



Universidad Autónoma de Guerrero
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Unidad Académica de Medicina/UIEM



Maestría en Ciencias Biomédicas

Efecto de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 en la apoptosis inducida por cisplatino.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

Q.B.P. Dorian Estefany Javier González

Director de tesis:

Dr. Oscar del Moral Hernández

Codirectora:

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

Chilpancingo de los Bravo, Gro. Enero de 2019

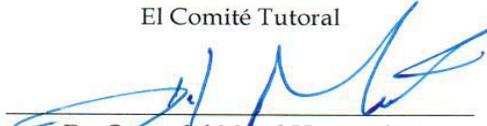


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

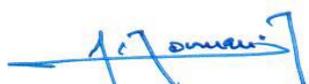
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

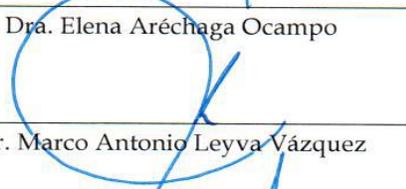
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 30 días del mes de octubre de dos mil dieciocho, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 en la apoptosis inducida por cisplatino", presentada por la alumna Dorian Estefany Javier González, 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.

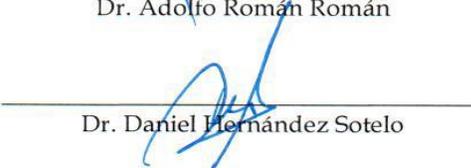
El Comité Tutorial


Dr. Oscar del Moral Hernández
Dirección de tesis


Dra. Elena Aréchaga Ocampo

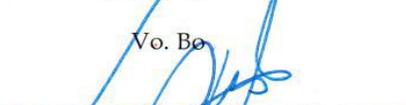

Dr. Adolfo Román Román


Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

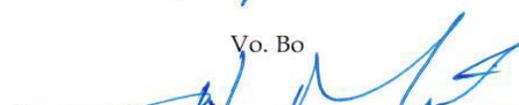

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Vo. Bo

Vo. Bo


Dr. Daniel Hernández Sotelo
Coordinador de la Maestría en Ciencias Biomédicas

DIRECCIÓN 2018 - 2021


Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas

DIRECCIÓN 2018 - 2021

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en el Laboratorio uno del Departamento de Biomedicina Molecular y en el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del CINVESTAV IPN y en el Laboratorio de Biología Celular de la UAM, Cuajimalpa.

Bajo la Dirección de:

Dr. Oscar del Moral Hernández

La Codirección de

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

La asesoría de

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Dr. Adolfo Román Román

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Durante el periodo en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Dorian Estefany Javier González recibió la beca 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).

DEDICATORIAS

A mis padres por todo su apoyo incondicional, sus consejos y por siempre estar en todo momento. A ustedes les debo todo lo que soy. Los amo infinitamente. A mis hermanos (los peleles 2,3, y 4) por su presencia, apoyo y consejos, yo sé que no siempre les expreso lo mucho que los quiero y lo orgullosa que estoy de ustedes y de sus logros, espero que sean eternos y que lleguemos a viejitos juntos.

A mi esposo por siempre sacarme una sonrisa y hacer que se me olvidara si tenía un mal día, por apoyarme y por no dejar que me dé por vencida. Por todos los momentos compartidos conmigo y mis amigos. Por aguantar mi ausencia y tenerme paciencia en estos dos años. Por creer en mí y motivarme en todo momento. Te amo

A mi familia por estar siempre apoyándome y dándome palabras de aliento cuando más las necesito, los quiero mucho a todos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Oscar por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por los consejos, su orientación, paciencia y motivación para concluir este proyecto. Pero sobre todo por su sincera amistad y por todos esos momentos compartidos con mis hermanitos académicos dentro y fuera del laboratorio. Muchas gracias papá académico.

Quiero agradecer a mis sinodales

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Dr. Adolfo Román Román

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Por su amistad, tiempo, aportaciones y consejos para la culminación de este trabajo.

Gracias al Dr. Nicolás Villegas por hacerme un espacio en su laboratorio para realizar algunos experimentos del proyecto. A Raúl por su paciencia y apoyo en el laboratorio.

Agradezco al M.C. Víctor encargado del laboratorio de citometría de flujo por su experiencia compartida, consejos, apoyo moral y por hacer amena mi estancia en el laboratorio.

Al Laboratorio de Biología Celular por permitirme trabajar en el cuarto de cultivo celular, donde se realizó la mayor parte del trabajo.

A la Dra. Eugenia Flores Alfaro por su amistad y apoyo con el análisis estadístico.

A la Dra. Mónica Espinoza mi maestra de seminario por su tiempo, consejos y paciencia para la revisión del trabajo. A mis amiguitos de seminario gracias por todos los cafés que me regalaron en clases, por sus consejos y por sus observaciones a mi trabajo, los quiero y espero que cada meta que se propongan la cumplan y tengan mucho éxito en la vida, espero que cuando seamos grandes, tan grandes como queramos llegar a serlo, el destino nos cruce en el camino y me contraten para trabajar con ustedes jajaja.

Al Laboratorio de Biomedicina por su apoyo, asesoría técnica y por permitirme trabajar un tiempo con ustedes.

A Laurita Garza, hermanita te admiro y estoy orgullosa de la mujer empoderada que eres, gracias por tu amistad, tus consejos y tu apoyo en estos dos años, espero que cumplas todos tus sueños, metas y propósitos de vida. Te quiero mucho, porfis cuando te cases me invitas a la boda (no quiero ser madrina) jajaja

Leilany mi amiga las más perry de todas jajaja nunca cambies, entre tú y Laura, hicieron esta experiencia muy amena y divertida. Te deseo lo mejor y lo más bonito en esta vida. ¡Bendiciones! Me invitas al Baby XD.

Fer, mi nutri favorita (la única por cierto jajaja), gracias por todos los momentos felices y de carcajadas que pase contigo en clases y donde quiera que nos encontráramos (jajaja hasta siento que te estoy escuchando en estos momentos), te quiero mucho y espero que sigas cosechando muchos éxitos en tu vida.

A mis hermanitos de laboratorio (Normita de Jesús, drAmerica, Lechuga, Huri, Juanjo, Bacho, Anita, Monge, Karen, Laurita Garza, las lupitas, Urucha) por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio. Los voy a extrañar, siempre tendré presente todos los momentos buenos, viajes, convivios (posadas, fiestas mexicanas, beber por beber jajaja). Monge, Karen, Bacho y Juanjo, les deseo el mejor de los éxitos en su vida profesional (que pronto encuentren trabajo jajaja), muchas felicidades mis nuevos hermanitos Q.B.P's. Lechuga, Huri y Urucha, ustedes que se quedan en la Maestría, quiero decirles que esto apenas comienza y se pondrá peor así que no me queda más de darles mis condolencias hermanitos y decirles que nada sale como uno quiere, pero ni modo es con lo que tenemos que trabajar así que mejor no se desesperen y sean felices :D. Hermanita drAmerica sabes que siempre te he dicho "que por que no te conocí antes", eres una gran persona, algo difícil, pero así te quiero mucho y agradezco tu amistad, consejos, apoyo y que hayamos coincidido en esta vida yo creo que aquí le voy a cortar porque creo que nunca voy a terminar jajajaja te quiero mucho hermanita, se siempre happy nunca inhappy. De todos me llevo algo bueno y deseo de todo corazón que les vaya bien en su vida personal y profesional, que cosechen muchos éxitos, pero que sobre todo quiero que sean felices, donde quiera que estén.

Dorian E. Javier González

**Efecto de las variantes de la oncoproteína E6
del VPH16 en la apoptosis inducida por
cisplatino.**

Índice

Resumen.....	1
Abstract	2
1 Introducción.....	3
2 Materiales y métodos	7
3 Resultados	10
4 Discusión.....	16
5 Conclusiones.....	20
6 Perspectivas.....	21
7 Referencias	22

Resumen

Antecedentes: Se han realizado varios estudios que han analizado el potencial oncogénico de algunas variantes del VPH16 y la desregulación de la apoptosis. Demostrando que las variantes de la oncoproteína E6 de VPH 16 y la E6 prototipo sensibilizan a NIKS a la apoptosis inducida por la vía extrínseca. O que las variantes desregulan diferencialmente la expresión de genes pro y anti-apoptóticos. **Objetivo:**

Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la capacidad de las variantes de E6 del VPH 16 para promover la resistencia a la apoptosis inducida por cisplatino en células C33-A.

Material y métodos: Se cultivaron células C33-A transfectadas establemente con el gen E6 de las variantes E-G350, AA-a, AA-c, E-C188, E-A176 y E-prototipo del VPH 16. Se determinó el nivel de expresión de la oncoproteína E6 en las células C33-A transfectadas con las variantes de E6 del VPH 16 por citometría de flujo. Se determinó la expresión de los genes proapoptóticos BAX, SLC25A6, CD70 y HIPK2 y los antiapoptóticos cIAP1, cIAP2, IGF1R en células C33-A que expresan las variantes E-G350, AA-a, AA-c, E-C188, E-A176 de la oncoproteína E6 del VPH 16 bajo tratamiento con cisplatino mediante PCR en tiempo real (q-PCR). **Resultados:** Las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 muestran diferencias en la apoptosis inducida por cisplatino (vía intrínseca). Encontramos que las células C33-A/E6 prototipo son más resistentes a la apoptosis, mientras que las células C33-A/E-A176 son más sensibles a la apoptosis. En el caso de la expresión de los genes pro y anti apoptóticos bajo tratamiento, la variante E-G350 aumenta la expresión de los genes analizados.

Conclusión: Las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 modulan diferencialmente la apoptosis y la expresión de genes pro y anti-apoptóticos implicados en la vía intrínseca. Interesantemente, las células C33-A/E6 prototipo fueron las más resistente a la apoptosis inducida por cisplatino mientras que las C33-A/E-A176, E-C188, E-G350, AA-a y AA-c fueron las más sensibles.

Palabras clave: Apoptosis, oncoproteína E6, variantes, cisplatino, VPH 16

Abstract

Background: Several studies have been carried out that have analyzed the oncogenic potential of some variants of HPV16 and the deregulation of apoptosis. Demonstrating that the variants of the E6 oncoprotein of HPV16 and the E6 prototype sensitize NIKS to apoptosis induced by the extrinsic pathway. Or that the variants differentially deregulate the expression of pro and anti-apoptotic genes. **Objective:** Therefore, in this work we evaluated the ability of the E6 variants of HPV16 to promote the resistance to apoptosis induced by cisplatin in C33-A cells. **Material and methods:** C33-A cells stably transfected with the E6 gene of the variants E-G350, AA-a, AA-c, E-C188, E-A176 and E-prototype of HPV16 were cultured. The level was determined of expression of the E6 oncoprotein in C33-A cells transfected with the E6 variants of HPV16 by flow cytometry. We determined the expression of the pro-apoptotic genes BAX, SLC25A6, CD70 and HIPK2 and the anti-apoptotic genes cIAP1, cIAP2, IGF1R in C33-A cells expressing the variants E-G350, AA-a, AA-c, E-C188, E-A176 of the oncoprotein E6 of HPV16 under treatment with cisplatin by real-time PCR (q-PCR). **Results:** Variants of HPV16 E6 oncoprotein show differences in apoptosis induced by cisplatin (intrinsic pathway). We found that C33-A/E6 prototype cells are more resistant to apoptosis, whereas C33-A/E-A176 cells are more sensitive to apoptosis. In the case of the expression of the pro and anti-apoptotic genes under treatment, the E-G350 variant increases the expression of the analyzed genes. **Conclusion:** Variants of the HPV16 E6 oncoprotein modulate differentially the apoptosis and the expression of pro and anti-apoptotic genes involved in the intrinsic pathway. Interestingly, the C33-A/E6 prototype cells were the most resistant to cisplatin-induced apoptosis while the C33-A/E-A176, E-C188, E-G350, AA-a and AA-c were the most sensitive.

Key words: Apoptosis, E6 oncoprotein, variants, cisplatin, HPV16

1 Introducción

La apoptosis mantiene el equilibrio en los tejidos de los organismos, ayudando a eliminar células dañadas. Sin embargo, cuando existe una desregulación de este mecanismo por muerte excesiva o por resistencia a la muerte, se desarrollan varias patologías humanas. Una de las patologías más comunes es el cáncer, en el cual, la desregulación de la apoptosis promueve la supervivencia celular, debido al bloqueo de la muerte celular programada tanto por la vía extrínseca como la vía intrínseca (Fuchs y Steller, 2011; Scott y Athena, 2000).

La vía extrínseca es desencadenada por la activación de “receptores de muerte” en la membrana plasmática tales como: fosfatidilserina (PS-R), TNFR1, FAS (APO-1/CD95) y DR4.5. Cuando los ligandos activan a estos receptores de muerte se desencadena una cascada de señalización en el interior de la célula. Durante este proceso se reclutan proteínas adaptadoras como la proteína de dominio de muerte asociado a FAS (FADD), las cuales a su vez reclutan procaspasas iniciadoras 8 y 10, formando un complejo de señalización inductor de muerte (DISC). Las caspasas iniciadoras, activan a las procaspasas ejecutoras 3 y 7 induciendo apoptosis (Alberts *et al.*, 2010; Chung-Hsiang *et al.*, 2012).

Mientras que la vía intrínseca responde a una variedad de estímulos que generan señales de estrés como son: daño al DNA, radiación, falta de oxígeno, estrés osmótico y falta de nutrientes. Estos estímulos desencadenan la liberación de proteínas desde la membrana mitocondrial hacia el citosol. Una de las principales proteínas liberadas necesaria para la activación de esta vía es el citocromo C, el cual se une al factor activador de proteasas apoptóticas-1 (Apaf1). Estas proteínas se unen a la procaspasa-9 y forman un complejo en el citosol llamado apoptosoma. En el apoptosoma se activa la caspasa-9 la cual, a su vez puede activar a las procaspasas ejecutoras 3, 6 y 7 induciendo a la apoptosis (Alberts *et al.*, 2010; Chung-Hsiang *et al.*, 2012).

Existen diferentes maneras en las que una célula maligna puede evitar la apoptosis o adquirir resistencia a ella. Los mecanismos por los que una célula puede evadir la apoptosis pueden dividirse en tres grupos: A) perturbando el equilibrio de las proteínas pro y anti- apoptóticas, B) reduciendo la función de las caspasas o C) alterando la señalización de los receptores de muerte. En el grupo A podemos encontrar a las células infectadas por virus que también pueden inducir resistencia a la apoptosis, lo cual les permite iniciar y mantener la producción y propagación eficiente de su progenie. Por esta razón, muchos virus, especialmente los virus de DNA, como es el caso del Virus del Papiloma Humano (VPH) pueden inhibir o retrasar estas acciones de protección, a menudo alterando proteínas celulares clave que llevan al desarrollo de cáncer cervical (Wong, 2011; Chung-Hsiang *et al.*, 2012; Woodman *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2006). Se ha demostrado que los Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo (VPH-AR) son el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cervical (CC). Sin embargo, el genotipo comúnmente implicado en la mayoría de los casos de CC es el VPH 16 (Zur Hausen, 2002; Zur Hausen, 1999). La capacidad que tiene el VPH 16 para producir lesiones pre malignas y CC, es debida a la transcripción de dos oncoproteínas: E6 y E7. Estas oncoproteínas juegan un papel clave en la transformación celular porque pueden unirse a varias proteínas celulares que están implicadas en procesos fundamentales de la célula, como diferenciación celular, adhesión, ciclo celular, respuesta inmune y apoptosis (Narisawa- Saito *et al.*, 2007; Chung-Hsiang *et al.*, 2012; Woodman *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2006).

El genoma del VPH 16 tiene 7,904 pb y consiste de 8 genes que codifican para sus respectivas proteínas: L1, L2, E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (Cornet *et al.*, 2012). Basados en la información de la secuencia, se define un nuevo tipo de VPH cuando difieren más del 10% de la región codificante de L1. Dentro de un mismo genotipo, se han identificado variaciones intratípicas como subtipos cuando difieren entre 2 y 10% de homología en la región L1 y se denominan variantes cuando difieren en la secuencia de nucleótidos en no más del 2% en las regiones codificantes y hasta un 5% en la región no codificante (Huertas-Salgado *et al.*, 2011).

Las variantes de VPH 16 han sido clasificadas en cuatro linajes importantes: Asiático-Europea, Africana 1, Africana 2, Asiático-Americana/ Norte-Americana y nueve sublinajes: EUR, As, Afr 1a, Afr 1b, Afr 2a, Afr 2b, AA 1, AA 2 y NA (Cornet *et al.*, 2012). Estas diferencias en la secuencia de nucleótidos generan cambios de aminoácidos en la oncoproteína E6 del VPH 16, por ejemplo, el polimorfismo T350G es común en la variante Europea, causa un cambio de una leucina por una valina en la posición 83 (L83V); mientras que el polimorfismo T178G es común en la variante Asiática, que genera un cambio de un ácido aspártico por un ácido glutámico en la posición 25 (D25E). Otro polimorfismo común en las variantes Asiático Americana y Norte Americana, es el G145T que genera un cambio de una glutamina por una histidina en la posición 14 (Q14H) (Huertas-Salgado *et al.*, 2011).

Varios estudios han analizado el potencial oncogénico de algunas variantes del VPH16 y la desregulación de la apoptosis. Por ejemplo, Zehbe *et al.*, (2009) analizó la desregulación de la diferenciación y la apoptosis en un modelo de queratinocitos humanos normales (NIKS) transfectados con las variantes de la oncoproteína E6 de VPH 16 (E-G350, E-G131/G350 y AA-a) y la E6 prototipo. Encontró que estas variantes sensibilizan a los NIKS a la apoptosis inducida por la vía extrínseca. En otro de sus trabajos evaluó el papel de las variantes europeas E-A126, E-G131 y E-T245 en comparación con la variante E-G350. Demostró que las variantes europeas E-A126, E-G131 y E-T245 de E6 tienen capacidades similares a la variante E-G350 para inhibir el arresto del ciclo celular y para reducir los niveles de p53 inducidos por actinomicina D (Zehbe *et al.*, 2011).

En nuestro grupo de trabajo, recientemente se analizó el efecto de la expresión de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16(AA-a, AA-c, E-A176/G350, E-C188/G350 y E-G350), en comparación con la E-Prototipo en un perfil global de expresión de genes en un modelo *in vitro* utilizando la línea celular C33-A transfectadas con la oncoproteína E6 del VPH16. Se demostró que las variantes desregulan diferencialmente la expresión de genes implicados en varios procesos celulares. En el caso de la apoptosis se encontró que algunos genes apoptóticos están desregulados,

por ejemplo; en las células que expresan la variante AA-a se aumenta la expresión de los genes ANGPT1 e IGF1R y disminuye el gen THBS1. Mientras que en la variante AA-c se encontró que los genes NR4A1, THBS1, CADM1 y PEG10 aumentan su expresión y que los genes SLC25A6, CD70, CUL5, CAMK1D, HIPK2, EEF1A2 y SYNE1 la disminuyen. En la variante E-G350 los genes BMP7, BNIP3 e IGF1R se encuentran sobre-expresados y SYNE1 sub-expresado (Zacapala-Gómez *et al.*, 2015). Por otro lado, las células HaCAT que expresan la variante E-G350 de E6 del VPH16 tienen mayor resistencia a agentes quimioterapéuticos como el cisplatino, pero mayor sensibilidad a la radioterapia, comparadas con las células que expresan E-Prototipo (Rodríguez-Godínez, R, tesis de maestría, 2015).

En el estado de Guerrero, las variantes E-G350, AA-a, AA-c, E-C188/G350 y E-A176/G350 de la oncoproteína E6 del VPH 16, son las más frecuentes en mujeres con CC. Sin embargo, la evidencia epidemiológica sugiere que mujeres infectadas con la variante AA-a, tienen mayor riesgo de desarrollar CC que las infectadas con la E-prototipo (Ortíz-Ortíz *et al.*, 2015).

La quimioterapia con cisplatino es el tratamiento de primera elección para muchos tipos de cáncer, incluyendo el CC. El cisplatino es un fármaco que causa daño el DNA y actúa mediante la inducción de muerte celular por apoptosis de manera dependiente de la concentración y el tiempo de exposición. Sin embargo, se ha observado que en algunas pacientes los tumores generan resistencia al tratamiento con cisplatino. Por lo que se sugiere que la presencia de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH 16 pueden estar implicadas en la resistencia al tratamiento debido a que los cambios de aminoácidos en la oncoproteína E6 podrían ser suficientes para alterar diferencialmente la expresión de genes pro y anti apoptóticos. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la capacidad de las variantes de E6 del VPH 16 para promover la resistencia a la apoptosis inducida por cisplatino en células C33-A.

2 Materiales y métodos

Cultivo celular

La línea celular de carcinoma de cuello uterino C33-A se cultivó a 37°C en 5% de CO₂, utilizando DMEM (CORNING, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (BYproducts), 100 U / ml de penicilina y 100 mg / ml de estreptomina (caisson, USA) y 500µg/ml Geneticina (G418) (Invitrogen, Corp.). Las células C33-A transfectadas con las variantes E-G350, AA-a, AA-c, E-C188/G350, E-A176/G350 de E6 del VPH16 y la E-prototipo se generaron por el método reportado previamente (Del Moral-Hernández *et al.*, 2010 y Zacapala *et al.*, 2015)

Citometría de flujo

Se sembraron 500,000 células en cajas de seis pozos (CORNING) y se cultivaron por 24 horas. Se lavaron 3 veces con PBS 1x (Gibco, Life Technologies, USA) y posteriormente se despegaron con tripsina al 10 % (Invitrogen) y se re suspendieron en un mL de PBS 1x. Se midió en porcentaje de células positivas a la proteína verde fluorescente (GFP) en el canal FITC-A en el citómetro BD FACSCanto II con el software BD FACSDiva™.

Ensayos de apoptosis con Anexina V

Se realizaron ensayos de apoptosis en las células C33-A usando cisplatino (ZURIDRY) a la concentración IC50 (10 µM) por 24 h y se usó un control positivo de muerte células C33-A irradiadas con LUV (40 mJ por 120 s) y un control negativo (células sin el agente inductor de apoptosis). Se preparó un buffer de unión a Anexina V con HEPES 10 mM, NaCl 140 mM y CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,4. Para marcar las células en apoptosis se adicionó Anexina V [0.125 mg/µl] (Invitrogen, USA).

Los resultados se analizaron de acuerdo a las poblaciones, las cuales se dividirán en al menos dos grupos: células vivas con un bajo nivel de fluorescencia y células apoptóticas con una intensidad de fluorescencia significativamente más alta. Para distinguir las células necróticas de las células apoptóticas SYTOX Blue [0.1 mg/µl] (Invitrogen, USA) que es un colorante de unión a ADN.

Los resultados se interpretarán de la siguiente manera:

- *Células viables: no se unen a la Anexina V y excluyen SYTOX® Blue.
- *Células en apoptosis temprana: se unen a la Anexina V y excluyen SYTOX® Blue
- *Células en apoptosis tardía: se unen a la Anexina V e incorporan SYTOX® Blue
- *Células necróticas: solo incorporan SYTOX® Blue.

Determinación de la expresión de genes pro y antiapoptóticos

Extracción de RNA

La extracción de RNA total se realizó con TRIzol (Invitrogen), se utilizaron células C33-A transfectadas con el vector pEGFN1 y con cada una de las variantes (E-G350, AA-a, AA-c, E-C188/G350, E-A176/G350) de la oncoproteína E6 del VPH16 y la E-prototipo tratadas con cisplatino. Se partió de cultivos celulares con una confluencia del 80%, posterior a la extracción se realizó el tratamiento con DNAsa, utilizando 1µL de enzima y 500µg/µL de RNA.

Retrotranscripción (RT)

A partir del RNA total obtenido, se realizó la retrotranscripción utilizando 500ng de RNA, además de la enzima transcriptasa inversa *SuperScript III* (200 u/µL), DTT (4µL) y oligo dT (Invitrogen) (0.5µg/µL) para la detección del mRNA.

PCR en tiempo real (qPCR)

La qPCR-tiempo real se realizó por el método de SYBR Green que se basa en la incorporación de un fluoróforo a los productos de PCR de doble cadena que se van generando durante la reacción. Todas las reacciones se llevaron a cabo en 7500 Real Time PCR System de Applied Biosystem, usando el PCR Master mix Power SYBR® Green de Applied Biosystem. El gen constitutivo utilizado fue el Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Se realizó una curva de amplificación para determinar el Ct de cada una de las muestras y una curva de disociación para verificar la especificidad para cada uno de los genes.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la qPCR-tiempo real.

Gen	Secuencia	Longitud (pb)	Nucleótidos	Amplificación (pb)	No. Acceso
GAPDH	Sentido 5'-GACCCCTTCATGACCTCAAC-3'	21	383-403	449 pb	001289745.1
	Antisentido 5'-GTGGCAGTGATGGCATGGAC-3'	20	812-831		
cIAP1	Sentido 5'-TTGTCACCTTCAGATACCCTGAAG-3'	25	2807-2831	123 pb	001256163.1
	Antisentido 5'-CAAGCCAGATTTAACCACAGGTG-3'	23	2907-2929		
IGF1R	Sentido 5'-TGTTGATGTGGGAGGGTGTGATT-3'	26	2834-2860	108 pb	000875.4
	Antisentido 5'-AGTACTCCGGTTCACAGCATACA-3'	27	2915-2942		
HIPK2	Sentido 5'-AAACCCAGGCCAGCGAATTGGT-3'	25	2918-2943	101 pb	001113239.2
	Antisentido 5'-CACGTTGCTGGAGGACGACTTGT-3'	26	2993-3019		
cIAP2	Sentido 5'-AGGGAAGAGGAGAGAGAAGAGC-3'	23	4077-4099	133 pb	001165.4
	Antisentido 5'-CGGCAGTTAGTAGACTATCCAGG-3'	23	4087-4210		
BAX	Sentido 5'-ATGGACGGGTCCGGAGCAGCCC-3'	24	70-94	595 pb	001291428.1
	Antisentido 5'-GGTGAGCCTCCGCCAAAGAT-3'	24	641-664		
SLC25A6	Sentido 5'-TGGACAAGCACACGCATTCTGGA-3'	24	308-332	108 pb	001636.3
	Antisentido 5'-TTCTGGCGAAATCCGCGGGTACA-3'	24	392-416		
CD70	Sentido 5'-TGCGTCTCAGCTTCCACCAGGTT-3'	24	428-452	125 pb	001252.4
	Antisentido 5'-GGTCTCATCAGTGTTGAAGGCAA-3'	27	526-553		

Consideraciones éticas y de bioseguridad

Las muestras biológicas generadas fueron eliminadas en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, (Norma de protección ambiental, Salud ambiental, Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos).

Análisis de datos

El análisis de los datos se realizó en el programa Stata v13, los resultados se reportaron en medias y error estándar de tres experimentos independientes, para la comparación de los resultados se utilizó la prueba de ANOVA de una vía, Dunnett y t de student, los valores de $p < 0.05$ se considerarán como estadísticamente significativo. Para la elaboración de graficas se utilizó en programa prism-GraphPad.

3 Resultados

La expresión de la oncoproteína E6 del VPH 16 es homogénea en células C33-A.

Para determinar la expresión exógena de la oncoproteína E6 de las variantes E-G350, E-A176, E-C188, AA-a, AA-c y E-prototipo del VPH16 en las células C33-A se realizaron ensayos de citometría de flujo, mediante la identificación y cuantificación de la proteína verde fluorescente (GFP), la cual se encuentra fusionada a E6. Como control positivo se usaron células C33-A transfectadas con el plásmido pEGFN1 (C33-A/mock), que solo expresan GFP (89.15%) y como control negativo células C33-A sin transfectar (figura 1 A). Los resultados mostraron que todos los grupos analizados tienen más del 80% de células positivas a GFP: E-prototipo (87.86%), E-A176 (84.94%), E-C188 (98.97%), E-G350 (80.72%), AA-a (84.95%) y AA-c (86.91%) (figura 1 B).

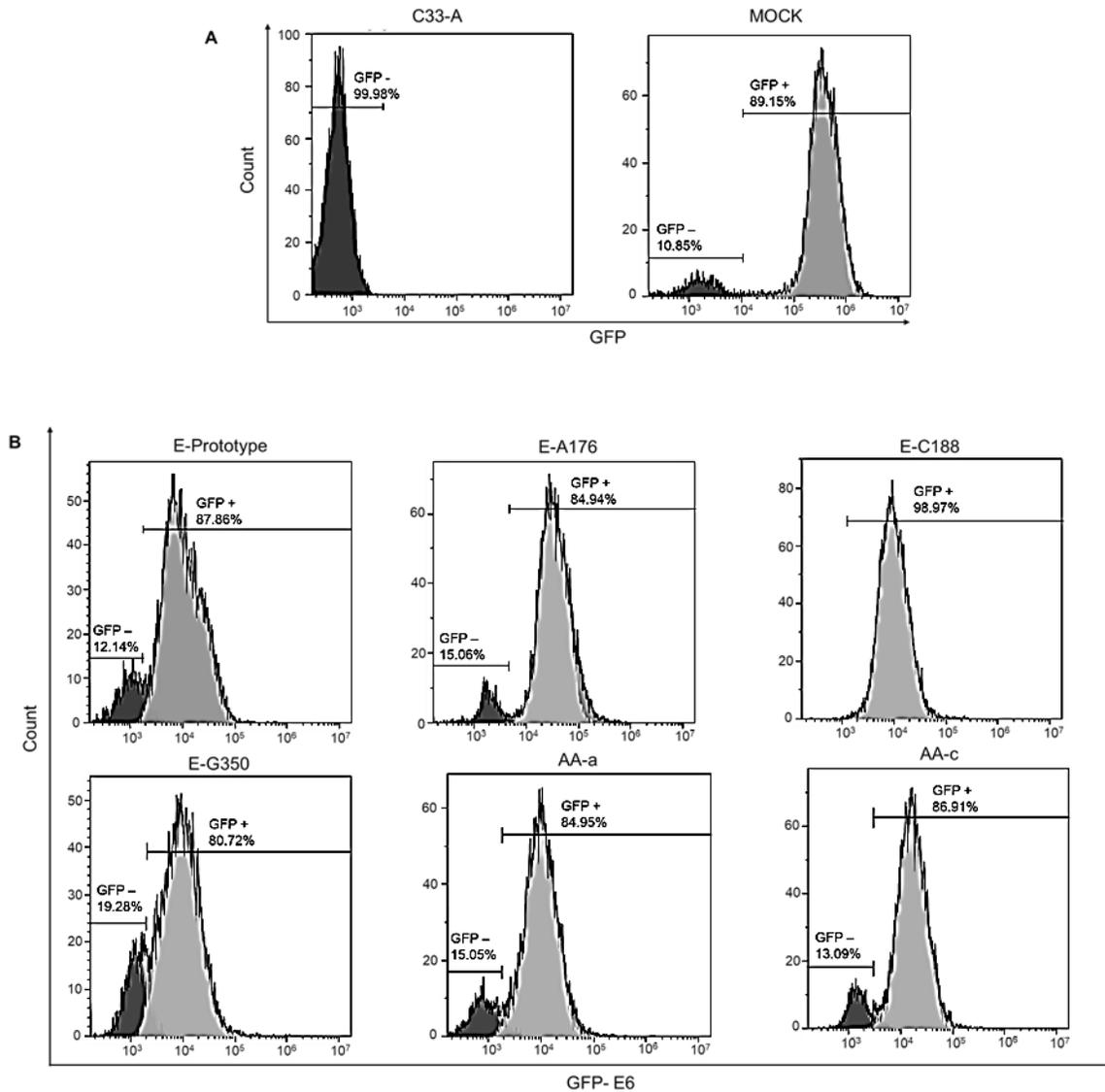


Figura 1. Expresión de la oncoproteína E6 del VPH16. Se determinó la expresión de la oncoproteína E6 en células C33-A transfectadas establemente con las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 por citometría de flujo mediante la detección de GFP. En el panel A se muestran las células C33-A sin transfectar como control negativo de GFP y células Mock como control positivo de GFP; las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 se muestran en el panel B. Se analizaron 20,000 células por cada muestra. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes por duplicado.

Las células C33-A que expresan la oncoproteína E6 prototipo son más resistentes a la apoptosis inducida por cisplatino

Se analizó el efecto de la expresión de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 en la apoptosis inducida por cisplatino. La apoptosis se detectó mediante la identificación de *Anexina V* la cual se une específicamente a la fosfatidil serina una señal específica en las células apoptóticas y la detección de *Sytox Blue* el cual se une al DNA. Se identificaron las células en apoptosis temprana y tardía de acuerdo con la tinción exclusiva de *Anexina V* o con la doble tinción con *Anexina V* y la incorporación de *Sytox Blue* respectivamente. En la figura 2 se muestran imágenes representativas de los experimentos. Los resultados muestran el grupo control: C33-A sin transfectar y sin tratamiento presentan 90.55% de células vivas, 2.51% de células en apoptosis temprana y 0.55% de células en apoptosis tardía; las células C33-A sin transfectar presentan 72.15% de células vivas, 20.27% de células en apoptosis temprana y 0.91% en apoptosis tardía y las células C33-A/mock presentan 50.73% de células vivas, 9.40% en apoptosis temprana y 9.20% en apoptosis tardía con la concentración 10 μ M de cisplatino (figura 2 A) y el grupo experimental: células C33-A transfectadas establemente con las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 (figura 2 B). En la gráfica se representan los porcentajes de células vivas y células apoptóticas del panel A y B (figura 2 C). Observamos que las células que expresan la oncoproteína E-prototipo son más resistentes a la apoptosis con respecto al control (células C33-A Mock, tratadas con cisplatino) y a las células que expresan las variantes de la oncoproteína E6, con un 22.58% de células apoptóticas, de las cuales el 37.72% de las células están en apoptosis temprana y 40.77% en apoptosis tardía (figura 2 D). Mientras que las células que expresan la variante E-A176 son más sensibles a la apoptosis (seguida por la AA-a 34.72%) con un porcentaje de células apoptóticas del 79.80%, de este porcentaje el 74.64% de las células están en apoptosis temprana y 19.73% en apoptosis tardía (figura 2 D). Mientras que las variantes E-C188 (35.7%), E-G350 (48.31%) y AA-c (25.14%) no presentan un cambio significativo con respecto al control. Debido a que observamos que las variantes de la oncoproteína E6 pueden modular diferencialmente este proceso celular, se analizaron algunos genes pro y anti apoptóticos que participan en la vía intrínseca de la apoptosis.

“Efecto de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 en la apoptosis inducida por cisplatino”

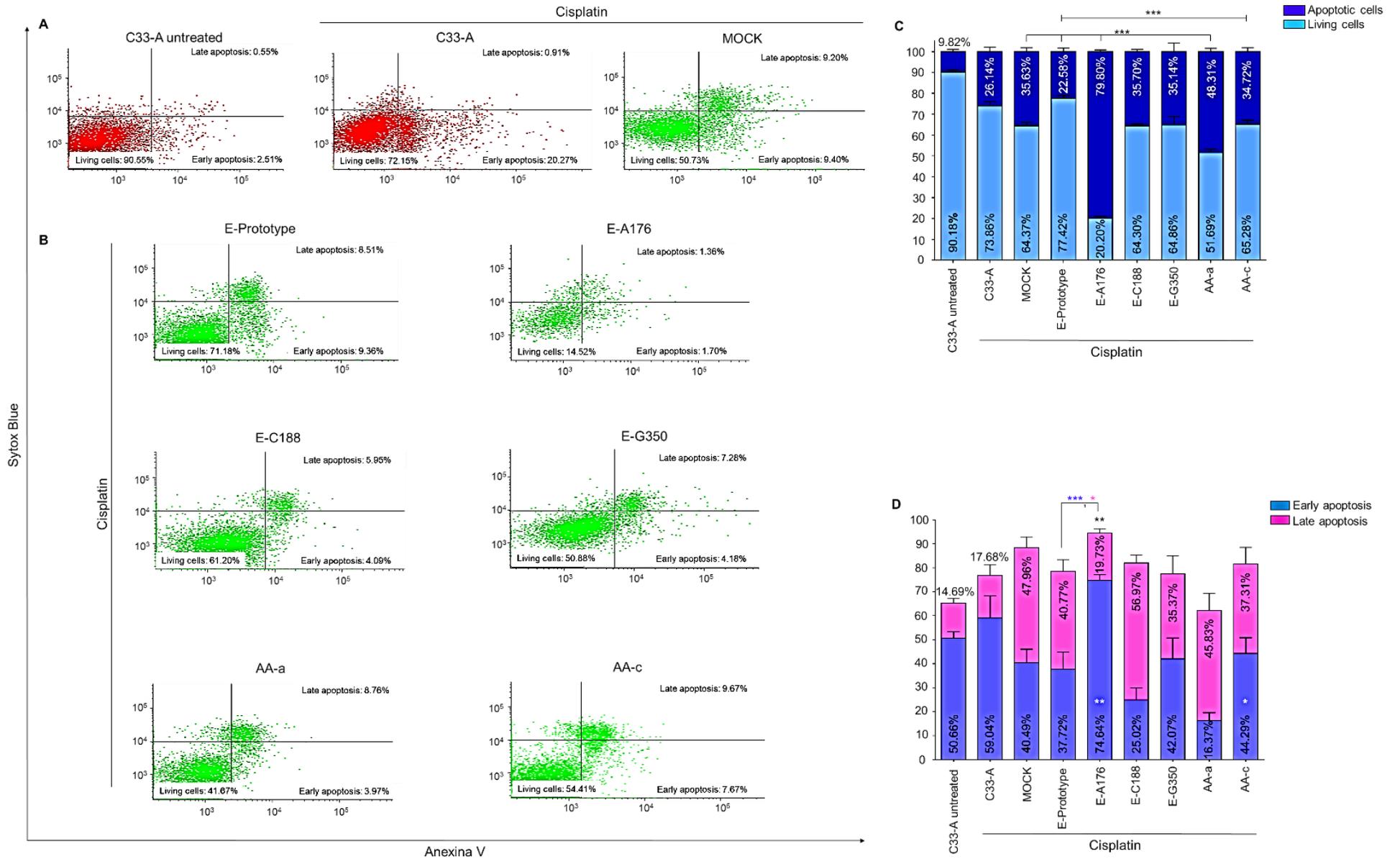


Figura 2. Efecto de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 sobre la apoptosis inducida por cisplatino. Se realizó tinción con Anexina V y Sytox Blue de las células C33-A sin transfectar y de las C33-A transfectadas establemente con la oncoproteína E6 del VPH16 para hacer la detección de las células apoptóticas mediante citometría de flujo, en condiciones basales y bajo tratamiento con cisplatino. En el panel A se muestra el grupo control: células C33-A sin transfectar y sin tratamiento, células C33-A y Mock con tratamiento de cisplatino (IC50). En el panel B se muestra el grupo experimental: células C33-A transfectadas con las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16. En el panel C se muestra el porcentaje de células muertas en los diferentes grupos analizados, las células C33-A (E-prototipo) fueron más resistentes a la apoptosis, mientras que las células C33-A (E-A176) fueron las más sensibles al tratamiento. En el panel D se muestra el porcentaje de células en apoptosis temprana y apoptosis tardía de los diferentes grupos analizados. Se graficaron las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Se analizaron 20,000 células por cada muestra. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes por duplicado.

Las variantes de la oncoproteína E6 modulan diferencialmente la expresión de genes pro y anti apoptóticos en respuesta al tratamiento con cisplatino

Anteriormente reportamos que las variantes E-A176, E-C188, E-G350, AA-a y AA-c de la oncoproteína E6 del VHP16 modulan más de 400 genes los cuales participan en diversos procesos celulares implicados en el desarrollo del cáncer cervical incluida la apoptosis (Zacapala-Gómez, *et al.*,2015). Por ello, validamos el nivel de expresión de los genes pro-apoptóticos Bax, SLC25A6, CD70 y HIPK2 y de los genes anti-apoptóticos clAP1, clAP2 e IGF1R en condiciones basales y encontramos que no existen diferencias significativas importantes (Dorantes-Palma, D y Solís-Aguirre, A, tesis de licenciatura, 2015). Debido a que observamos diferencias en la apoptosis inducida por cisplatino en presencia de las variantes, se analizó la expresión de genes pro y anti-apoptóticos bajo tratamiento con cisplatino (figura 3). Observamos que las células que expresan la variante E-A176 aumentan significativamente el nivel de expresión del gen anti-apoptótico clAP1 7.5 veces más con respecto a las células C33-A sin transfectar (control). Las células que expresan la variante E-G350 aumentan significativamente el nivel de expresión de todos los genes analizados hasta 300 veces más con respecto al control mientras las células que expresan la oncoproteína E-prototipo aumentan el nivel de expresión de los genes pro-apoptóticos Bax 6 veces más y HIPK2 3.5 veces más y de los genes anti-apoptóticos clAP1 y clAP2 hasta 8 veces más con respecto al control.

“Efecto de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 en la apoptosis inducida por cisplatino”

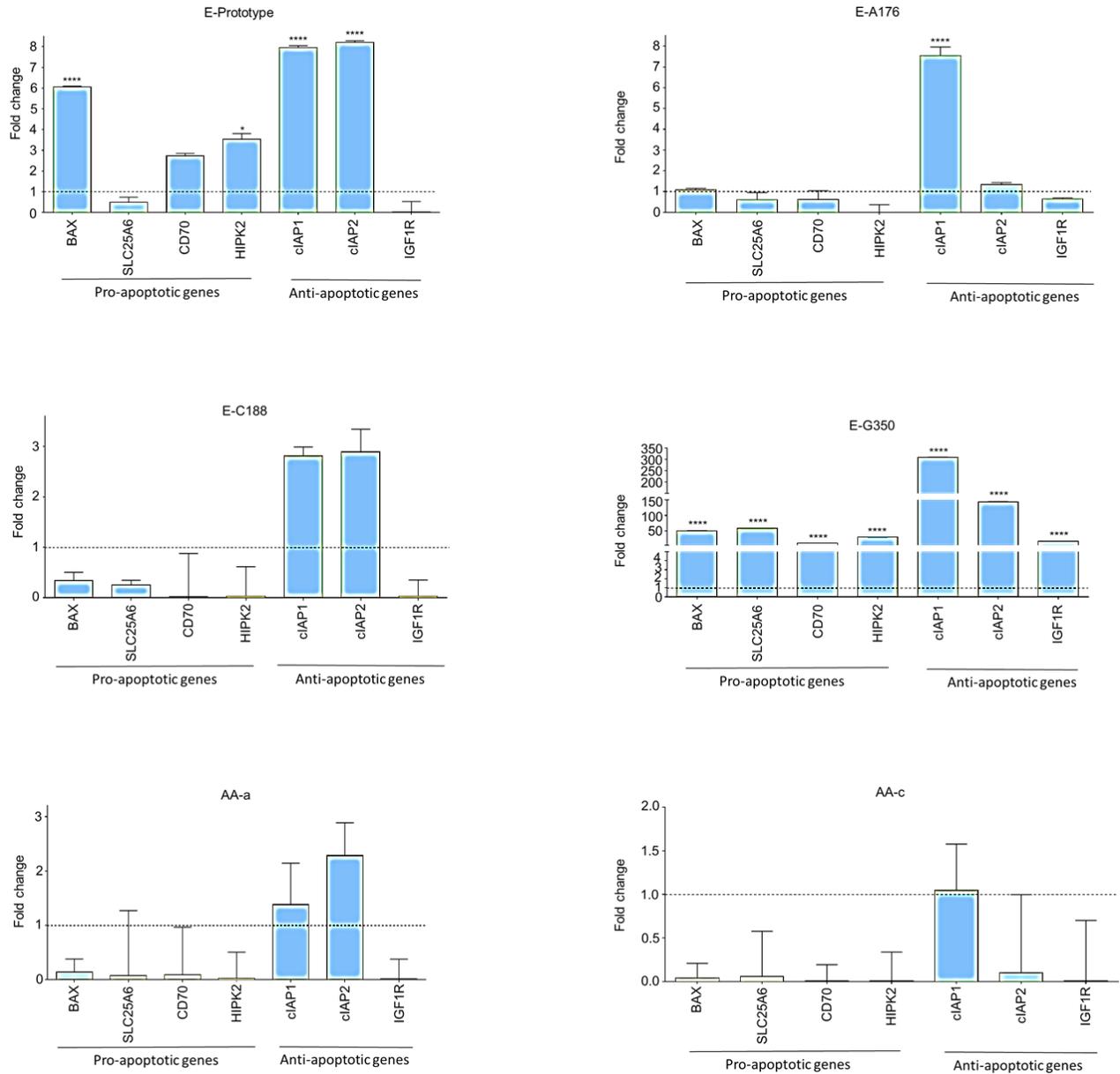


Figura 3. Las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 modulan diferencialmente la expresión de genes pro y anti-apoptóticos. Se realizaron ensayos de q-RTPCR para la detección de los genes pro-apoptóticos Bax, SLC25A6, CD70 y HIPK2 y de los genes anti-apoptóticos cIAP1, cIAP2 e IGF1R en las células C33-A que expresan las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 en condiciones bajo tratamiento con cisplatino. Se muestra el nivel de expresión de los genes analizados bajo tratamiento con cisplatino (IC50) y observamos que las células que expresan la variante E-A176 aumenta significativamente 7.5 veces más el nivel de expresión de cIAP1, la variante E-G350 aumenta significativamente hasta 300 veces más el nivel de expresión de los genes analizados y la oncoproteína E-prototipo aumentan significativamente el nivel de expresión de HIPK2 y Bax (genes pro-apoptóticos) 3.5 y 6 veces más respectivamente y de cIAP1 y cIAP2 (genes anti-apoptóticos) hasta 8 veces más con respecto al control. Como muestra control se utilizó C33-A sin transfectar y como normalizador se utilizó el gen GAPDH. Se graficaron las medias \pm desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía, prueba de comparación múltiple de Dunnett. Se tomaron como valores significativos * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

4 Discusión

Pocos estudios han analizado el efecto de las variantes naturales de la oncoproteína E6 del VPH16 en la apoptosis. Por ejemplo, se analizó la desregulación de la diferenciación y la apoptosis en un modelo de queratinocitos humanos primarios (NIKS) transfectados con las variantes de la oncoproteína E6 de VPH 16 (E-G350, E-G131/G350 y AA-a) y la E6 prototipo y se encontró que la variante AA-a de la oncoproteína E6 de VPH 16 sensibilizan a NIKS a la apoptosis inducida por anoikis (vía extrínseca) en comparación con el control y la E6 prototipo (Zehbe *et al.*, 2009). En otro trabajo se evaluó el papel de las variantes europeas E-A126, E-G131 y E-T245 en comparación con la variante E-G350. Se encontró que las variantes europeas E-A126, E-G131 y E-T245 de E6 tienen capacidades similares a la variante E-G350 para inhibir el arresto del ciclo celular y para reducir los niveles de p53 inducidos por actinomicina D (Zehbe *et al.*, 2011). Por otro lado, las células HaCAT que expresan la variante E-G350 son más sensibles a la apoptosis inducida por radiación en comparación con las células que expresan E6 prototipo (Rodríguez- Godínez, R, 2015, tesis de maestría). Nosotros encontramos que las células C33-A que expresan E6 prototipo son más resistentes a la apoptosis inducida por cisplatino (vía intrínseca), mientras que las células C33-A que expresan E6 de la variante E-A176 son más sensibles, además de que la mayor parte de la población de células apoptóticas se encuentran en apoptosis temprana, lo cual indica que tienen una respuesta más rápida al tratamiento con cisplatino en comparación con el control y con las células C33-A/E6 prototipo. Mientras que las células C33-A que expresan las variantes E-C188, E-G350 y AA-c no mostraron cambios significativos en el porcentaje de células apoptóticas con respecto al control, pero son más sensibles a la apoptosis que las células C33-A/E6 prototipo. Sorprendentemente las células que expresan la variante AA-a la cual ha mostrado mayor riesgo de conducir al desarrollo de CC (Ortiz-Ortiz *et al.*, 2015) son más sensibles a la apoptosis en comparación con el control y la E6 prototipo. Por otro lado, se ha reportado que en células de cáncer cervical existe reducción de la absorción del cisplatino, lo que se relaciona con la resistencia a la muerte celular (Haiyan *et al.*, 2016). Estos resultados concuerdan con el análisis de proliferación y supervivencia celular en respuesta al tratamiento con cisplatino realizado previamente

en nuestro laboratorio, en donde encontramos que la variante E-A176 prolifera menos, mientras que las células que expresan la variante E-G350 proliferan más con respecto al control bajo tratamiento con cisplatino (Luviano-Jaimes H.H y Lechuga-Mercado D.A, 2018, tesis de licenciatura). Todos estos datos sugieren fuertemente que las variantes del VPH16 están implicadas en la desregulación de la proliferación y apoptosis, lo cual les podría conferir diferente potencial oncogénico.

Recientemente en nuestro grupo de trabajo se encontró que las variantes de la oncoproteína E6 modulan diferencialmente la expresión de los genes pro apoptóticos (BAX, SLC25A6, CD70 y HIPK2) y anti apoptóticos (cIAP1, cIAP2 e IGF1R) en la línea celular C33-A. Encontramos que la oncoproteína E6 de las variantes AA-c y E-A176 alteran significativamente la mayor cantidad de genes en comparación con la E6 prototipo (Dorantes-Palma S y Solís-Aguirre J.A, 2015, tesis de licenciatura). Sin embargo, cuando determinamos la expresión de los genes en células C33-A tratadas con cisplatino el nivel de expresión de los genes pro y anti apoptóticos aumentan significativamente en las células que expresan la oncoproteína E6 prototipo y las variantes E-A176 y E-G350, siendo esta última la que aumenta todos los genes analizados. No conocemos el mecanismo mediante el cual, la oncoproteína E6 pudiera estar alterando la expresión de dichos genes, sin embargo, se sabe que la oncoproteína E6 interacciona directamente con factores de transcripción que modulan el nivel de expresión de los genes analizados. Por ejemplo, se ha reportado que E6 puede interactuar directamente con el factor de transcripción NF-kappaB (Vandermark, *et al.*, 2012) el cual regula la transcripción de los genes pro apoptóticos BAX y CD70 y de los genes anti apoptóticos IGF1R, cIAP1 y cIAP2. En el caso de las células que expresan E6 prototipo se encuentran aumentados significativamente los genes anti-apoptóticos cIAP1 y cIAP2 y los genes pro-apoptóticos BAX y HIPK2. cIAP2 y cIAP1, son inhibidores de las caspasas 3, 7 y 9, (Deepika V. y Hyung D. R, 2016). Se ha demostrado que, en muestras de cáncer cervical vs. muestras de tejido normal, hay una disminución de cIAP1 y niveles normales de cIAP2 (Espinosa, *et al.*, 2006). Sin embargo, en este estudio encontramos que E6 prototipo aumenta significativamente el nivel de expresión de dichos genes. También encontramos que el gen HIPK2 se

encuentra aumentado significativamente en estas células, lo cual concuerda con reportes previos donde se le ha asociado al cáncer cervical a través de su interacción directa con la oncoproteína E6 del VPH16, lo que previene la apoptosis y contribuye a la progresión del tumor (Kwon M.J. et al., 2017). Estos datos sugieren que la resistencia a la apoptosis podría estar, en parte mediada por estos genes. Por el contrario, las células C33-A/E-A176 solo aumenta significativamente el gen clAP1, sin embargo, son las más sensibles a la apoptosis inducida por cisplatino, sugiriendo que clAP1 por sí solo no es suficiente para inducir resistencia a la apoptosis.

En el caso de las células que expresan la variante E-G350, a pesar de que aumentan significativamente todos los genes apoptóticos analizados (pro y anti-apoptóticos) hasta 300 veces más que el control, son más sensibles a la apoptosis en comparación con las células C33-A/E6 prototipo. Estos resultados indican que la expresión a nivel de RNA mensajero de los genes analizados no es suficiente para explicar las diferencias observadas en la apoptosis. Una desventaja de este trabajo es que no se analizó en nivel de expresión de las proteínas correspondientes a los RNA's mensajeros.

Se sabe que la línea celular C33-A tiene una mutación puntual en el gen p53 en el codón 273 (CGT→TGT) que resulta en la sustitución de una arginina (Arg) por una cisteína (Cys) en el dominio de unión al DNA (DBD). Lo cual genera una proteína aberrante, incapaz de unirse a sus genes blanco, por ejemplo, a BAX para promover su transcripción he iniciar la apoptosis por la vía intrínseca (Crook *et al.*, 1991). Por otro lado, también se ha reportado que la caspasa 8 no se expresa en células C33-A (Aréchaga-Ocampo *et al.*, 2008). Estos datos sugieren que las diferencias en apoptosis y en la expresión de genes pro y anti apoptóticos encontradas en nuestro modelo de estudio son independientes de la actividad transcripcional de p53.

En nuestro modelo de estudio se expresan tres transcritos diferentes (E6, E6*I y E6*II) los cuales son generados por *splicing* alternativo del gen E6 (Urucha-Ortiz J.M y Álvarez-Hilario L.G, 2015, tesis de licenciatura). Estas isoformas de E6 pueden

producir diferentes efectos sobre la apoptosis inducida por cisplatino en células C33-A. Vaisman E. Carolina *et.al*, 2018, reportó que en las células C33-A ya que se sabe que cuando expresan la oncoproteína E6 completa disminuye un 50% la muerte celular en comparación con las células control, mientras que las células transfectadas con E6*I disminuyen solo un 25%. Interesantemente las células que expresan la isoforma E6*II incrementan la apoptosis, lo cual correlaciona con el aumento de la actividad de caspasas 3 y 9 comparadas con el control (Vaisman E. Carolina *et.al*, 2018). Previamente, nosotros analizamos la expresión de los transcritos E6*I, E6*II y el pre-RNAm E6 del intrón I del VPH16 en las células transfectadas con las variantes naturales de la oncoproteína E6 del VPH16 y encontramos que el patrón de *splicing* es heterogéneo; por ejemplo, el transcrito pre-RNAm E6 es más abundante en la variante AA-a, el transcrito E6*I es predominante en la variante E-C188/G350, mientras que la E-Prototipo y las variantes AA-c, E-A176/G350 y E-G350 expresan proporciones similares de pre-RNAm E6 y E6*I y solo las células que expresan la E6 prototipo y la variante AA-a expresan E6*II (Urucha-Ortiz J.M y Álvarez-Hilario L.G, 2015, tesis de licenciatura). Lo que sugiere que los cambios polimórficos de las variantes analizadas pueden estar implicados en la regulación del *splicing* alternativo y como consecuencia la diferencia en la cantidad de E6, E6*I y E6*II podría regular la apoptosis de manera diferente.

5 Conclusiones

Las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 modulan diferencialmente la apoptosis y la expresión de genes pro y antiapoptóticos, implicados en la vía intrínseca. Interesantemente, las células que expresan la oncoproteína E6 E-prototipo fueron las más resistente a la apoptosis inducida por cisplatino mientras que las C33-A/E-A176, E-C188, E-G350, AA-a y AA-c fueron las más sensibles.

6 Perspectivas

- ❖ Analizar los genes pro y anti-apoptóticos a nivel de proteína
- ❖ Medir la actividad de caspasas
- ❖ Analizar la apoptosis inducida por otras vías

7 Referencias

Aréchaga-Ocampo, E., Pereira-Suarez, A.L., Del Moral-Hernández, O., Cedillo-Barrón, L., Bruce, A., Johnson A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. 2010. Biología Molecular de la célula. Capítulo 18: Apoptosis. Ediciones Omega. Barcelona.

Chung-Hsiang, Y., Filippova, M. and Duerksen-Hughes, P. (2012). Modulation of apoptotic pathways by Human Papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. *Viruses*, 2012, 4, 3831-3850.

Cornet, I., Gheit, T., Franceschi, S., Vignat, J., Burk, R. D., Sylla, B. S., Tommasino, M., Clifford, G. M., and the IARC HPV Variant Study Group. (2012). Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *Journal of Virology* p. 6855-6861.

Crook, T., Wrede, D., Vousden, K. H. (1991). P 53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene*. 6(5):873-5.

De Scott W. Lowe and Athena W. Lin. (2000). Apoptosis in cáncer. *Carcinogenesis* (21) 3 pp. 485- 495

Deepika Vasudevan and Hyung Don Ryoo. (2016). Regulation of Cell Death by IAPs and their Antagonists. *Curr Top Dev Biol*. 2015; 114: 185–208. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.07.026

Dorantes- Palma, S. y Solís- Aguirre. J.A. Efecto de la oncoproteína E6 de variante del VPH16 en la expresión de genes pro y anti apoptóticos de células C33-A (tesis de licenciatura). Chilpancingo de los Bravo: Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero; 2015.

Erik R. Vandermark, Krysta A. Deluca, Courtney R. Gardner, Daniel F. Marker, Cynthia N. Schreiner, David A. Strickland, Katelynn M. Wilton, Sumona Mondal, and Craig D. Woodworth. (2012). Human Papillomavirus type 16 E6 and E 7 proteins alter NF-κB in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF-κB promotes cell growth and immortalization. *Virology*. 2012 March 30; 425(1): 53–60. doi: 10.1016/j.virol.2011.12.023.

Espinosa, M., Cantú, D., Herrera, N., López, C. M., De la Garza, J. G., Maldonado, V., et al. (2006). Inhibitors of apoptosis proteins in human cervical cancer. *BMC cancer*. 6(1), 45.

Fuchs, Y. and Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. Consultado en 22 de octubre de 2016 de [http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(11\)01283-9#](http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(11)01283-9#)

GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.

Haiyan, Z., Hui, L., Wenwen, Z., Zhaojun, S., Xiaoli, H., y Xueqiong, Z. (2016). Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des Devel Ther.* 10:1885-1895.

Huertas-Salgado, A., Martín-Gámez, D.C., Moreno, P., Murillo, R., Bravo, M.M., Villa, L., Molano, M. (2011). E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: An updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology* 410 201-215.

Kwon, Mi Jung So Young Kang, Eun Sook Nam, Seong Jin Cho, Young-Soo Rho. (2017). HIPK2 Overexpression and Its Prognostic Role in Human Papillomavirus-Positive Tonsillar Squamous Cell Carcinoma. *Hindawi BioMed Research International* Volume 2017, Article ID 1056427, 10 pages <https://doi.org/10.1155/2017/1056427>.

Luviano-Jaimes, H.H y Lechuga-Mercado, D.A. Modulación de la proliferación y supervivencia celular por variantes de la oncoproteína E6 del VPH-16 en células C33-A en respuesta a cisplatino (tesis de licenciatura). Chilpancingo de los Bravo: Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero; 2018.

Muñoz. N., Castellsagué, X., de Gonzalez, A. B., Gissmann, L. (2006). VPH in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24, S1-S10.

Narisawa-Saito, M. and Kiyono T. (2007). Basic mechanisms of high-risk human papillomaviruses- induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* vol 98 (10) 1505-1511.

Ortiz-Ortiz, J., Alarcón-Romero, L.C., Jiménez-López. M.A., Garzón-Barrientos. V.H., Calleja-Macías, I., Barrera-Saldaña. H.A., Leyva-Vaquez, M.A. and Illades-Aguir, B. (2015). Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virology Journal* (2015) 12:29

Rodríguez- Godínez, R. Modulación de la proliferación y supervivencia celular por la oncoproteína E6 de la variante E-G350 del VPH-16 en células HaCaT en respuesta a quimioterapia y radioterapia (tesis de maestría). Chilpancingo de los Bravo: Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero; 2015.

Rodríguez-Sastre, M.A., Castillo-Álvarez, A., López-Bayghen, E., Villegas-Sepúlveda, N., 2008. HPV+ cervical carcinoma and cells lines display altered expression of Caspases. *Gynecol. Oncol.* 108, 10-18.

Urucha-Ortiz, J.M y Álvarez-Hilario, L.G. Patrón de splicing alternativo del intrón I en las variantes del VPH16 en células C33-A (tesis de licenciatura). Chilpancingo de los Bravo: Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero; 2015.

Vaisman, Carolina E., Del Moral-Hernández, Oscar, Moreno Campuzano, Samadhi, Aréchaga-Ocampo, Elena, Bonilla-Moreno, Raúl, García Aguiar, Israel, Cedillo-Barrón, Leticia, Berumen,

Jaime, Nava, Porfirio, Villegas Sepúlveda, Nicolás, C33-A cells transfected with E6*I or E6*II the short forms of HPV-16 E6, displayed opposite effects on cisplatin-induced apoptosis. *Virus Research* <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.02.009>

Wong SY, R. (2011). Apoptosis in cáncer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cáncer research* 2011, 30:87.

Woodman, C.B., Collins, S.I., and Young, L.S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*, 7(1), 11-22.
www.impactjournals.com/oncotarget

Zacapala-Gómez, A., Del Moral-Hernández, O., Villegas-Sepúlveda, N., Hidalgo-Miranda, A., Romero-Córdoba, S., Beltrán-Anaya, F., Leyva-Vázquez, M., Alarcón-Romero, L., Illades-Aguiar, B. (2015). Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. *Virology* 488 (2016) 187–195.

Zehbe, I., Lichtig, H., Weterback, A., Lambert, P. F., Tommasino, M. and Sherman, L. (2011). Rare human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential. *Molecular Cancer*, 10:77.

Zehbe, I., Richard, C., De Carlo, C.A., Shai, A., Lambert, P.F., Lichtig, H., *et al.*, (2009). Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology*, 383, 69-77

Zur Hausen H. (1999). Papillomaviruses in Human Cancers. Consultado el 18 de octubre de 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1525-1381.1999.99723.x/abstract;jsessionid=CAFA3A597F0B7502976A9FD21FFB81B2.f02t03>

Zur Hausen H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews*, Vol 2, 342-343.