



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

**“Análisis del efecto de las variantes génicas E7 del VPH
16 en la proliferación celular”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

QBP. Leilany Giselle Zúñiga Alviar

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Berenice Illades Aguiar

CODIRECTOR DE TESIS: Dr. julio Ortiz Ortiz

Chilpancingo Gro., Enero del 2019



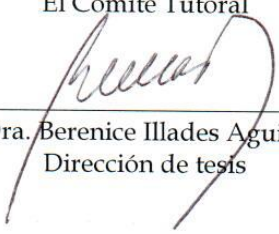


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 14 días del mes de enero de dos mil diecinueve se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Análisis del efecto de las variantes génicas E7 del VPH 16 en la proliferación celular", presentada por la alumna Leilany Giselle Zúñiga Alviar, 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 de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dra. Berenice Illades Aguiar
Dirección de tesis


Dr. Julio Ortiz Ortiz
Codirección de tesis


Dr. Oscar del Moral Hernández



Dra. Isela Parra Rojas


Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Vo. Bo

Vo. Bo


FCOB | Coordinación de la
Maestría Biomédica
Dr. Daniel Hernández Sotelo
Director de la Maestría en Ciencias
Biomédicas
DIRECCIÓN 2018 - 2021


Facultad de Ciencias
Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas
DIRECCIÓN 2018 - 2021

**“Análisis del efecto de las variantes génicas E7
del VPH 16 en la proliferación celular”**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro) en Chilpancingo Gro y en el laboratorio 2PB del CISEI en el Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca Morelos.

Bajo la dirección de:

Dra. Berenice Illades Aguiar

La Co-dirección de

Dr. Julio Ortiz Ortiz

La asesoría de

Dra. Isela Parra Rojas

Dr. Óscar del Moral Hernández

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

El financiamiento para esta tesis se obtuvo del proyecto "Análisis de las interacciones moleculares entre las oncoproteínas E6 y E7 del VPH 16 y sus variantes génicas con sus proteínas blanco", financiado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, Subprograma Ciencia Básica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, clave 288612.

Durante el periodo en que cursó la Maestría en ciencias Biomédicas la C. Leilany Giselle Zúñiga Alviar recibió la beca (No. 781382) del 01 de septiembre de 2016 al 31 de agosto de 2018 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 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 mamá: por tu apoyo siempre en mis decisiones, por la motivación a seguir con mis sueños, por el ejemplo que siempre me has dado de trabajo y esfuerzo para lograr lo que me proponga, por tolerar mi nivel de estrés con tu cariño paciencia y comprensión. A mi hermana Katia por tu amor compañía comprensión por prepararme la comida, el café y llevarlo hasta donde estaba sentada redactando este trabajo gracias hermanita, siempre fue un lindo gesto solo que no tenía tiempo de decírtelo, a mi hermana Arlette por tu amor y tu preocupación siempre por mí, por tu apoyo, y aunque a veces no comprendes que no tengo tanto tiempo libre para ti, siempre me apoyas y crees en mí. A mi único adorado y pequeño sobrino Mathias que sin saber, con tu existencia risas y juegos me obsequiaste la motivación para seguir intentando terminar con este proyecto. A Nelson: por tu comprensión, tu amor y paciencia, para apoyar siempre mis proyectos, por creer en mis sueños y volverlos tuyos también por la compañía y la motivación. Los amo.

Agradecimientos:

A la Dra. Brenice Illades Aguiar: por aceptarme en su grupo de trabajo, por la motivación que usted emite con su ejemplo de compromiso y disciplina para que una se esfuerce a dar lo mejor de sí, gracias por tomarse el tiempo de revisar este trabajo, por sus consejos para los experimentos en el laboratorio pero también por sus consejos para la vida le reitero mi admiración cariño y respeto.

Al Dr. Julio Ortiz Ortiz: por su valiosa codirección de esta tesis por guiarme en la elaboración del trabajo, por su dedicación disposición tiempo y esfuerzo, por confiar siempre en mi trabajo y en mi capacidad para terminar el proyecto.

Al Dr. Óscar Del Moral Hernández: gracias por sus aportaciones y sugerencias siempre acertadas para la mejora y el enfoque de este trabajo.

A la Dra. Isela Parra Rojas: Gracias por las observaciones y su disposición para la revisión de este trabajo.

A la Dra. Ana Elvira Zacapala Gómez: por su valiosa a portación para la elaboración de este proyecto, por guiarme en los experimentos, por su paciencia comprensión y compañía.

A todos los integrantes del laboratorio de biomedicina molecular por los momentos compartidos y por siempre preocuparse por mis avances y tratar de ayudar en lo posible a la química Natividad Sales Linares por aceptar solicitudes intermedias y por enseñar siempre con el ejemplo de trabajar de manera íntegra, al Dr. Israel y al M.C. Genaro por sus disposición para ayudarme a resolver dudas respecto a mi trabajo.

A Hugo y Lilian por recibirme en el equipo de las clonaciones, por compartir medios de cultivo antibiótico, cajas tubos, por compartir también sus protocolos para las técnicas de extracción, purificación digestión y por la complicidad en el laboratorio para pasar y hacer los días más amenos Hugo gracias por ayudarme siempre en todo y por hacerme creer que podía terminar con este proyecto cuando ya ni yo creía en mí eres un gruñón con un buen corazón.

Al Dr. Daniel Hernández Sotelo, al Dr. Carlos Ortuño, al Dr. Eduardo Castañeda Saucedo a la Dra. Mónica Espinoza Rojo, por su aportación para realizar las clonaciones, por tomarse el tiempo para explicarme las estrategias experimentales que han empleado y por compartirme sus experiencias en la clonación para que yo las aplicara en la realización de mis experimentos, muchas gracias.

Al Dr. Alfredo Lagunas Martínez, por recibirme en su laboratorio por su paciencia y colaboración para este proyecto.

A los integrantes del L2PB del CISEI (Edith, Luis, Oscar, Sheila Lupita Sayuri, Estrellita) por ser los mejores compañeros de laboratorio, por su paciencia amistad y por convertirse en una pequeña familia durante mi estancia en Cuernavaca.

A mis amigos: Dorian gracias por estar pendiente de mis avances, por las risas y momentos compartidos, ah y también por prestarme termómetros jaja Angy gracias por compartir tus conocimientos en bacteriología conmigo por las horas de compañía en el laboratorio, Tania gracias por ser una buena amiga y compañera por los conocimientos y momentos compartidos, Sandra gracias por eliminarme de Facebook jaja, por revisar mi trabajo, por estar siempre pendiente de mis avances y por todos los momentos y experiencias compartidas, Jess gracias por tu compañía, por tus palabras de motivación, por tu amistad única y sincera, a dosos gracias por su amistad por los cafés las risas anti estrés con tanta cosa que dice usted y la LDI, Laura gracias amiguita por la ardua y constante revisión a mi trabajo por tu disponibilidad siempre para ayudarme en lo que fuese, por tu compañía en el laboratorio los fines de semana(solo fueron dos jaja) por ayudarme con las extracciones de DNA, por las risas, llanto, alegrías momentos y experiencias que compartimos durante estos dos años sé que vas a estudiar el doctorado y serás una gran investigadora aunque te hagas la victima creo en ti, acuérdate siempre de lo que dice Carolina Aguilar si se te olvida puedes ver el video jaja, espero puedas compartir tus próximos éxitos conmigo, agradezco haberlos conocido en este camino de la maestría, gracias por formar parte de mi crecimiento personal y profesional, me los llevo en el corazón.

ÍNDICE

I.RESUMEN	9
II. ABSTRACT	10
III. INTRODUCCIÓN	11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	15
V. RESULTADOS	18
VI. DISCUSIÓN	27
VII. CONCLUSIÓN	31
VIII. REFERENCIAS	32

I. RESUMEN

Introducción: La oncoproteína E7 del VPH 16 es una proteína multifuncional que favorece el desarrollo de la carcinogénesis cervical, se ha reportado que las variantes en este gen pueden presentar una mayor capacidad transformante respecto al gen E7-prototipo, en un análisis reciente de nuestro grupo de trabajo se encontró a la variante C732/C789/G795 en un 34.34% de las muestras con cáncer, además, se demostró que las muestras con la variante C732/C789/G795 tienen 3.7 veces más riesgo de desarrollar cáncer en comparación con la E7 Prototipo. **Objetivo:** evaluar el efecto de la variante E7-C732/C789/G795, sobre la proliferación celular en comparación con el gen E7 -prototipo del VPH 16. **Metodología:** mediante PCR de muestras positivas a VPH 16 se aisló al gen E7 y mediante secuenciación/alineamiento bioinformático se identificó a E7-Prototipo y a la variante E7C732/C789/G795, se clonaron las secuencias en el vector de expresión *pEGFPN-1*, se transfectaron queratinocitos primarios y se evaluó la proliferación celular mediante ensayos de viabilidad celular con MTS. **Resultados:** los resultados muestran que a las 48 horas hay una disminución de la proliferación en comparación con E7-prototipo, sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas.

Palabras clave: variantes, E7, proliferación, VPPH 16

II. ABSTRACT

Introduction: the E7 oncoprotein of HPV 16 is a multifunctional protein that favors the development of cervical carcinogenesis, it has been reported that variants in this gene may present a greater transformative capacity with respect to the E7-prototype gene, in a recent analysis of our working group The C732/C789/G795 variant was found in 34.34% of the samples with cancer, in addition, it was demonstrated that the samples with the variant C732/C789/G795 have a 3.7 times higher risk of developing cancer compared to the E7 prototype. **Objective:** evaluate the effect of the E7-C732/C789/G795 variant on cell proliferation compared to the E7 gene - HPV 16 prototype. **Methodology:** by PCR of HPV-positive samples 16 the gene was isolated E7 and by bioinformatic sequencing / alignment was identified to E7-prototype and variant E7C732/ C789/G795, the sequences were cloned in the expression vector pEGFPN-1, primary keratinocytes were transfected and cell proliferation was evaluated by cell viability assays with MTS. **Results:** the results show that at 48 hours there is a decrease in proliferation compared to E7-prototype, however, no significant differences were obtained.

Key words: variants, E7, proliferation, HPV 16.

III. INTRODUCCIÓN

La proliferación celular es un proceso necesario para la embriogénesis y la homeostasis en algunos tejidos adultos; (Massagué 2004) es controlada por el estímulo externo con factores de crecimiento, sin embargo existe un punto de restricción durante la fase G1, en el que la célula se independiza y se compromete a continuar con la fase S del ciclo celular (Pardee 1974) esto debido a que un estímulo mitogénico constante activa las vías de señalización como Ras, Myc, PI3K/AKT que conducen a una acumulación de las ciclinas D (Aguilar y Fajas 2010). Las ciclinas D forman complejos con las CDKs (quinasas dependientes de ciclinas), específicamente con CDK4 y CDK6, para fosforilar a las proteínas de la familia pRB; esta fosforilación disocia a pRB del factor de transcripción E2F, permitiendo la transcripción de un conjunto de genes que permiten la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Malumbres and Barbacid., 2001) un desbalance entre la pérdida y ganancia de células puede llevar a enfermedades como el cáncer

El cáncer se caracteriza porque las vías que restringen la respuesta proliferativa están desreguladas, una clase de alteraciones comprende a las que afectan al punto de control de la fase G1 regulado por pRB, los defectos en esta vía, pueden ser ocasionados por delección del gen RB, desregulación de las CDKs, pérdida genética de sus inhibidores (Harbour and Dean 2000; Sherr 1996) o en particular, en los carcinomas cervicales, la función de pRB se elimina mediante su degradación vía proteosoma a consecuencia de su interacción con la oncoproteína E7 del VPH 16 (Evan and Vounden 2005; Huh *et al.*, 2007).

La oncoproteína E7 del VPH 16 está compuesta de 98 aminoácidos, y tiene un peso de 15 KDa, tiene tres regiones conservadas CR1, CR2 y CR3, en la región CR2 se encuentra el motivo de unión a pRB, p107 y p130 (LXCXE), la secuencia CR1 permite la cooperación de E7 con Ras para la transformación celular, en el extremo C-terminal tiene el dominio de unión a zinc, que se compone de dos motivos CXXC, separados por 29 residuos de aminoácidos, este dominio se dimeriza y es

importante para la estabilidad intracelular de E7.(McLaughlin-Drubin and Munger 2008)

La interacci3n de E7 con pRB permite el reclutamiento del complejo ubiquitina ligasa E3 Cullin 2 que promueve la degradaci3n de pRB vía proteosoma (Munger and Roman 2013). La degradaci3n de pRB interrumpe su asociaci3n con el factor de transcripci3n E2F, el cual activa la transcripci3n de genes que promueven la entrada y permanencia de las c3lulas diferenciadas en la fase S del ciclo celular. Además, E7 se une a E2F6, un miembro del complejo represor polycomb y de esta forma evita sus funciones represivas normales sobre los genes de la fase S activados por E2F (Klingelhutz y Roman 2012; Eh *et al* 2007).

E7 permite el crecimiento independiente del anclaje y la transformaci3n celular mediante la uni3n de p600, una proteína asociada al retinoblastoma (DeMasi *et al.* ,2005) interfiere con la senalizaci3n mediada por TGF, una citocina que inhibe el crecimiento celular en respuesta a la infecci3n viral; interactúa con proteínas reguladoras de la transcripci3n, por lo que puede reprimir la expresi3n de proteínas implicadas en este proceso y que controlan el ciclo celular como p21 y p27 confiriéndole a la c3lula resistencia a la inhibici3n del crecimiento mediada por TGF (Mittal and Banks 2016). E7 tambi3n regula el metabolismo celular, mediante la acumulaci3n de la forma dimerica de la piruvato cinasa tipo M2, que tiene una baja afinidad por su sustrato 3 fosfoglicerato, de esta manera aumenta la producci3n de fosfometabolitos glucolíticos, lo que conduce a un aumento en las vías biosint3ticas y por tanto a un aumento en la proliferaci3n celular (Mittal, y Banks 2017), asi mismo puede activar la expresi3n de proteínas como ciclina A y E (Moody, y Laimins 2010; McLaughlin-Drubin and Munger 2008; Klingelhutz y Roman 2012). E7 tiene una multifuncionalidad en la carcinog3nesis cervical debido a que interactúa con proteínas implicadas en diferentes procesos como: estabilidad gen3mica, respuesta inmune, anoikis, modulaci3n de la cromatina, ciclo y proliferaci3n celular, (Roman and Munger 2013, Klingelhutz and Roman 2012; McLaughlin and Munger 2008) además cada una las regiones es trascendental para las actividades oncog3nicas de la proteína E7 del VPH 16.

El VPH 16 es un virus de DNA de doble cadena circular que tiene un tamaño de 7906 pares de bases, pertenece al género alfa e infecta tejido mucoso (De Villiers *et al.*, 2004) por su riesgo oncogénico se clasifica como de alto riesgo (Muñoz *et al.*, 2006) y es el más frecuente en Cáncer Cervicouterino (CaCU) en todo el mundo (Guan *et al.*, 2012). La infección por el VPH-AR es necesario pero no suficiente para el desarrollo de CaCU ya que solo el 20 % de las LEIBG progresan a CaCU (Ostor *et al.*, 1999) esto debido a que se requiere la presencia de cofactores ambientales, del hospedero y virales, estudios recientes han mostrado que las variantes del VPH 16 presentan diferente potencial oncogénico (Ortiz Ortiz *et al.*, 2015; Cornet *et al.*, 2013; Bueno *et al.*, 2014).

Se reconoce una variante como el cambio en un nucleótido con respecto a la secuencia de referencia (De villiers *et al.*, 2004), una diferencia del 1 % del genoma completo se le denomina linaje, una diferencia del 0.5 a 0.9 % se le denomina sublinaje (Chen *et al.*, 2011) la clasificación de las variantes del VPH 16, se basa en la variabilidad genética de las secuencias del gen E6, L1 de la LCR o del genoma completo (Cornet *et al.*, 2012; Huertas-Salgado *et al.*, 2011; Bernard *et al* 2006) no obstante también se han identificado variantes génicas en el gen E7 del VPH-16. Las variantes en el gen E7 del VPH 16 son menos frecuentes que las variantes en el gen E6 (Nind *et al.*, 1999), y su frecuencia varía según la población estudiada; Pande *et al.*, 2008 reportó que solo un 13.3 % de la población estudiada presentó mutaciones en el gen E7, mientras que Shang *et al.*, 2011 encontraron que las mutaciones en dicho gen estaban presentes en un 84.62% de su población. La variante G647 se ha encontrado con mayor frecuencia en países asiáticos, 58% en Hon Kong, 73 % en Corea y 70.2 % en China (Ding *et al.*, 2010), mientras que Nind y colaboradores en 1999 la reportaron con una frecuencia de 0.99% en mujeres alemanas.

En México, no hay estudios que reporten las variantes génicas en el gen E7 del VPH 16; en un análisis reciente en nuestro grupo de trabajo se encontró que la variante E7-C732/C789/G795 es la segunda más frecuente con un 20.53% después de la E7 prototipo en mujeres guerrerenses, interesantemente el 34. 43% de las muestras

con cáncer presentan la variante E7- C732/C789/G795 además mediante un análisis de OR se encontró que las pacientes que tienen la variante E7- C732/C789/G795 tienen 3.7 veces más riesgo para el desarrollo de cáncer cervicouterino. Pocos estudios reportan el potencial oncogénico de las variantes génicas E7 del VPH 16, sin embargo, se ha asociado a la variante G647 con el desarrollo de neoplasia cervical (Lee *et al.*, 2011; Song *et al.*, 1997) Zine *et al.*, 2017 reportan que dicha variante tiene un mayor potencial oncogénico que E7-prototipo.

La variante E7-C732/C789/G795 más frecuente en nuestra población no genera cambio de aminoácido en la proteína, sin embargo el cambio en un nucleótido en la secuencia del RNAm puede afectar su estructura secundaria; y la estructura secundaria del RNAm puede influir en su transcripción, empalme y estabilidad, además es importante para la regulación mediante miRNAs (Chaney *et al.*, 2015; Bali *et al.*, 2015; O'Brien *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017). Interesantemente se ha observado que la interacción entre RNAs de virus y miRNAs es importante para la regulación de la estabilidad, expresión y traducción de RNAm virales, así como para la replicación, la infección persistente y patogénesis viral (Li *et al.*, 2014) específicamente se ha reportado que genes del VPH 16 tienen secuencias de unión a miRNAs; de manera indirecta el VPH 16 regula la expresión de genes celulares (Gunasekharan, and Laimins, 2013), por lo cual es importante evaluar si a través de cualquiera de los mecanismos mencionados anteriormente la variante E7- C732/C789/G795 del VPH 16 podría afectar su expresión y por tanto influir en procesos tales como la proliferación celular; ya que el aumento en la proliferación celular es una de las principales características del cáncer.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del gen de las variantes E7 del VPH16

Para aislar la secuencia de DNA del gen E7 del VPH 16 se realizó PCR a partir de DNA extraído de citologías cervicales positivas al VPH 16, la reacción contenía H₂O, buffer, dNTPs, Mgcl₂ y primers en un volumen final de 24 µl utilizando oligonucleótidos específicos que contienen sitios de corte para las enzimas HinDIII y BamHI (E7-F-HinDIII-aagcttCCACCATGCATGGAGATAC ACCTACAT y E7-R: BamHI 5-ggatccAATGGTTTCTGAGAACAGATGGG-3')

Clonación de las variante E7-C732/C789/G795 y E7-Prototipo del VPH 16 en el vector de clonación peJET1.2/blunt

Clonación en el vector peJET1.2/blunt. La ligación se realizó en un mezcla que contenía 1 µl de T4 DNA ligasa (invitrogen), 2 µl de 5X DNA buffer, 50 ng de pJET1.2blunt y 10 ng del producto de PCR en un volumen final de 20 µl, se incubó a 24° durante 5 minutos, se añadieron 2 µl de la ligación en 50 µl de bacterias competentes, se incubaron en hielo durante 5 minutos, se realizó la transformación usando el protocolo de choque térmico, se incubaron a 37 ° C a 160 rpm durante 1 hora en caldo Luria-Bertani (LB) libre de antibiótico, y se sembró en agar LB con 100 µg / ml de ampicilina a 37 ° C durante 16 horas, de las colonias que se obtuvieron se realizó extracción del DNA plasmídico.

Extracción del DNA plasmídico y restricción enzimática. Las colonias se cultivaron en 2 mL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina, el sedimento bacteriano se resuspendió en 100 µL de solución I (Tris 1M pH8- EDTA 5M pH8-H₂O), la lisis celular se realizó con 200 µL de solución II (NaOH 10 M, SDS al 10 %) el DNA genómico, los restos celulares y las proteínas se precipitaron mediante la adición de 150 µL de solución III (acetato de sodio) posteriormente el DNA se precipitó con isopropanol y se hicieron lavados con etanol al 70 %. Se digirieron 2 µg de DNA plasmídico con las enzimas BamHI y HinDIII a 37 ° durante 21 horas, los productos digeridos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Subclonación de las variante E7-C732/C789/G795 y E7-Prototipo del VPH 16 en el vector de expresión p-EGFPN-1

Después de realizar la construcción en el vector pJET1.2blunt se obtuvo el fragmento de E7 mediante digestión con las enzimas BamHI y HindIII se realizó una electroforesis de la digestión en un gel de agarosa al 2.5 % para posteriormente hacer la purificación del DNA con el kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit el cual permite extraer y purificar DNA a partir de un gel de agarosa.

Transformación de E.coli DH5α con los plásmidos pEGFP-N1-E7-prototipo y pEGFP-N1-E7-C732/C789/G795.

Se realizó la ligación con el vector p.EGFPN-1 y se realizó la transformación en la cepa DH5α. La ligación se realizó en un mezcla que contenía 1 µl de T4 DNA ligasa 2 µl de 5X DNA buffer, DNA del vector p-EGFP-N1-1 y DNA del inserto en un volumen final de 20 µl, se incubó a 16° durante 12 horas se añadieron 10 µl de la ligación en 50 µl de bacterias competentes y se realizó la transformación usando el protocolo de choque térmico. Se incubaron a 37°C a 160 rpm durante 1 hora en caldo Luria-Bertani (LB) libre de antibiótico, y se sembró en agar LB con 20 µg/ml de kanamicina a 37°C durante 16 horas, de las colonias que se obtuvieron se realizó extracción del DNA plasmídico. Se realizó PCR y digestión con las enzimas HindIII y BamHI; para confirmar la clonación del inserto de E7 en el vector p-EGFP-N1-1, de las colonias que resultaron positivas se realizó extracción de DNA plasmídico con el kit GenJet y se secuenció para su verificación.

Transfección de los plásmidos en queratinocitos primarios.

Los queratinocitos primarios se obtuvieron a partir de prepucios de niños donantes, se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO₂ en medio DMEM-F12 suplementado con 0.8 mM de adenina, 0.1 µg/mL de hidrocortisona, 4 µg/mL de insulina, 20 ng/mL de factor de crecimiento epidermal recombinante, 5% de suero fetal bovino y una mezcla de antibiótico y antimicótico.

Se realizó la transfección de los queratinocitos con las construcciones E7-prototipo E7-C732/C789/G795 usando lipofectamina 2000 de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante, se sembraron 7,000 células en placas de 96 pozos y se agregó una mezcla de 0.2 µg de DNA, lipofectamina, medio DMEM sin SFB y sin antibiótico en un volumen final de 50 µL.

Ensayos de proliferación

Para evaluar la proliferación se empleó el kit The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, se sembraron 7,000 células, se realizó la transfección y se dejaron las células por 24 y 48 horas para posteriormente agregar 20 µl de la solución de MTS se incubó dos horas y se midió la absorbancia a 492 nm.

Consideraciones éticas y de bioseguridad

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

Análisis de datos

Se realizó usando el programa GraphPad Prism 7, los datos se presentaron como medias \pm desviación estándar de tres experimentos independientes, para la comparación entre las diferencias entre los grupos se utilizará la prueba t de student, un valor de p menor de 0.05 es considerado como estadísticamente significativo.

V. RESULTADOS

En la figura 1 se presentan los amplicones de E7 prototipo y E7-C732/C789/G795 que se emplearon para clonarlas en el vector de clonación pJET1.2/blunt.

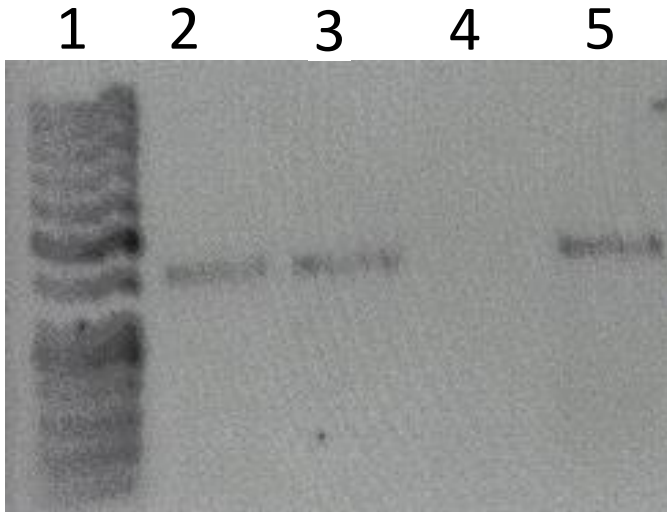


Figura 1. Amplicones del gen E7-prototipo y la variante E7-C732/C789/G795. En el carril 1 se muestra el marcador de 50 bp del carril 2-3 se muestran los amplicones de E7-prototipo y E7-C732/C789/G795, el carril 3 y 5 muestra los controles negativos y positivo respectivamente.

La clonación del inserto en el vector pJET1.2/blunt se logró realizando una reacción de blunting al producto de PCR (figura 2A). En la figura 2B se presenta la verificación de la clonación que se realizó con la digestión con las enzimas *HinDIII* y *BamHI*, se obtuvieron dos bandas, una banda superior de 2974 pares de bases que corresponde al peso del vector y una banda inferior de 306 pares de bases que corresponde al peso del producto de PCR de E7. En la figura 3 se observan los resultados de la secuenciación para confirmar que la secuencia de la variante E7-C732/C789/G795 tiene los cambios de nucleótido correctos respecto al gen E7-prototipo.

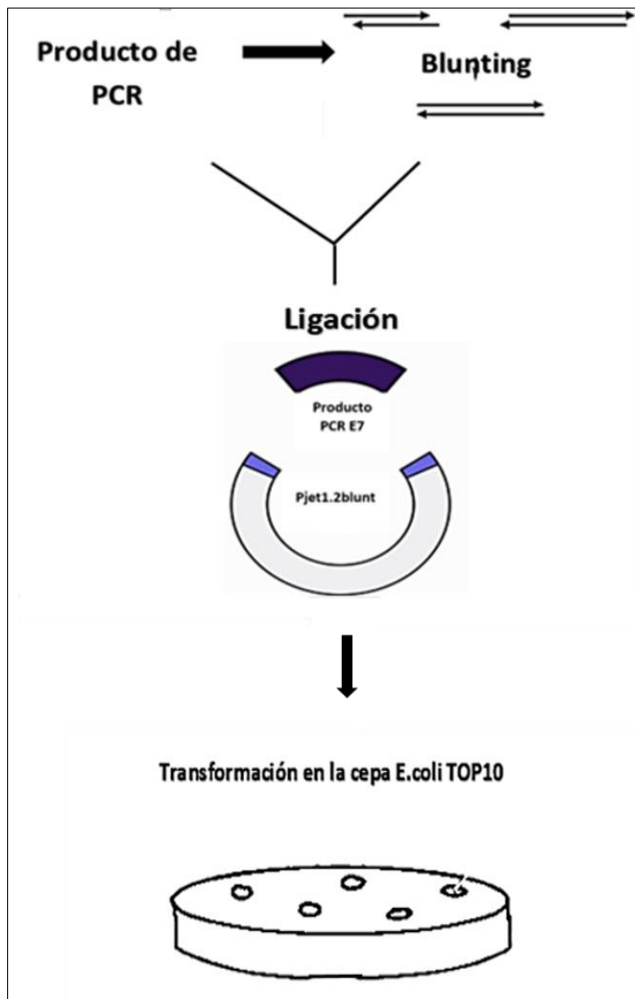
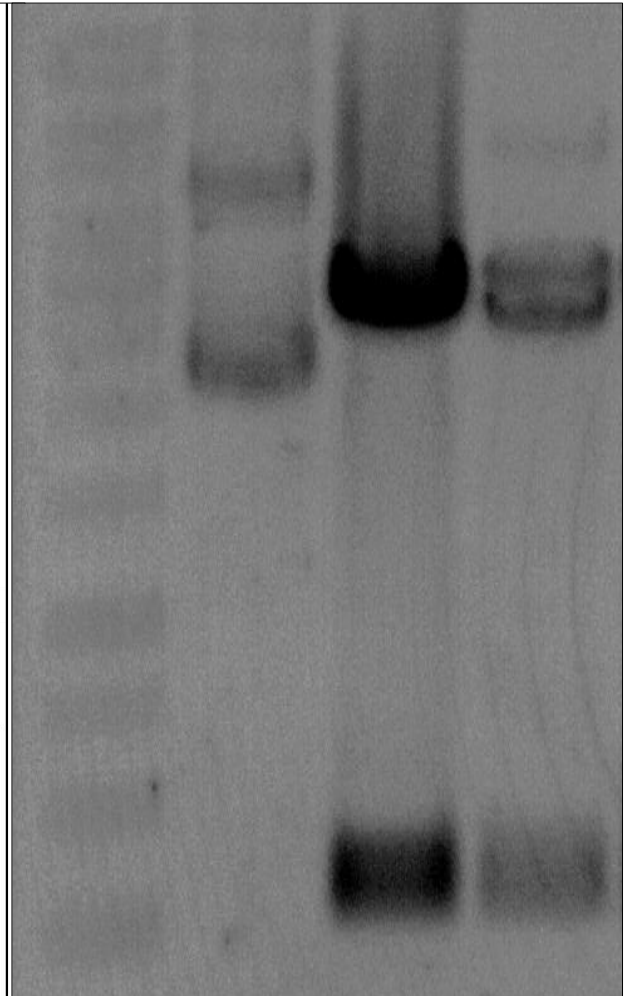
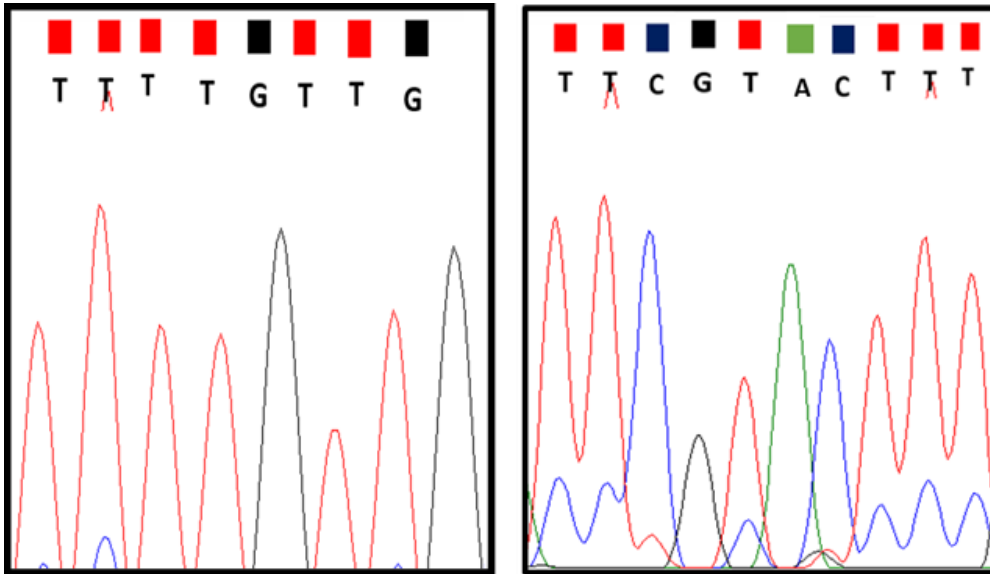
A**B**

Figura 2. Construcción E7VPH16-pJET1.2blunt. A) el gen E7-Prototipo y la variante E7-C7327C789/G795 se amplificaron por PCR se les realizó blunting y ligación con el vector pJET1.2blunt. B) Verificación de la clonación por digestión con *HinDIII* y *BamHI*, en el carril 1 se muestra DNA plasmídico del vector pJet1.2blunt sin digerir, en el carril 2 y 3 se muestran las digestiones de las construcciones de E7-prototipo y E7-C732/C789/G795.

A



B

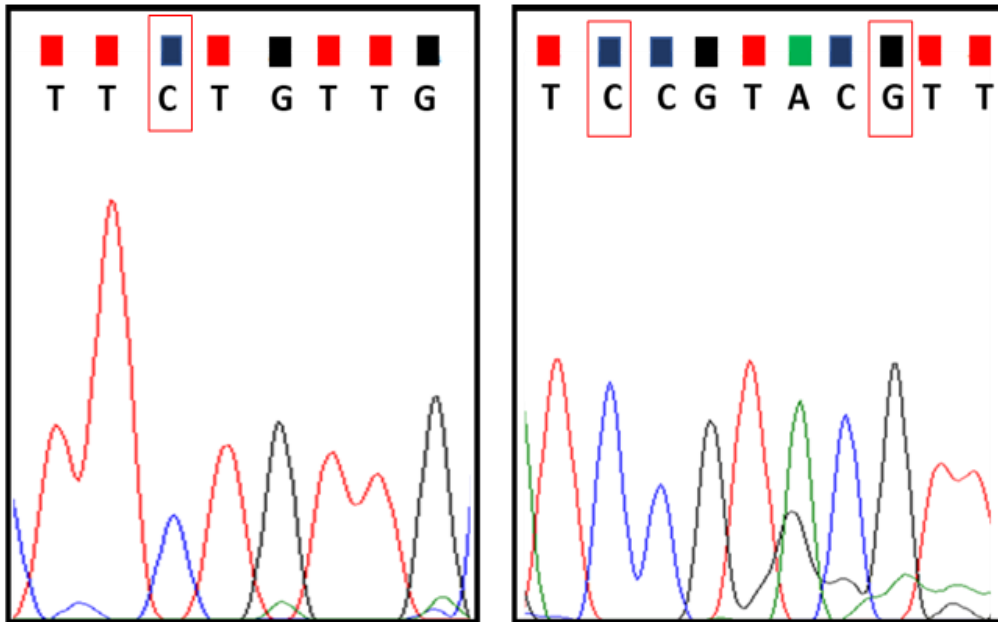


Figura 3. Construcción E7VPH16-pJET1.2blunt .A) el gen E7-Prototipo y la variante E7-C7327C789/G795 se amplificaron por PCR se les realizó blunting y se clonaron el vector pJET1.2blunt. **B)** Verificación de la clonación de E7 del VPH 16 por digestión con *HinDIII* y *BamHI*.

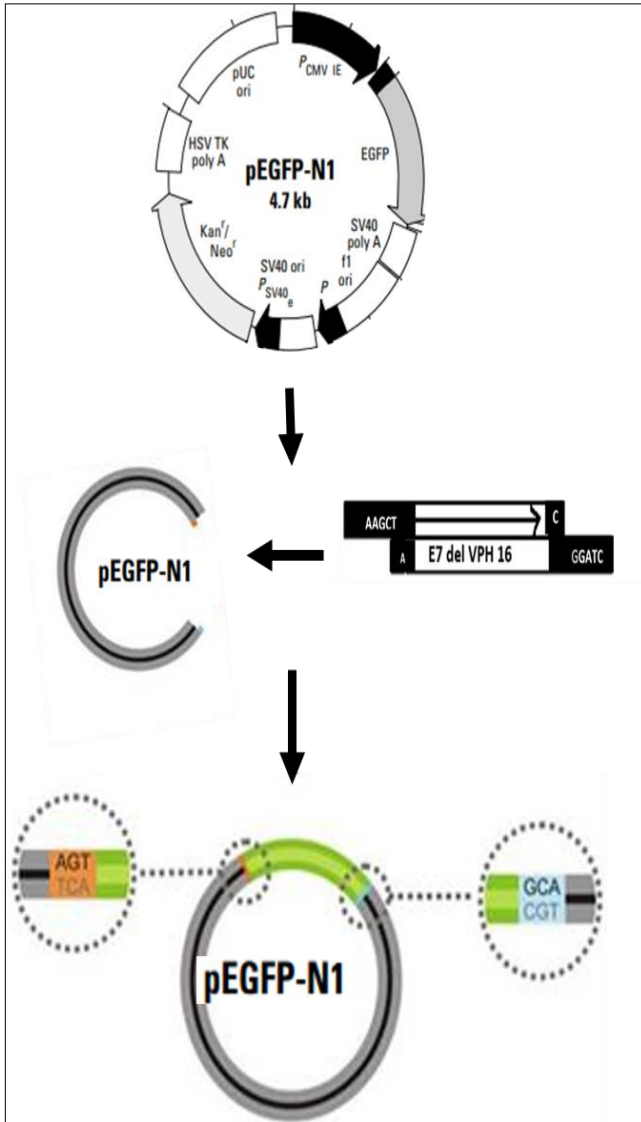
Subclonación del gen de la variante E7-C732/C789/G795 y E7-Prototipo del VPH 16

Se realizó la clonación del gen E7-prototipo y la variante E7-C732/C789/G795 en el vector de expresión pEGFP-N1 como se explica en la figura 4A. Se confirmó la inserción del gen en el vector pEGFP-N1 después de la digestión enzimática con las enzimas *HinDIII* y *BamHI*, obteniendo una banda superior de 4733 pares de bases que corresponde al peso del vector y una banda inferior de 306 pares de bases que corresponde al peso de E7 (figura 4B).

Se confirmó por secuenciación que el marco de lectura fue el correcto para E7-prototipo y para la variante E7-C732/C789/G795 en el vector de expresión (figura 5).

Se verificó que la secuencia de la variante E7-C732/C789/G795 presentara los cambios de nucleótido respecto a la E7-prototipo (figura 6).

A



B

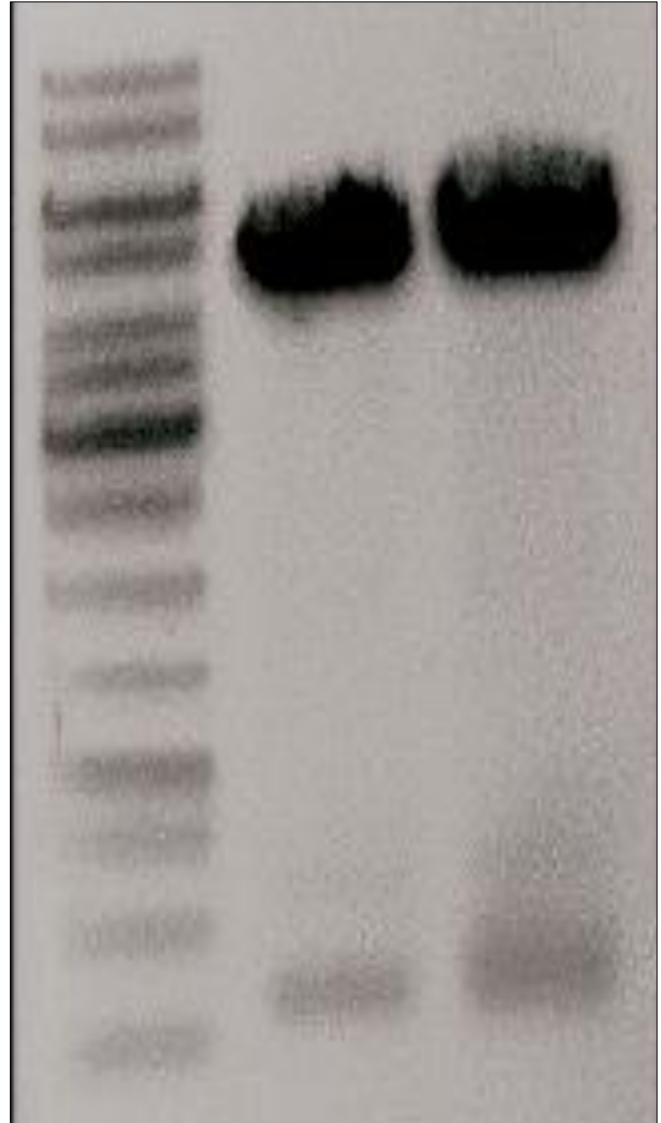


Figura 4. Construcción p-EGFPN-1-E7VPH16. El gen E7 del VPH 16 fué digerido del vector Pjet1.2/blunt y se clonó en el vector de expresión pEGFP-N1 A) Verificación de la clonación por digestión con HindIII y BamHI carril 1: marcador de 1Kb, carril 2-3 digestiones de dos colonias B).

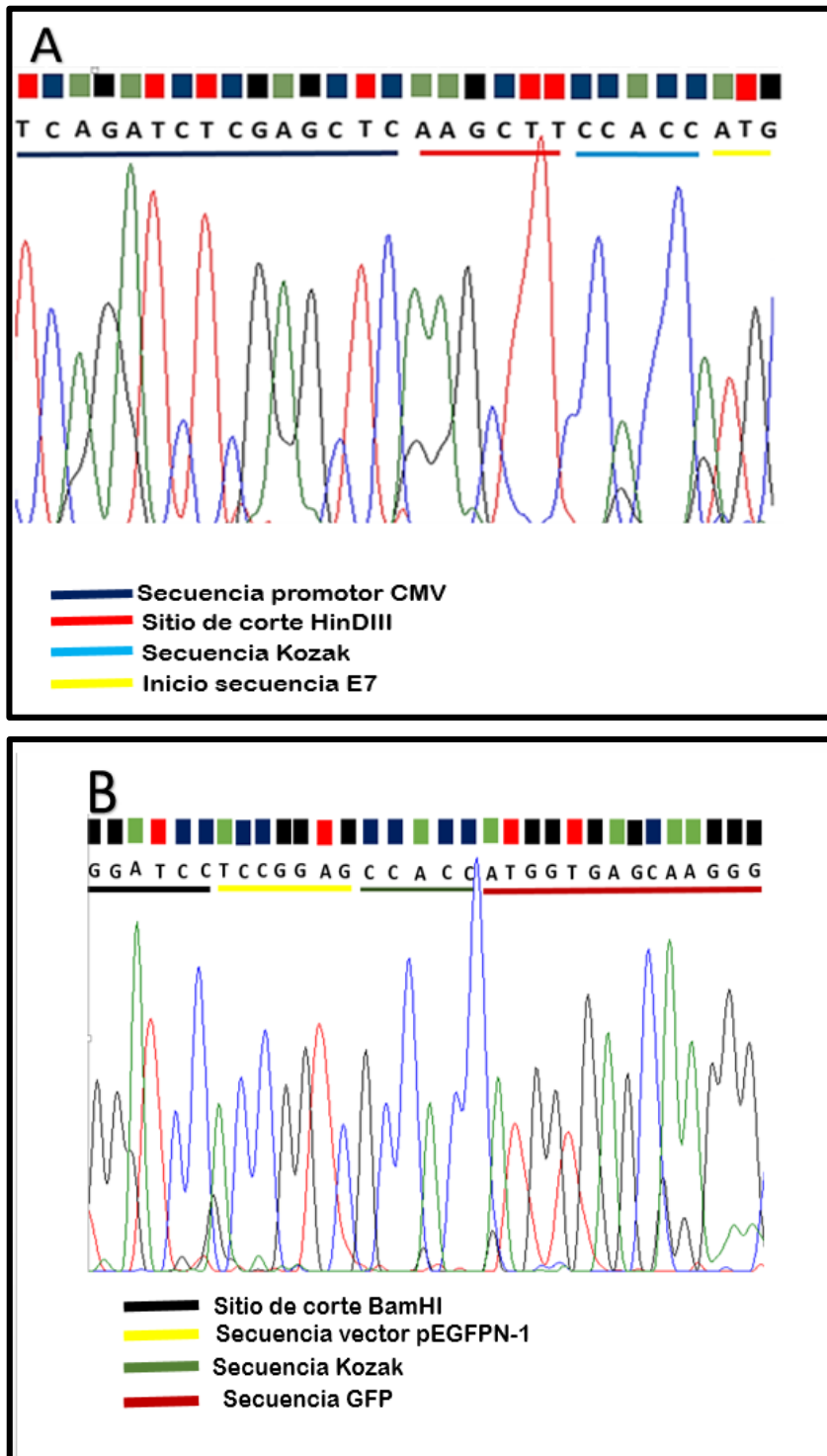


Figura 5. Secuencia de la construcción E7-pEGFPN-1. A) Se señala la secuencia del promotor de CMV, el sitio de corte para la enzima *Hin*DIII y la secuencia de inicio del gen E7 del VPH 16. B) se indica el sitio de corte para *Bam*HI, secuencia del plásmido pEGFPN-1, una secuencia kozak y el inicio de la secuencia que codifica para la GFP.

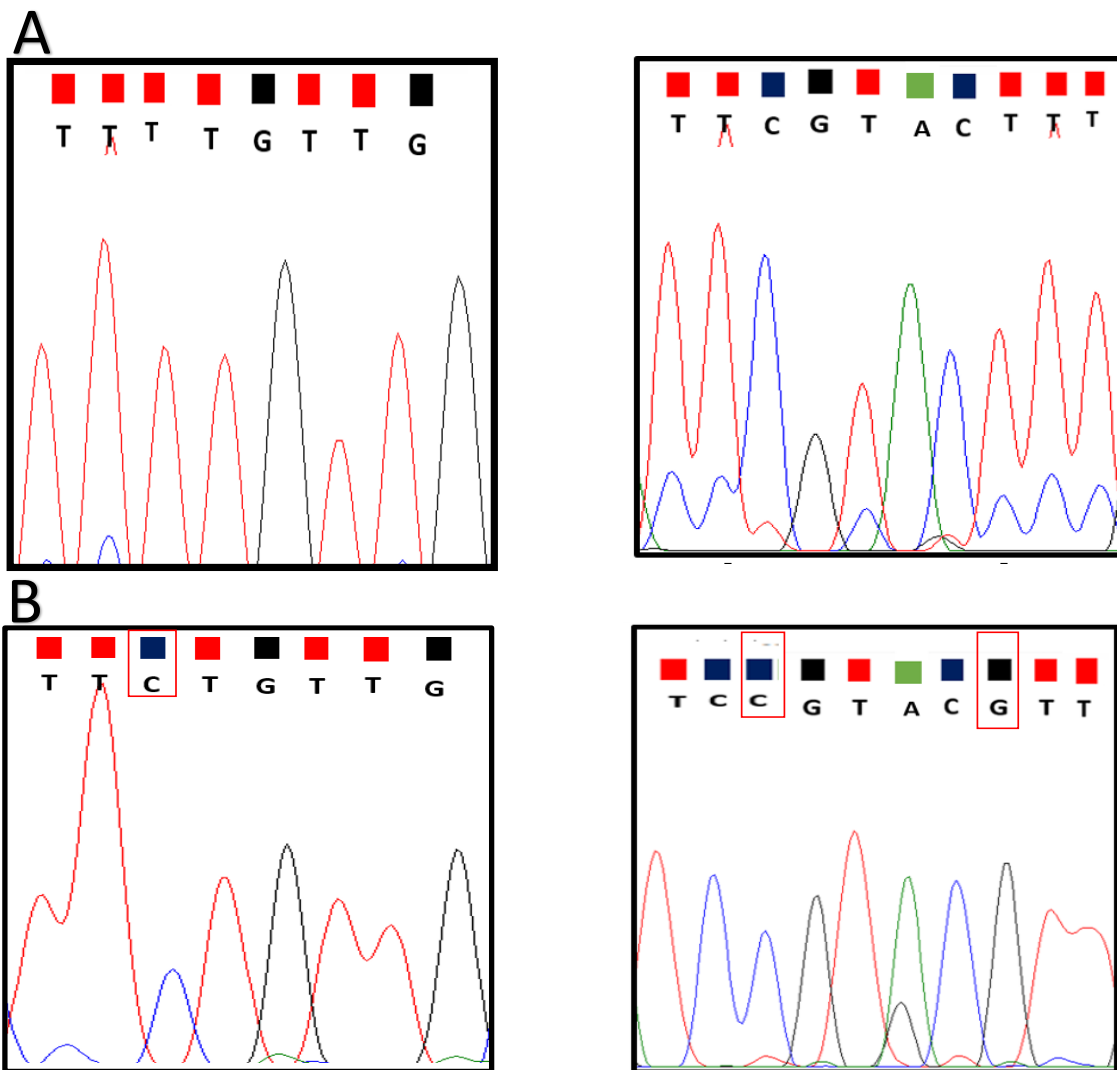


Figura 6. Secuencia de la variante E7-C7327C789/G795. Secuencia del gen E7-prototipo A) Secuencia de la variante E7-C7327C789/G795. B) Los cuadros rojos indican los cambios de nucleótido en la secuencia de la variante respecto al E7-prototipo. La secuencia se obtuvo a partir de una extracción de plásmido recombinante.

Transfección de los plásmidos en queratinocitos primarios.

Se analizó la eficiencia de transfección de queratinocitos primarios transfectados con el vector pEGFPN-1 con attractene y lipofectamina 2000. Se eligió utilizar lipofectamina 2000 ya que se obtuvo 43% de células GFP positivas mayor a lo obtenido con attractene.

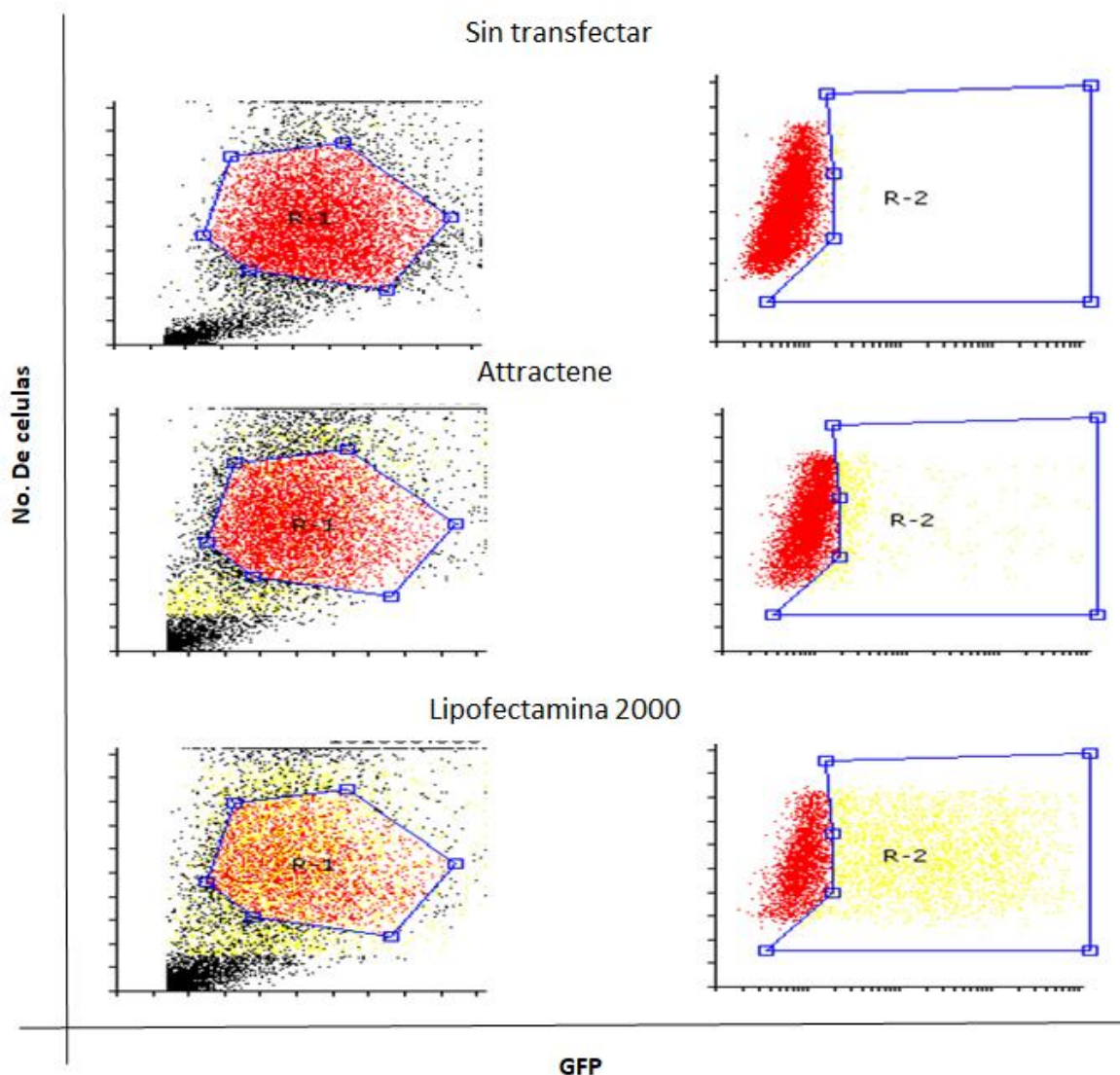


Figura 7. Análisis de la eficiencia de transfección. Se utilizaron queratinocitos sin transfectar. A) Queratinocitos transfectados con Attractene. B) Queratinocitos transfectados con lipofectamina 2000. La eficiencia de transfección fué determinada 24 horas después de la transfección, las células GFP positivas se muestran en color amarillo y las células GFP negativas se muestran en color rojo, la mayor eficiencia de transfección se obtuvo con el reactivo de lipofectamina 2000.

Proliferación de queratinocitos transfectados con E7-prototipo y con la variante E7-C732/C789/G795 de VPH 16.

El ensayo de viabilidad celular con MTS a las 24 y 48 horas después de la transfección del vector pEGFPN-1-E7-prototipo y pEGFPN-1-E7-C732/C789/G795 (figura 2) mostró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales. Se detectó un ligero incremento en la proliferación en queratinocitos transfectados con E7-C732/C789/G795 en relación a los transfectados con E7-prototipo a las 24 horas, sin embargo, a las 48 horas la proliferación causada por la variante disminuyó en comparación con E7-prototipo (figura 8).

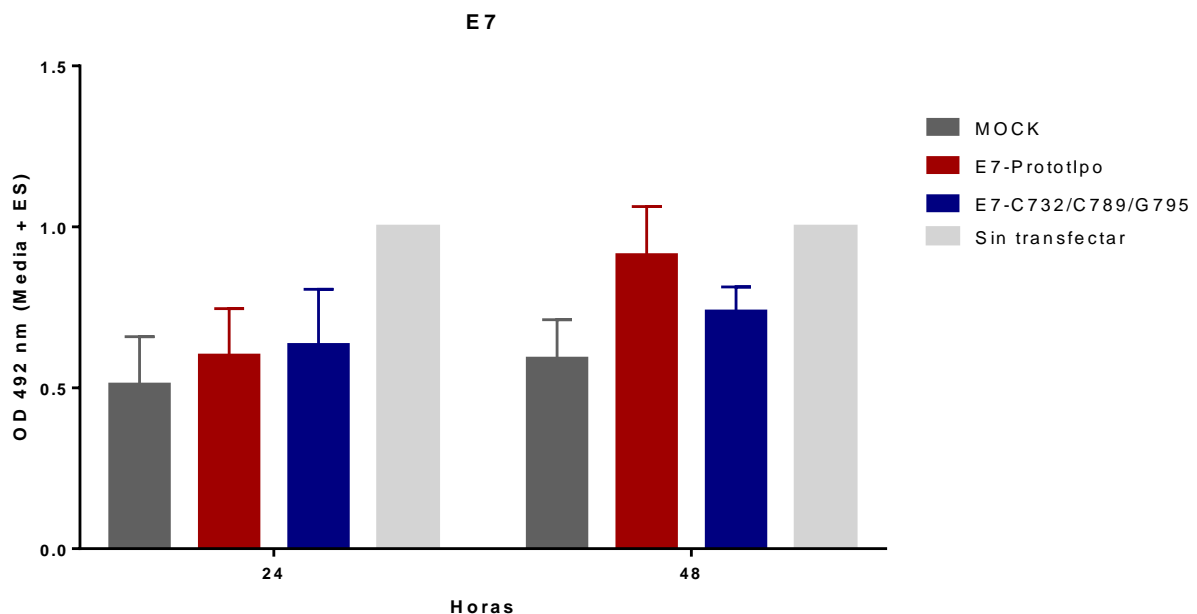


Figura 8. Análisis de la proliferación celular en los diferentes grupos experimentales. Los queratinocitos fueron transfectados con E7-prototipo, E7-C732/C789/G795 o el vector pEGFPN1 y la viabilidad celular fue medida a las 24 y 48 horas después de la transfección. Los datos se reportaron con media y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La prueba t-Student fue utilizada para comparación de medias.

VI. DISCUSIÓN

Se sabe que la oncoproteína E7 del VPH 16 tiene un papel importante en la regulación de la proliferación celular, E7 degrada a la proteína Rb mediante su interacción con el dominio LXXCE; la interacción con pRB permite un aumento en la proliferación celular (Huh *et al.*, 2007).

Se han reportado variantes del oncogén E7 del VPH 16, sin embargo existen pocos estudios donde se evalúe cómo las variantes pueden afectar la función de la proteína E7 (Zine *et al.*, 2017). Se ha sugerido que cambios en la expresión o estructura de E7 modificarían el proceso de la carcinogénesis cervical; en nuestro grupo de trabajo se encontró que la variante C732/C7897G795 del oncogén E7 del VPH 16 fue la segunda más frecuente en cáncer cervical después de la E7-prototipo en el estado de Guerrero. En este estudio se evaluó la capacidad de la variante C732/C7897G795 de modular la proliferación celular en comparación de la E7-prototipo, utilizando un modelo celular *in vitro* de queratinocitos primarios (PFK) transfectados transitoriamente con la variante y E7 prototipo del oncogén E7 del VPH16,

Los resultados muestran que a las 24 horas después de la transfección hay un incremento en la proliferación de queratinocitos transfectados con la variante E7-/C732/C789/G795, mientras que a las 48 horas hay una disminución de la proliferación en comparación con los queratinocitos transfectados con E7-prototipo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales.

Diversos estudios han evaluado la proliferación celular en células transfectadas establemente con E7 del VPH 16. Rabachini *et al.*, 2018 evaluaron la proliferación en células tratadas con rapamicina y transfectadas con E7 del VPH 16 durante un periodo de 8 días, sus resultados muestran que E7 confiere resistencia a rapamicina ya que a partir del cuarto día observan un aumento en la proliferación en comparación con las células transfectadas con el vector vacío. Además, en un estudio en el que transfectan células con siRNAs para el RNAm, de E7 del VPH 16 hubo una reducción significativa de la proliferación a las 72 horas de las células transfectadas en comparación con las células transfectadas con el inhibidor control (Zhou *et al.*, 2012.). Por otro lado, Puck *et al.*, 2014 determinaron la proliferación mediante duplicaciones de poblacionales acumuladas en células HeLa transfectadas establemente con un inhibidor de p16, observando una disminución de la proliferación a partir del tercer día hasta el día 12 del cultivo.

Con base a lo reportado en otros estudios, consideramos que una limitante de este estudio fue que realizamos transfecciones transitorias de E7-prototipo y de la variante E7-C732/C789/G795 por lo anterior, solo se evaluó la proliferación a las 24 y 48 horas, debido a que las transfecciones transitorias no permiten evaluar el efecto celular de la expresión de un gen a periodos prolongados además el gen no se integra al genoma de la célula, por lo tanto, se pierde su expresión durante la división celular (Kim *et al.*, 2010). Targa *et al.*, 2006 reportan un análisis de plásmidos mediante Southern blot a las 24 y 48 horas después de la transfección y demuestran que casi el 50 % de plásmidos son degradados.

Varios estudios reportan que la secuencia de E7 del VPH 16 tiene una menor variación en comparación con otros genes del VPH 16, y sugieren que la conservación de la secuencia de E7 del VPH 16 le confiere un mayor potencial oncogénico que cualquier otra variante (Safaeian *et al.*, 2010; Mirabello *et al.*, 2017). No obstante, es importante mencionar que el aumento o disminución del potencial oncogénico de una variante depende de la región de la proteína en la que se localice la mutación, Zine *et al.*, 2017 reportan evidencia bioquímica y biológica de que la variante G647 que genera un cambio de asparagina por serina en la posición 29 de la proteína tiene un mayor potencial oncogénico, debido a que se genera un nuevo sitio de fosforilación por CKII, mientras que la variante S31R disminuye su potencial oncogénico en comparación con E7-prototipo debido a que se pierde un sitio de fosforilación.

La variante E7-C732/C789/G795 presenta tres mutaciones sinónimas que no generan cambios de aminoácido en la secuencia de la proteína, sin embargo, las mutaciones sinónimas tienen un impacto en la expresión de genes, ya que un cambio en un solo nucleótido del RNAm puede afectar su estructura secundaria.

En un análisis *in silico* realizado por nuestro grupo de trabajo sobre la estructura secundaria del RNAm de E7 y sus variantes, se encontró que la variante E7-C732/C789/G795 mostró un mayor número de cambios y modificaciones en el multiloop principal en comparación con el RNAm de E7-prototipo, se observaron nuevos enlaces a lo largo de la estructura del mensajero y la pérdida de algunos enlaces en el extremo 5' de la variante. Cambios en la estructura secundaria del RNAm pueden modificar el splicing y su estabilidad, la velocidad de traducción, plegamiento y función de las proteínas, lo que tiene como consecuencia cambios en los diferentes procesos celulares en los que participa la oncoproteína E7 (Chaney *et al.*, 2015; Bali *et al.*, 2015; O'Brien *et al.* 2014). Por otro lado, se ha reportado que el uso de codones del VPH es diferente al uso de codones de la célula hospedera, y que esto se puede deber a una evolución del VPH para evadir la respuesta inmune (Sánchez *et al.*, 2015).

Liu *et al.*, 2010 realizaron una optimización *in vitro* de codones del ARNm de E7 del VPH 16 la optimización se realizó y reportan un incremento en los niveles de expresión de la proteína, por lo que a pesar de que la variante E7-C732/C789/G795 no genera cambio de aminoácido a nivel de proteína sería importante evaluar si por cualquiera de los mecanismos mencionados anteriormente esta variante podría generar cambios en el nivel de expresión de la proteína y por tanto alterar procesos celulares como la proliferación.

Los resultados de este estudio no son suficientes para determinar si la variante E7-C732/C789/G795 tiene un potencial oncogénico diferente a E7-prototipo, se requieren estudios donde se evalúen diferentes vías mediante las cuales se regule la proliferación, así como metodologías con mayor especificidad que evalúen cambios en la proliferación debido a que los ensayos de viabilidad usados para este estudio son una metodología indirecta para determinar proliferación celular ya que mide un aumento en la actividad enzimática en un grupo de células, lo que podría indicar un mayor número de células debido a la proliferación o podría reflejar un aumento en la actividad metabólica de las células no proliferativas (Romar *et al.*, 2016).

Se propone como perspectivas del trabajo realizar transfecciones estables que permitan evaluar la proliferación celular en tiempos prolongados, realizar la medición de proliferación por diferentes métodos y analizar las diferentes vías mediante las cuales se regula la proliferación. Y así sugerir si la variante E7C732/C789/G795 induce una mayor proliferación en comparación con la E7-prototipo.

VII. CONCLUSIÓN

Se observó una tendencia de disminuir la proliferación a las 48 horas en queratinocitos transfectados transitoriamente con la variante E7-C732/C789/G795.

VIII. REFERENCIAS

1. Aguilar, VC y Fajas L. (2010). cycling through metabolism. *EMBO Molecular Medicine*, 2:338-348.
2. Bali, V and Bebok Zsuzsanna. (2015). Decoding mechanisms by which silent codón changes influence protein biogénesis and function. *Journal of Biochemistry and cell biology*, 64:58-74.
3. Bernard, HU., Calleja, IE., and Dunn, ST. (2006).Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medial implications. *International Journal Of Cancer*, 118: 1071-1076.
4. Bueno L, Chen Z, Muqui EF, Tosato AN, Miranda AE, Spano LC y Burk R. (2014). Human Papillomavirus 16 Non-European Variants Are Preferentially Associated with High-Grade Cervical Lesions, *Journal Plos One* , 9: 7-9.
5. Chaney, JL and Clark, PL. (2015). Roles for synonymous codon usaje in biogénesis. *Annu Rev Biophys*, 44:146-166.
6. Chen, Z., Schiffman, M., Herrero, R., De Salle, R., Anastos, K., Segond, M., *et al.*(2011). Evolution and Taxonomic Classification of Human Papillomavirus 16 (HPV16)-Related Variant Genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *Journal Plos One*, 150: 2-6.
7. Cornet, I., Gheit, T., Franceschi, S., Vignat, J., Burk, RD., Sylla, BS., *et al.* (2012). IARC HPV Variant Study Group Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *Journal Virology* 134: 6855–6861.
8. De Villiers, EM., Fauquet, C., Broker, TR., Bernard, HU., Zur hausen, H. (2004). *Classification of papillomaviruses. Journal Virology* 324:17-27.
9. DeMasi J, Huh KW, Nakatani Y, Munger K, Howley PM. (2005).Bovine papillomavirus E7 transformation function correlates with cellular p600 protein binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(32):11486–91.
10. Eh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, JY., Libermann, TA., Jin, J., *et al.*(2007). Human papillomavirus type associated with oncoprotein cullin ubiquitin ligase complex 2 virus 16 E7, which contributes to degradation of retinoblastoma tumor suppressor.*Journal Virology*, 81: 9737 -9747.
11. Evan, G., Vousden KH. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411:342-348.
12. Guan, P., Howell-Jones, R., Li, N., Bruni, L., De Sanjose S., Franceschi, S., *et al.* (2012). Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *International Journal Of Cancer*, 131: 2349–2359.
13. Gunasekharan, V., Laimins, LA. (2013) Human papillomaviruses modulate microRNA 145 expression to directly control genome amplification. *J Virol* 87:6037–6043
14. Harbour, JW y Dean, DC. (2000).The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*, 14: 2393–2409.
15. Huertas-Salgado, A., Martín-Gámez, DC., Moreno, P., Murillo, R., Bravo, MM., Villa, L., *et al.* (2011). E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: An updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Journal Virology* 410: 201–215.
16. Huertas-Salgado, A., Martín-Gámez, DC., Moreno, P., Murillo, R., Bravo, MM., Villa, L., *et al.* (2011). E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: An

- updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Journal Virology* 410: 201–215.
17. Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, JY., Libermann, TA., Jin J., *et al.* (2007). Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Associates with the Cullin 2 Ubiquitin Ligase Complex, Which Contributes to Degradation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor. *Journal of Virology*, 81: 9737-9747.
 18. Kim TK and Eberwine JH. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 397:3173–3178
 19. Klingelutz, AJ., and Roman, A. (2012). Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Journal Virology* 424: 77–98.
 20. Lee, CW., Bae JH., Lee, SJ., Ho, EM., Lee, IH., Park, YG., *et al.* (2011)b. Distribution of human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variants in the progression of cervical dysplasia in Korean women . *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 37:1320-1326.
 21. Liu, WJ., Gao, F., Zhao, KN., Zhao, W., Fernando, GJG., Thoman, R., *et al.* (2002). Codon Modified Human Papillomavirus Type 16 E7 DNA Vaccine Enhances Cytotoxic T-Lymphocyte Induction and Anti-tumour Activity. *Virology* 301: 43–52.
 22. Malumbres M and Barbacid M. (2001). To cycle or not to cycle a critical decision in cancer. *Nature*, 1: 222-231.
 23. Massagué, J. (2004). G1 cell cycle control and cancer. *Nature*, 432: 298-306.
 24. McLaughlin-Drubin, ME., and Munger K. (2008). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Journal Virology*, 384: 335–344.
 25. Mirabello L., Yeager, M., Yu, K., Clifford GM., Xiao Y., Zhu, B., *et al.* (2017). HPV 16 E7 genetic conservation is critical to carcinogenesis. *Cell*, 170: 1164-1174.
 26. Mittal, S y Banks L.(2016). Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation, *Mutation Research*, 772: 23-35.
 27. Mittal, S y Banks, L. (2017). Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 772: 23-35
 28. Moody, CA y Laimins, LA. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation, *Nat Rev Cancer* 10: 550–560.
 29. Munger, K., and Roman A.(2013). The papillomavirus E7 proteins. *Journal virology*, 445: 138-168.
 30. Muñoz, N., Castellsague, X., Berrington de González, A., Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Journal Vaccine*, 24: 1-10.
 31. Nindl, I., Rinfleisch, K., Lotz, B., Schneider, A., and Durst M.(1999). Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 82: 203-207.
 32. O'Brien EP., Ciryam, P., Vendruscolo, M., Dobson, CM. (2014). Understanding the influence of codon translation rates on cotranslational protein folding. *Acc Chem Res*, 47: 1536-1544.
 33. Ortiz, J., Alarcón, LC., Jiménez, MA., Garzón, VH., Calleja, I., Barrera, HA., *et al.* (2015). Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Journal Virology* 12: 12- 29.
 34. Östör, AG. (1993). *Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review.* *Journal Gynecology Pathology* 12:186-192.
 35. Pande, S., Neeraj, J., Bhupesh, KP., Bhambhani, S., Sanjay G., Rajyashri, S., *et al.*(2008). Human Papillomavirus Type 16 Variant Analysis of E6, E7, and L1 Genes

- and Long Control Region in Biopsy Samples from Cervical Cancer Patients in North India. *Journal of clinical microbiology* 46: 1060-1066.
36. Pardee, AB. (1974). Restriction point control of normal animal cell proliferation. 1974 *Proc. Natl Acad. Sci*, **71**; 286–1290.
 37. Rabachini, T., Boccardo, E., Andrade, R., Pérez, KR., Nonogaki, S., Midea, L. (2018). HPV-16 E7 expression up-regulates phospholipase D activity and promotes rapamycin resistance in a pRB-dependent manner. *BMC cancer*, 18: 3-8.
 38. Romar, GA., Kupper, TS., Divito, SJ.(2016). Research Techniques Made Simple: Techniques to Assess Cell Proliferation. *Journal of investigative Dermatology*, 136: e1-e7.
 39. Safaeian, M., van Doorslaer, K., Schiffman, M., Chen, Z., Rodriguez, A.C., Herrero, R., et al. (2010). Lack of heterogeneity of HPV16 E7 sequence compared with HPV31 and HPV73 may be related to its unique carcinogenic properties. *Arch. Virol*, 155:367–370.
 40. Sánchez MF., Trosemeier, JH., Bedhomme, S., González MI., Kamp, C., Bravo, IG. (2015). Cancer, Warts, or Asymptomatic Infections: Clinical Presentation Matches Codon Usage Preferences in Human Papillomaviruses, *Genome Biol. Evol*, 7:2117-2135.
 41. Shang Q., Wang Y., Fang Y., Lanlan W., Chen S., Sun Y., et al. (2011). Human Papillomavirus Type 16 Variant Analysis of E6, E7, and L1 Genes and Long Control Region in Identification of Cervical Carcinomas in Patients in Northeast China. *Journal of clinical microbiology*, 49: 2656-2663.
 42. Sherr, CJ. (1996). Cancer cell cycles. *Science*, 274:1672–1677
 43. Song, YS., Kee, SH., Kim, JW., Park, NH., Kang, SB., Chang, WH., et al. (1997). Major Sequence Variants in E7 Gene of Human Papillomavirus Type 16 from Cervical Cancerous and Noncancerous Lesions of Korean Women. *Journal Gynecologic Oncology* 66: 275-281.
 44. Targa F. (2006). *Multiple Strategies for Gene Transfer, Expression, Knockdown, And Chromatin Influence in Mammalian Cell Lines and Transgenic Animals. Mol Biotechnol* 34: 337-354.
 45. Wang, YX., Zhang ZY., Wang, JQ., Qian XL., Cui J. (2018). HPV16 E7 increases COX-2 expression and promotes the proliferation of breast cancer, *Oncology Letters*, 16: 317-325.
 46. Yang, JR. (2017). Does mRNA structure contain genetic information for regulating co-translational protein folding?. *Zoological Research*, 38: 36-43.
 47. Zehbe, I., Tachezy, R., Mytilineos, J., et al. (2001). Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *International Journal of Cancer* 94:711-716.
 48. Zhou, J., Li, B., Peng, C., Wang, F., FU, z., Zhou, C., et al. (2013). Inhibition of cervical cancer cell growth in vitro and in vivo by lentiviral vector mediated ShRNA targeting the common promoter of HPV 16 E6 and E7 oncogenes. *Antiviral Research*, 98:305-313.
 49. Zine, A., Vjekoslav, T., Bel Haj, R., Massimi, p., Guizani, I., Boubaker S., Ennaifer, E., Banks L. (2016). A naturally occurring variant of HPV-16 E7 exerts increased transforming activity through acquisition of an additional phospho-acceptor site. *Journal virology*, 500: 218-225.