren la metilación del DNA celular, sin embargo, se ha reportado que las oncoproteínas prototipo E6 y E7 del VPH16 influyen en la metilación del DNA en cáncer cervical (Yin *et al.*, 2017; Rincón-Orozco *et al.*, 2009; Ki *et al.*, 2016; Au *et al.*, 2016).

Encontramos que la expresión del mRNA de SRPX que codifica para una proteína ligada al cromosoma X, que contiene dominios sushi (de la familia de las selectinas) es aumentada por la variante AA-c, a diferencia de las variantes AA-a y E-C188/G350 que disminuyen su expresión en comparación con la E-Prototipo. Este resultado coincide con lo encontrado en otro trabajo, en biopsias cervicales positivas

a la variante AA-c del VPH 16 (datos no publicados). Es importante resaltar que hay poca evidencia experimental sobre este gen en cáncer cervical, sin embargo se ha reportado que en líneas celulares transformadas con oncogenes retrovirales como v-src, v-sis y v-K-ras, la expresión de SRPX es disminuida (Pan *et al.*, 1996).

Se ha reportado que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH 16 no tienen efecto sobre la expresión de este gen, en un estudio en el que se transfectaron los oncogenes E6 y E7 del VPH 16 en una línea celular, no hubo cambios en la expresión de SRPX (Pan *et al.*, 1996), además se encontró que en la línea celular CaSki que contienen el genoma integrado del VPH 16 la expresión de SRPX se encontró disminuida comparándola con fibroblastos embrionarios humanos. Lo mismo se observó en células C33-A negativas a VPH y células HeLa positivas al VPH 18 (Yamashita *et al.*, 1999). Contrario a nuestros resultados, SRPX ha sido reportado disminuido en otros tipos de cáncer como cáncer de vejiga (Li *et al.*, 2017); adenocarcinoma colorrectal (Mukaisho *et al.*, 2002); carcinoma de próstata (Kim *et al.*, 2003), y su disminución se ha relacionado con la progresión tumoral. Es necesario realizar estudios donde se evalúen factores de transcripción que se unan al promotor de SRPX y analizar si E6 interactúa con estos factores, para dilucidar una parte del mecanismo molecular por el cual la variante AA-c está regulando a SRPX en las células C33-A.

Otro gen analizado es el que codifica para la proto-cadherina beta 3 (PCDHB3), el cual pertenece a las proto-cadherinas agrupadas. Se observó que la variante E-C188/G350 induce aumento del mRNA de PCDHB3 en comparación con la E-Prototipo y las demás variantes analizadas. Haciendo la comparación con un estudio en donde evaluaron la metilación del promotor en todo el genoma en muestras de lesiones premalignas, cáncer cervical, líneas celulares de cáncer cervical (C33-A, CaSki, SiHa, HeLa) y otras líneas celulares de cáncer, encontraron que 12 genes de PCDH agrupadas se encontraban metilados y silenciados, dentro de los cuales se encuentra PCDHB3. En base a lo anterior podemos inferir que el aumento del mRNA de PCDHB3 es por efecto de la expresión de la variante E-C188/G350, debido a que de forma basal en las células C33-A, PCDHB3

presentaban hipermetilación de su promotor y por lo tanto silenciamiento del gen, se desconoce el mecanismo molecular por el cual E-C188/G350 regula la expresión de PCDHB3. Hasta la fecha existe poca evidencia del estudio de PCDHB3 en cáncer cervical y en otros tipos de cáncer.

Curiosamente, observamos que todas las variantes disminuyen la expresión del gen CDH6, sin embargo, en biopsias cervicales positivas a las variantes E-G350 y AA- a se encontró aumentó en la expresión de CDH6 (datos no publicados). A diferencia de nuestro modelo experimental donde solo se expresa la oncoproteína E6, en las biopsias cervicales se encuentra el genoma completo del VPH 16 además del microambiente tumoral, el cual puede jugar un papel importante para la modulación de la expresión de genes celulares. La disminución de la expresión de CDH6 ha sido reportada en cáncer renal y se ha relacionado la disminución de CDH6 y E-Cadherina con un peor pronóstico del paciente (Paul *et al.*, 2004), además en colangiocarcinoma se ha sugerido a CDH6 como un supresor de tumor y como un biomarcador de progresión (Goeppert *et al.*, 2016), contrario a esto en carcinoma de células escamosas oral se ha reportado sobreexpresión de CDH6 y su incremento se relacionó con la metástasis a nódulos linfáticos (Ma *et al.*, 2018).

También analizamos el gen que codifica para la subunidad $\alpha 6$ de la integrina (ITGA6) y se encontró que todas las variantes de E6 del VPH 16 inducen la disminución de la expresión del mRNA del gen ITGA6, las proteínas de la familia integrina son heterodimeros formados por una subunidad alfa y una subunidad beta (Smith *et al.*, 2016), la integrina alfa-6/beta-4 (ITGA6) es un receptor de las células epiteliales que interactúa con laminina en la matriz extracelular (Meng *et al.*, 2010). Contrario a nuestros resultados, se ha reportado aumento en la expresión de ITGA6 a nivel proteína en tejido de cáncer cervical, este aumento se atribuye a la regulación negativa del miR-143-3P a través de la expresión de lncRNA OIP5-AS1, (Yang *et al.*, 2019). No hay evidencias sobre la regulación miR-143-3P por las variantes del VPH16, sin embargo esta podría ser una explicación de nuestros resultados sobre ITGA6, apoyando esta teoría se ha reportado que las variantes AA pueden alterar la expresión de microRNAs (Chopjitt *et al.*, 2015). Además, se ha

reportado que la variante AA disminuye la expresión de otro miembro de las integrinas, la integrina alfa-2 en queratinocitos primarios de prepucio humano en un pase de cultivo celular tardío, en comparación con la E6-prototipo (Sichero, *et al.*, 2012). Diferente a nuestro resultado, en otros tipos de cáncer se ha reportado aumento en la expresión de ITGA6 y se ha relacionado con pérdida de la diferenciación, alta invasividad, metástasis a nódulos linfáticos (Zhang *et al.*, 2016).

Una limitante de nuestro estudio es que el ensayo de adhesión utilizado no permite medir la adhesión célula-célula, para poder establecer una relación con los genes analizados que en su mayoría median este tipo de unión celular. Posiblemente nuestro modelo *in vitro* de células C33-A tiene desventajas con respecto a lo que sucede en la carcinogénesis cervical, sin embargo en diferentes estudios se ha utilizado este modelo celular para estudiar mecanismos que participan en la carcinogénesis cervical. Es necesario realizar estudios que traten de elucidar los mecanismos que utilizan las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16 para alterar la expresión génica celular, así como también tratar de evidenciar la relación que existen entre los colágenos y las variantes del VPH 16 y el papel que juegan los colágenos y sus receptores en la invasión y metástasis cervical.

En conjunto nuestros resultados sugieren que las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16 alteran de forma diferencial la expresión de genes relacionados con adhesión y que las variantes de la oncoproteína E6 incrementan la adhesión celular a colágeno I y IV. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que las variantes del VPH 16 tienen diferente potencial oncogénico y por lo tanto participan de manera diferente en los procesos que llevan a la carcinogénesis cervical y al mantenimiento del fenotipo tumoral.

VII. CONCLUSIÓN

Las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16 afectan diferencialmente la expresión de genes relacionados con la adhesión celular en células C33-A. A diferencia de la E-prototipo, todas las variantes inducen aumento de la adherencia de las células C33-A a los colágenos I y IV.

VIII. REFERENCIAS

1. Bai, Y., Zhan, Y., Yu, B., Wang, W., Wang, L., Zhou, J., *et al.* (2018). A Novel Tumor-Suppressor, CDH18, Inhibits Glioma Cell Invasiveness Via UQCRC2 and Correlates with the Prognosis of Glioma Patients. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 48:1755-1770.
2. Balzer, M.E., Konstantopoulos, K. (2012). Intercellular adhesion: mechanisms for growth and metastasis of epithelial cancers. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2: 171-181.
3. Bravo, G.I., Féllez-Sánchez, M. (2015). Papillomaviruses Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evolution Medicine y Public Health*. 1: 31-51.
4. Chakrabarti, O., Krishna, S. (2003). Molecular interactions of "high risk" human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *Journal of Biosciences*. 3: 337-348.
5. Chen, Y., Xiang, H., Zhang, Y., Wang, J., Yu, G. (2015). Loss of PCDH9 is associated with the differentiation of tumor cells and metastasis and predicts poor survival in gastric cancer. *Clin Exp Metastasis*. 32:417-428.
6. Chopjitt, P., Pientong, C., Bumrungrathai, S., Kongyingyoes, B., Ekalaksananan, T. (2015). Activities of E6 Protein of Human Papillomavirus 16 Asian Variant on miR-21 Up-regulation and Expression of Human Immune Response Genes. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 16: 3961-3968.
7. Chmelarova, M., Baranova, I., Ruzsova, E., Jan Laco, J., Hrochova, K., Dvorakova, E. (2018). Vladimir Palicka1 Importance of Cadherins Methylation in Ovarian Cancer: a Next Generation Sequencing Approach. *Pathology & Oncology Research*. 1:1-9.
8. Cornet, I., Gheit, T., Franceschi, S., Vignat, J., Burk, D.R., Sylla, S.B., *et al.* (2012). Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *Journal of virology*. 86: 6855-6861.
9. Cui, Y., Zhang, X., You, K., Guo, Y., Liu, C., Fang, X., *et al.* (2017). Nanomechanical Characteristics of Cervical Cancer and Cervical Intraepithelial Neoplasia Revealed by Atomic Force Microscopy. *Medical Science*. 23: 4205-4213.
10. D'Costa, Z. J., Jolly, C., Androphy, E. J., Mercer, A., Mattherws, C. M., Hibma, M. H. (2012). Transcriptional Repression of E-cadherina by Human Papillomavirus Type 16 E6. *Plos ONE*. 7: 1-10.
11. Estela-Ramírez, V., Arcos-Almazán, M. Efecto de las variants de la oncoproteína E6 del VPH 16 sobre la expresión de cadherinas en células C33-A (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Guerrero. 2017.
12. Gao, Z., Zhang, J., Bi, M., Han, Z., Wang, H., Ou, Y. (2015). SRPX2 promotes cell migration and invasion via FAK dependent pathway in pancreatic cancer. *Int J Exp Pathol*. 5: 4791-4798.
13. Goeppert, B., Ernst, C., Baer, C., Roesler, S., Renner, M., Mehrabi, A. (2016). Cadherin-6 is a putative tumor suppressor and target of epigenetically dysregulated miR-429 in cholangiocarcinoma. *Epigenetics*. 11: 780-790.
14. Harden, M., Prasad, N., Griffiths, A., Munger, K. (2017). Modulation of microRNA-mRNA Target Pairs by Human Papillomavirus 16 Oncoproteins. *mBio*. 8:1-14.
15. Hazan, B. R., Phillips, R. G., Qiao, F. R., Norton, I., Aaronson, A. S. (2000). Exogenous Expression of N-Cadherin in Breast Cancer Cells Induces Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *The Journal of Cell Biology*. 148: 779-790.
16. Herbster, S., Paladino, A., Freitas, S., Boccardo, E. (2018). Alterations in the expression and activity of extracellular matrix components in HPV-associated infections and diseases. *Clinics*. 1: 1-7.
17. Honegger, A., Schilling, D., Bastian, S., Sponagel, J., Kuryshev, V., Sülthmann, H. (2015). Dependence of Intracellular and Exosomal microRNAs on Viral E6/E7 Oncogene Expression in HPV-positive Tumor Cells. *PLoS Pathog*. 3: 1-33.
18. 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: 1345-1354.

19. Huertas-Salgado, A., Martín-Gámez, D.C., Moreno, P., Murillo, R., Bravo, M.M., Villa, L., *et al.* (2011). E molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: An updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology*. 410: 201-15.
20. Igarashi, T., Shimmura, S., Yoshida, S., Tonogi, M., Shinozaki, N., Yamane, G. (2008). Isolation of oral epithelial progenitors using collagen IV. *Oral Diseases*. 14:413–418.
21. Jackson, R., Togtema, M., Zehbe, I. (2013). Subcellular localization and quantitation of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein through immunocytochemistry detection. *Virology*. 435: 425–432.
22. Keeler, A., Molumby, M., Weiner, J.A. (2015). Protocadherins branch out: Multiple roles in dendrite development. *Cell Adhesion & Migration*. 9: 214-226.
23. Ki, E. Y., Lee, H. K., Hur, Y. S., Rhee, J. E., Kee, M. K., Kang, C. (2015). Methylation of Cervical Neoplastic Cells Infected With Human Papillomavirus 16. *International Journal of Gynecological Cancer*. 26: 176-183.
24. Kim, K., Garner-Hamrick, P. A., Fisher, C., Lee, D., Lambert, P. F. (2003). Methylation Patterns of Papillomavirus DNA, Its Influence on E2 Function, and Implications in Viral Infection. *Journal of Virology*. 77: 12450–12459.
25. Lichtig, H., Algrisi, M., Botzer, L. E., Abadi, T., Verbitzky, Y., Jackman, A., *et al.* (2006). HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virology*. 350: 216-227.
26. Liang, X., Osman, T. A., Sapkota, D., Neppelberg, E., Lybak, S., Liavaag, P. G. (2014). Rapid adherence to collagen IV enriches for tumour initiating cells in oral cancer. *Revista Europea de Cáncer*. 50: 3262-3270.
27. Lin, X., Chang, W., Wan, Y., Tian, M., Yu, Zhaoxiang. (2017). SRPX2, an independent prognostic marker, promotes cell migration and invasion in hepatocellular carcinoma. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 93: 398-405.
28. Liu, Y., Shao, C., Zhu, L., Jiang, S., Li, G., Zhang, W. (2018). La alta expresión de ABL2 suprime la apoptosis en el cáncer gástrico. *Digestive Diseases and Sciences*. 1: 1-7.
29. LV, J., Zhu, P., Zhang, X., Zhang, L., Chen, X., Lu, F., *et al.* (2017). PCDH9 acts as a tumor suppressor inducing tumor cell arrest at G0/G1 phase and is frequently methylated in hepatocellular carcinoma. *Molecular Medicine Reports*. 16: 4475-4482.
30. Ma, C., Zhao, Ji-Zhi., Lin, Run-Tai., Zhou, L., Chen, Youg-Ning. (2018). Combined overexpression of cadherin 6, cadherin 11 and cluster of differentiation 44 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 15: 9498-9506.
31. Mukaisho, Ken-ichi., Suo, M., Shimakage, M., Kushima, R., Inoue, H., Hattori, T. (2002). Down-regulation of drs mRNA in Colorectal Neoplasms. *Jpn. J. Cancer Res*. 93: 888-893.
32. Muñoz, N., Bosch, X.F., Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, V.K., *et al.* (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The new England Journal of Medicine*. 6: 518-27.
33. Niccoli, S., Abraham, S., Richard, C., Zehbe, I. (2012). The Asian-American E6 Variant Protein of Human Papillomavirus 16 Alone Is Sufficient To Promote Immortalization, Transformation, and Migration of Primary Human Foreskin Keratinocytes. *Journal of Virology*. 86: 12384–12396.
34. Ortiz-Ortiz, J., Alarcón-Romero, L.C., Jiménez-López, M.A., Garzón-Barrientos, V.H., Calleja-Macías, I., Barrera-Saldaña, H. A. (2015). Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virology Journal*. 1: 1-14.
35. Pan, J., Nalanishi, K., Yutsudo, M., Inoue, H., Li, Q., Oka, K., *et al.* (1996). Isolation of a novel gene down-regulated by v-src. *Letters*. 383: 21-25.
36. Paul, B., Neckning, U., Busch, R., Ewming, M., Hartung, R., Isaacs, W. (2004). Cadherin-6: a new prognostic marker for renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*. 171:97-101.
37. Provenzano, P. P., Eliceiri, K. W., Campbell, J. M., Inman, D. R., John G White, J. G., Keely, P. J. (2006). Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Medicine*. 4:1-16.

38. Qiang, Xiao-Fei., Zhang, Zheng-Wei., Liu, Q., Sun, N., Pan, Liang-Liang. (2014). miR-20a Promotes Prostate Cancer Invasion and Migration Through Targeting ABL2. *Journal of Cellular Biochemistry*. 115: 1269-1276.
39. Qin, X., Wan, Y., Wang, S., Xue, M. (2016). Drug Design, MicroRNA -125a-5p modulates human cervical carcinoma proliferation and migration by targeting ABL2. *Development and Therapy*. 10: 71–79.
40. Quan-tai, X., Chun-mei, Q., Wang, G. (2014). Overexpression of Abl2 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinomas and is associated with cancer cell migration and invasion. *OncoTargets and Therapy*. 7:881-885.
41. Rincon-Orozco, B., Halec, G., Rosenberger, S., Muschik, D., Nindl, I., Bachmann, A. *et al.* (2009). Epigenetic Silencing of Interferon- κ in Human Papillomavirus Type 16–Positive Cells. *The Journal of Cancer Research*. 22: 8719-8725.
42. Shi, C., Zhang, Z. (2017). Screening of potentially crucial genes and regulatory factors involved in epithelial ovarian cancer using microarray analysis. *Oncology Letters*. 14: 725-732.
43. Sichero, L., Sobrinho, J. S., Villa, L. L. (2012). Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. *Virology*. 1:127-32.
44. Smith, E.Y., Vellanki, H.S., Hopkins, M.A. (2016). Dynamic interplay between adhesion surfaces in carcinomas: Cell-cell and cell-matrix crosstalk. *World Journal of Biological Chemistry*. 7: 64-77.
45. Smith-Pearson, P. S., Greuber, E. K., Yogalingam, G., Pendergast, A. M. (2010). Abl Kinases Are Required for Invadopodia Formation and Chemokine-induced Invasion. *The Journal of Biological Chemistry*. 285, 40201-40211.
46. Sun, P., Dong, L., MacDonald, A.I., Akbari, S., Edward, M., Hodgins, M.B., *et al.* (2015). HPV16 E6 Controls the Gap Junction Protein Cx43 in Cervical Tumour Cells. *Viruses*. 7: 5243-5256.
47. Tanaka, K., Arao, T., Maegawa, M., Matsumoto, K., Kaneda, H., Kudo, K., *et al.* (2009). SRPX2 is overexpressed in gastric cancer and promotes cellular migration and adhesion. *International Journal Cancer*. 124: 1072-1080.
48. Thomas, M., Myers, M.P., Massimi, P., Guarnaccia, C., Banks, L. (2016). Analysis of Multiple HPV E6 PDZ Interactions Defines Type-Specific PDZ Fingerprints That Predict Oncogenic Potential. *PLoS Pathog*. 2: 1-21.
49. Tungteakkhun, S.S., Duerksen-Hughes, J. (2008). Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Archives of Virology*. 3: 397-408.
50. Wang¹, C., Yu, G., Liu, J., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, X. (2012). Downregulation of PCDH9 predicts prognosis for patients with glioma. *Neuroscience*. 19: 541-545.
51. Wang², C., Chen, Q., Li, S., Li, S., Zhao, Z., Gao, H., *et al.* (2017). Dual inhibition of PCDH9 expression by miR-215-5p upregulation in gliomas. *Oncotarget*. 8: 10287-10297.
52. Wang, Kai-Hung., Lin, Cuei-Jyuan., Liu, Chou-Jen., Liu, Dai-Wei., Huang, Rui-Lan., Ding, Dah-Ching., *et al.* (2014). Global methylation silencing of clustered proto-cadherin genes in cervical cancer: serving as diagnostic markers comparable to HPV. *Cancer Medicine*. 4:43-55.
53. Wang, W., Wyckoff, B. J., Frohlich, G. V., Oleynikov, Y., Hüttelmaier, S., Zavadil, J. (2002). Single Cell Behavior in Metastatic Primary Mammary Tumors Correlated with Gene Expression Patterns Revealed by Molecular Profiling. *Cancer Research*. 62: 6278–6288.
54. Venkatachalam, R., Verziel, E., Kamping, E., Hoenselaar, E., Görgens, H., Schackert, K.H. (2011). Identification of candidate predisposing copy number variants in familial and early-onset colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer*. 129: 1635-1642.
55. Xing Q. T., Qu, C. M., Wang, G. (2014). Overexpression of Abl2 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinomas and is associated with cancer cell migration and invasion. *Onco Targets Ther*. 7:881-5.
56. Yamashita, A., Hakura, A., Inoue, H. (1999). Suppression of anchorage-independent growth of human cancer cell lines by the drs gene. *Oncogene*. 18: 4777-4787.
57. Yang, J., Jiang, B., Hai, J., Duan, S., Dong, X., Chen, C. (2019). Long noncoding RNA opa-interacting protein 5 antisense transcript 1 promotes proliferation and invasion through

- elevating integrin $\alpha 6$ expression by sponging miR-143-3p in cervical cancer. *Journal Cellular Biochemistry*. 120:907-916.
58. Yeung, C. L. A., Tsang, Y. T., Yau, L. P., Kwok, T. T. (2017). Human papillomavirus type 16 E6 suppresses microRNA-23b expression in human cervical cancer cells through DNA methylation of the host gene C9orf3. *Oncotarget*. 8: 12158-12173.
 59. Yin, F., Wang, N., Wang, S., Yu, F., Sun, X., Yu, X. *et al.* (2017). HPV16 oncogenes E6 or/and E7 may influence the methylation status of RASSF1A gene promoter region in cervical cancer cell line HT-3. *Oncology Reports*. 3 2324 7: 2324-2334.
 60. Zacapala-Gómez, A.E., Del Moral-Hernández, O., Villegas-Sepúlveda, N., Hidalgo-Miranda, A., Romero-Córdoba, S.L., Beltrán-Anaya, F.O. (2016). Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma c33-A cells. *Virology*. 2016: 187-195.
 61. Zehbe, I., Richard, C., DeCarlo, C. A., Shai, A., Lambert, P. F., Lichtig, H. (2009). Human Papillomavirus 16 E6 Variants Differ in their Dysregulation of Human Keratinocyte Differentiation and Apoptosis. *Virology*. 1: 69–77.
 62. Zhang, Z. D., Yang, Z. L., Zhou, E., Miao, X., Zou, Q., Li, J. (2016). Overexpression of Thy1 and ITGA6 is associated with invasion, metastasis and poor prognosis in human gallbladder carcinoma. *Oncology Letters*. 12: 5136-5144.
 63. Zhu, P., LV, J., Yang, Z., Gou, L., Zhnag, L., Li, M. (2014). Protocadherin 9 inhibits epithelial–mesenchymal transition and cell migration through activating GSK-3 β in hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 452: 567-574.