



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE VIROLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Análisis de la expresión de genes de adhesión en biopsias
cervicales por efecto de las variantes de la oncoproteína E6
del VPH16”**

T E S I S

Que para obtener el grado de:
Maestría en Ciencias Biomédicas

P r e s e n t a

Norma Mercenario Velázquez

Director de tesis: Dr. Oscar del Moral Hernández

Codirector: M. en C. Fredy Omar Beltrán Anaya



Chilpancingo de los Bravo, Guerrero. Enero de 2018

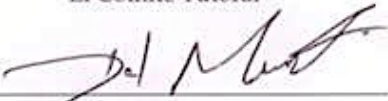


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS


En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 28 días del mes de junio de dos mil diecisiete 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 de la expresión de genes de adhesión en biopsias cervicales por efecto de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16", presentada por la alumna Norma Mercenario Velázquez, 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

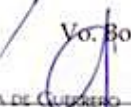


Dr. Oscar del Moral Hernández
Dirección de tesis


M en C. Fredy Omar Beltrán Anaya
Codirección de tesis


Dra. Eugenia Flores Alfaro


Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez


Dr. Daniel Hernández Sotelo

Vo. Bo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
 UAGRO
Coordinadora del Posgrado de la Facultad de
Ciencias Químico Biológicas
Coordinación 2014-2018

Vo. Bo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
 UAGRO
Unidad Académica de Biológicas
DIRECCIÓN 2014 - 2018

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB) de la universidad Autónoma de Guerrero (UAGro) en Chilpancingo, Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dr. Oscar del Moral Hernández

La Co-dirección:

M. en C Fredy Omar Beltrán Anaya

La asesoría de:

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Esta investigación se desarrolló bajo un convenio General entre el Instituto Estatal de Cancerología (IECan) “Dr. Arturo Beltrán Ortega” y la Universidad Autónoma de Guerrero. Parte de las muestras incluidas en esta investigación fueron obtenidas de dicha institución.

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

Durante el periodo en que se cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Norma Mercenario Velázquez recibió beca del CONACyT (De 01 de septiembre de 2015 al 31 de agosto de 2017).

Agradecimientos

Al Dr. Oscar de Moral, primero por aceptarme en su grupo de trabajo y darme la confianza para de llevar a cabo este proyecto. Por sus consejos y paciencia. Ha sido un verdadero privilegio haber trabajado con usted.

Al maestro Fredy, por el tiempo dedicado a las correcciones para la mejora de la tesis. Además, el interés que mostró al realizar la búsqueda de información para enriquecer el proyecto.

A mis sinodales la Dra. Eugenia, Dr. Daniel y al Dr. Marco por las aportaciones y sugerencias para la mejora de la tesis.

A mis hermanitos del LV: Ame, Hurí, Lechuga, Dorian, Laura y Monge gracias por todas las experiencias vividas y por la confianza brindada en mí. Lo quiero y los voy a extrañar. A Valeria y Mauricio, por el tiempo que compartieron conmigo en el laboratorio.

A mis compañeros de la generación 2015-2017, por todo lo que aprendí de ustedes y por brindarme su amistad. Les deseo mucho éxito en su vida profesional.

A mis amigos Beli, Fer, Viky y Angy por todos los años de amistad y por estar cuando los necesito. Los quiero mucho

Un agradecimiento muy especial para a mis padres y hermanos, los seres que tanto amo les agradezco infinitamente, el cariño, su comprensión, paciencia y el ánimo que me dieron para concluir esto. Gracias infinitas

A ti que has sido una de las personas más importantes en mi vida, por tu cariño y por impulsarme a continuar, te quiero.

Índice

Pág.

I.	Resumen	1
II.	Abstract	2
III.	Introducción	3
IV.	Materiales y Métodos	9
V.	Resultados	12
VI.	Discusión	20
VII.	Conclusiones	24
VIII.	Perspectivas	25
IX.	Referencias	26
X.	Anexos	30

I. Resumen

Introducción: EL Cáncer Cervicouterino (CaCU) es la neoplasia más común en mujeres en todo el mundo. El principal factor etiológico para su desarrollo es la infección persistente con VPH-AR. El VPH16 es el genotipo más estudiado, debido a su asociación con más del 90% de los casos de CaCU. Existen variantes naturales de VPH16 que le confieren diferente capacidad para modificar procesos celulares como la apoptosis, diferenciación, inmortalización, migración y adhesión.

Materiales y métodos: se analizó por RT-qPCR la expresión de los genes de adhesión *CALCR*, *CDH2*, *COL11A1*, *SRPX*, *CDH9*, *CDH18*, *CDH6*, *NID1*, *PCDH9*, *AMOTL1*, *E6* y *E7* por efecto de las variantes E-G350, AA-a y AA-c vs. E-Prototipo (E-P), en biopsias cervicales de tejido normal, lesiones precursoras y CaCU.

Resultados: Los genes más sobre-expresados fueron *NID1* y *AMOTL* en las muestras positivas a las variantes AA-a, AA-c y E-G350 en comparación con la E-P; mientras que *SRPX* se sobre-expresó en las muestras positivas a la variante AA-c. Por otra parte, se determinaron los niveles del RNAm de *E6* y *E7* y se encontró que las variantes AA expresan mayores niveles de los dos oncogenes en comparación con las variantes europeas.

Conclusión: Nuestros resultados sugieren que las variantes de VPH16 modulan la expresión de los genes de adhesión. Por otro lado, los altos niveles de los oncogenes *E6* y *E7* expresados por las variantes AA podrían conferirles mayor potencial oncogénico.

Palabras clave: variantes VPH16, genes de adhesión, biopsias, oncogenes *E6* y *E7*.

II. Abstract

Introduction: Cervical cancer (CaCU) is the most common neoplasm in women worldwide and the main etiologic factor is the persistent infection with AR-HPV. HPV16 genotype is associated with more than 50% of cases of CaCU. There are natural variants of HPV16 with different oncogenic potential. **Materials and Methods:** adhesion genes expression *CALCR*, *CDH2*, *COL11A1*, *SRPX*, *CDH9*, *CDH18*, *CDH6*, *NID1*, *PCDH9* and *AMOTL1* was analyzed by RT-qPCR in cervical biopsies of precursor lesions and CaCU positive to HPV16 E-G350, AA-a and AA-c variants. **Results:** The most overexpressed genes were *NID1* and *AMOTL* in the samples positive for the AA-a, AA-c and E-G350 variants in comparison with the E-Prototype; whereas *SRPX* was overexpressed in the samples positive to the AA-c variant. On the other hand, we determinate the mRNA levels of *E6* and *E7* oncogenes and we found that the AA variants express higher levels of both oncogenes compared with the european variants. **Conclusion:** Our results suggest that HPV16 variants modulate the expression of adhesion genes, and the highest expression levels of the *E6* and *E7* oncogenes by AA could indicate greater oncogenic potential.

Keywords: HPV16 variants, adhesion genes, biopsies, oncogenes *E6* and *E7*

III. Introducción

El cáncer cervicouterino (CaCU) es la cuarta neoplasia más común y la tercera causa de muerte en mujeres en todo el mundo. En el 2012 se estimaron 528,000 nuevos casos y 266,000 muertes, lo cual indica que esta patología continua siendo un grave problema de salud pública (Ferlay et al. 2015).

En México el CaCU es la segunda causa de muerte, en el 2013 se registraron 3,771 defunciones con una tasa de 11.3 muertes por 100, 000 mujeres (SSA, 2015). El estado de Guerrero ocupa el sexto lugar y la tasa de mortalidad es de 14.2 decesos por cada 100 mil mujeres (SSA, 2015). El CaCU es causado principalmente por la infección persistente por el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) (Muñoz et al. 2006). En mujeres guerrerenses el VPH16 se encuentra en el 68.1% de los casos carcinoma de células escamosas (Illades-Aguar et al. 2010) asociándose de manera significativa al desarrollo de cáncer en el cérvix uterino.

La infección por VPH-AR inicia a través de microlesiones que permite que las partículas virales tengan contacto con las células basales del epitelio estratificado, que se encuentran en lo más profundo del epitelio cervical y que están en constante proliferación (Doorbar 2006); estas células contienen receptores como la integrina $\alpha 6$ (Evander et al. 1997) y heparán sulfato que favorecen la entrada del virus a la célula (Shieh et al. 1992). Estudios recientes sugieren que moléculas como anexina II y CD49f expresadas en células madre de la lámina basal pudieran ser un blanco inicial para la infección por el VPH-AR (Ortiz-Sánchez et al. 2016). Una vez que el virus entra a la célula mantiene su genoma en estado episomal, con un número de copias bajo. En las células diferenciadas se lleva a cabo el ciclo productivo del virus, en donde amplifica su genoma en un alto número de copias, expresando genes tardíos L1 y L2, que codifican para las proteínas de la cápside (Doorbar 2006).

La replicación viral inicia con factores celulares del hospedero y la transcripción de las proteínas tempranas E1/E2 que participan en la replicación, transcripción del genoma viral y regulación de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 (Conger et al. 1999; Frattini & Laimins 1994). El VPH puede mantenerse en estado episomal,

sin embargo uno de los eventos claves inducidos por VPH durante la carcinogénesis es la integración de su genoma al de la célula hospedera (Thorland et al. 2003). La oncoproteína E6 del VPH16 está constituida por 151 aminoácidos con un peso molecular de 16-18 kDa. Contiene dos motivos de dedos de zinc altamente conservados, caracterizados por la presencia del motivo Cys-X-X-Cys, (Hernández 2004) que facilitan su interacción con diversas proteínas celulares como p53 al formar complejo con la ubiquitina ligasa E6-AP provocando su ubiquitinación y posterior degradación, además de activar a la telomerasa (Oh & Kyo 2001), induce la degradación de p53 (Scheffner et al 1990), p300 (Xie et al. 2014), MUIP1, hDlg y PTPN3 (Nagasaka et al. 2013), PDZRN3A, LNX3 (Thomas & Banks 2015).

Se han reportado variantes moleculares para el VPH16, que se definen cuando los virus difieren en al menos el 2% en la secuencia de nucleótidos del gen viral L1 y hasta un 5% en regiones no codificantes. Tomando como referencia la secuenciación del genoma de VPH16 aislada de 1985 (Seedorf et al. 1985) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/K02718.1>. Las variantes génicas del VPH16 se clasifican de acuerdo a su distribución geográfica en cuatro linajes principales: Europea-Asiática (EAs), Africana 1, Africana 2 (AFR2) y Asiática Americana (AA/NA) (Asadurian et al. 2007; Cornet et al. 2012).

En el estado de Guerrero, cinco variantes son las más frecuentemente detectadas en lesiones precursoras y CaCU, E-G350 (40%), seguido por la E-prototipo (13.03%), E-C188/G350 (11.82%), AA-a (10.61%), AA-c (6.07%) y E-A176/G350 (5.15%). Cabe destacar que todas estas variantes están altamente asociadas con el desarrollo de CaCU (Ortiz-Ortiz et al. 2015).

Se ha demostrado que en queratinocitos humanos inmortalizados las variantes de E6 del VPH16 difieren en su capacidad oncogénica, medida por la formación de colonias independientes de anclaje, disminución de los niveles Bax (Manzo-merino et al. 2014), alteración de la actividad de caspasa, degradación de FADD (Garnett et al. 2006), resistencia a la apoptosis, diferenciación celular (Niccoli et al. 2012). Experimentos *in vitro* sugieren que las variantes AA activan más eficientemente la

vía MAPK y PI3K/AKT que las variantes europeas favoreciendo la migración e invasión (Hochmann et al. 2016).

Recientemente, nuestro grupo de trabajo determinó mediante un modelo *in vitro* el efecto de las variantes de E6 en un perfil global de expresión de genes. Se encontró que las variantes de E6 del VPH16 desregulan la expresión de 436 genes involucrados en procesos relacionados con angiogénesis, ciclo celular, apoptosis, diferenciación, proliferación, señalización y adhesión. Uno de los procesos con más genes alterados fue la adhesión (Zacapala-Gómez et al. 2016)

La adhesión celular determina la capacidad de las células de mantener el contacto entre diferentes tipos celulares, anclarse entre células del mismo tipo y la interacción de ellas con la matriz extracelular. Además, de llevar a cabo señales que contribuyen directamente a la activación celular (Larrea & Izaguirre 2012).

Las moléculas de adhesión celular (MACs) son proteínas membranales que participan en diversos procesos como, la transducción de señales, crecimiento celular, diferenciación, expresión de genes sitio específico, morfogénesis, ciclo celular adhesión célula-célula e interacción célula-matriz extracelular. De acuerdo a su estructura y función, las CAMs se clasifican en cinco familias: integrinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas, mucinas, selectinas y cadherinas (Müller-Esterl 2008; Lodish 2005).

Las integrinas son receptores heterodiméricos que poseen una cadena α y β , dentro de las funciones que desempeñan son la conexión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular, activar vías de señalización (Murray 2005).

La familia de las inmunoglobulinas participa en la inmunidad, mediante las adhesiones independientes de calcio que se llevan a cabo con linfocitos y de moléculas de adhesión que median la unión entre células no inmunitarias, como la molécula de adhesión celular vascular (VCAM), y la molécula de adhesión neural (NCAM) (Murray 2005).

Las mucinas son un grupo heterogéneo de glucoproteínas, su presencia en la membrana celular favorece a las interacciones celulares, también están ligadas a la presencia de selectinas, además ayudan a lubricar y forman una barrera física protectora sobre superficies epiteliales (Van Roy & Berx 2008).

Las selectinas son proteínas transmembranales, contienen un dominio amino terminal (N-terminal) de unión a carbohidratos, un dominio carboxilo (COOH) y un dominio EGF, que participa en la interacción con mucina. La familia de las siguientes moléculas de adhesión: L-selectina (leucocitaria), P-selectina (plaquetaria), y E-selectina (endotelial) juegan un papel importante en la unión inicial, rodamiento de células inmunitarias y extravasación en las células endoteliales (Ruiz 2012).

El mantenimiento de la integridad y la organización de epitelio es un evento primordial para mediar la adhesión célula-célula y célula matriz extracelular, en esta interacción participan principalmente las cadherinas (Friedl et al. 2004). Las cadherinas son moléculas membranales dependientes de calcio e interacciones homofílicas. Los miembros de la familia de las cadherinas se encuentran clasificadas según sus características funcionales y homología de su secuencia, en las siguientes subfamilias: 1) Protocadherinas, mayormente implicadas en el desarrollo neural, 2) Cadherinas desmosomales que abarca desmogleinas y desmocolinas), 3) Cadherinas clásicas, incluye N-cadherina que participa en las uniones adherentes y, 4) cadherinas tipo 2 (K-cadherinas y cadherina-9) (Nollet et al. 2000). La función principal de las cadherinas es el mantenimiento de contactos intercelulares, en el desarrollo embrionario participan en la transición epitelio mesénquimal (TEM) (Hajra et al. 2002).

El estudio de las moléculas de adhesión en diversos tejidos ha relevado su relación directa con el proceso metastásico. Este proceso inicia con la disrupción célula-célula modificando a membrana basal invadiendo tejido circunvecino e infiltración a los vasos sanguíneos (Fife et al. 2014) siendo la pérdida de la adhesión celular uno de los principales factores que facilita la migración de células cancerosas (Conacci-Sorrell et al. 2002).

En diversos estudios se ha reportado baja regulación de la expresión de proteínas de adhesión como VCAM, en cáncer de mama se ha evidenciado que favorece la angiogénesis, supervivencia y la metástasis de las células cancerosas (Sharma et al. 2017); por otra parte, la expresión de E-cadherina y vimentina se correlacionan con menor supervivencia de las paciente (Yamashita et al. 2017) mientras que en cáncer gástrico la expresión anormal de E-cadherina y β -catenina se relacionan con el estadio avanzado de la enfermedad (Di et al. 2016).

Aunque se ha reportado que en el desarrollo del CaCU existen moléculas importantes encargadas del mantenimiento de la homeóstasis y adhesión celular, se ha observado que estas se desregulan, sugiriendo que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16 juegan un papel crítico en la alteración de la expresión de estas moléculas (Thomas et al. 2001; Watson 2003).

En CaCU se ha encontrado que desde etapas tempranas de la enfermedad inicia la disminución de E-cadherina, lo que ocasiona pérdida de la característica epitelial para adquirir propiedad mesenquimatosas (Ahmed et al. 2012; Shimizu et al. 1996). También se ha reportado que en carcinoma de células escamosas existe una disminución de β -catenina, mientras que en carcinomas adenoescamosas se pierde totalmente la expresión de la proteína (Carico et al. 2009).

En un reporte se determinó que E6 del VPH16 induce la metilación del promotor de E-cadherina y por consecuencia disminución de los niveles de su RNAm (D'Costa et al. 2012). Por otra parte, se ha propuesto también que las oncoproteínas virales del VPH16 pudieran inducir un cambio en la expresión de E-cadherina y P-cadherina en cáncer cervical (Hu et al. 2015).

Recientemente nuestro grupo de trabajo reportó que las variantes más frecuentes en el estado de Guerrero son: AA-a, AA-c, E-G350, E-C176/G350 y E-C188/G350 (Ortiz et al, 2015). Por otra parte, se analizó el efecto de las variantes sobre la expresión de genes en un modelo de células C33-A transfectadas establemente con E6 de cada una de estas variantes. El análisis de expresión por microarreglos demostró que 436 genes fueron desregulados por E6 del VPH16, de los cuales alrededor de 278 aumentaron su expresión y 158 disminuyeron. Los genes

afectados participan en procesos celulares relacionados con angiogénesis, ciclo celular, apoptosis, diferenciación, proliferación, señalización y adhesión. Los procesos con más genes alterados fueron: señalización celular 20.3%, transcripción 16.7% y genes de adhesión 14.6%. Por lo tanto se encontró que las variantes de E6 del VPH16 alteran diferencialmente la expresión de genes de adhesión (Zacapala et al., 2016). Hasta este momento, no existen reportes de los niveles de expresión de los genes de adhesión (*CALCR*, *CDH2*, *COL11A1*, *SRPX*, *CDH9*, *CDH18*, *CDH6*, *NID1*, *PCDH9* y *AMOTL1*) en cáncer cervical y sus lesiones precursoras asociados a la infección por VPH16. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar los niveles de expresión del RNAm de los genes de adhesión previamente mencionados y su posible asociación con variantes del VPH16 y la expresión de sus oncoproteínas virales E6 y E7.

IV. Materiales y Métodos

Recolección de muestras

Las biopsias analizadas fueron obtenidas de pacientes residentes del estado de Guerrero y otorgadas por el Instituto Estatal de Cancerología “Arturo Beltrán Ortega” de Acapulco, Guerrero. Las muestras se seleccionaron del biobanco del Laboratorio de Biomedicina Molecular (LBM) de la FCQB de la UAGro. Todas las muestras se conservaron en solución *All protec* (QIAGEN No. Cat.76405) a -80°C hasta su genotipificación. La determinación del genotipo y la tipificación de la variante se realizó por el LBM. Se nos proporcionaron 12 muestras con el siguiente diagnóstico histológico: Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LEIBG n=2), lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LEIAG n=1), y cáncer cervicouterino (CaCU n=9). Cuatro biopsias de tejido normal no canceroso y sin infección por VPH o lesiones precursoras fueron incluidas en el estudio, derivadas de histerectomías de pacientes del Hospital Juárez de la ciudad de México, las cuales estaban conservadas en solución salina isotónica al 0.9% hasta su procesamiento.

Extracción de RNA

La biopsia se incubó en hielo con 1 mL de Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA 92008) durante 5 minutos y posteriormente fueron disgregadas con un homogenizador de tejido (Tissue Tearor™ modelo 398, 120 V) por aproximadamente 5 minutos. Después de homogenizar, se añade cloroformo y se obtiene la fase acuosa transparente donde se encuentra el RNA. Posteriormente el RNA se precipitó con isopropanol. Y finalmente se realizaron lavados con etanol al 75%. El RNA obtenido se digirió con 1 U/μL de DNasa (DNase I, RNase-free) para eliminar el DNA que se encontrara contaminando la muestra. Para posteriormente realizar la retrotranscripción.

Retrotranscripción y PCR en tiempo Real (RT-qPCR)

Los cDNAs fueron sintetizados a partir de 200 ng de RNA empleando un kit de amplificación (SuperScrip™III Reverse Transcriptase, Applied Biosystems). El

protocolo consta de los siguientes pasos 1) unión del oligo Dt (*Invitrogen*) a la cola de poli A del RNAm, 2) la polimerasa rTth cataliza la extensión incorporando los nucleótidos, y, 3) Síntesis del cDNA e inactivación de la enzima. El análisis de la expresión del RNAm se realizó usando SYBER Green (Applied Biosystems), utilizando los oligonucleótidos que se describen en el cuadro 1 y que fueron diseñados usando la herramienta IDT (*INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES*). Para la detección de la fluorescencia se usó el Software 7500 V2.0.6 en el equipo para PCR en tiempo real Applied Biosystems. Se utilizó como control endógeno el gen Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para normalizar los datos. La cuantificación de la expresión relativa del RNAm se realizó por el método $2^{-\Delta\Delta ct}$.

Cuadro 1. Oligonucleótidos empleados para la q-PCR

Gen	Descripción	Oligonucleótidos	Secuencia (5' > 3')	Tamaño del producto (pb)	No. Acceso pubmed
AMOTL1	Angiomotina tipo 1	S	TTGGAAGGCGAGATTAGAAGAC	97	NM_130847.2
		AS	CTTCGTATTCCTGCTGGATAG		
CDH2	Cadherina 2	S	GACAGTTCCTGAGGGATCAAAG	104	NM_001792.4
		AS	CGATTCTGTACCTCAACATCCC		
CDH6	Cadherina 6	S	GGAAGCCTCCAATCCTTATGT	93	NM_004932.3
		AS	TCTACATCCTCCACCACAATTC		
CDH9	Cadherina 9	S	CAGCACTGGTACACTCACTATC	129	NM_016279.3
		AS	CAGAGTAGAATCGCAACGAGAG		
NID1	Nidogeno 1	S	TGAGGAAGACAGAAGCAAAGG	105	NM_002508.2
		AS	CAGTGATGTCCGTCCAGTAAA		
COL11A1	Colágena 11 tipo 1	S	CTGGTCATCCTGGGAAAGAAG	114	NM_001854.3
		AS	CACCATCTGCTCCCTTACTC		
CALCR	Receptor de calcitonina	S	CATTGTCGTGGCTGTGTTTAC	105	NM_001164737.1
		AS	GCCCTGGTAATAGCATGGATAG		
SRPX		S	TCCAGAAGGAGACCACAAGA	99	NM_006307.4
		AS	CCACAGCGTTTGACTCTTACT		
CDH18	Cadherina 18	S	TGAACGCCTGCCTGTAAAT	87	XM_005248228.2
		AS	CTAAATCTCCTCCGCCTTGTC		
PCDH9	Protocadherina 9	S	AAGCTGTGACTCTTTCCATTCT	109	NM_203487.2
		AS	ATAGAGAGCAGCAGAGTTCCTA		
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	S	GACCCTTCATTGACCTCAAC	449	NM_001289745.1
		AS	GTGGCAGTGATGGCATGGAC		
E6	Oncogén E6 (VPH16)	S	ATGCACCAAAAAGAGAAGTCAATG	474	KM058601.1
		AS	ACGTCGCAGTAACTGCTTGCA		
E7	Oncogén E7(VPH16)	S	ATGCATGGAGATACACCTACATTGC	297	KM058628.1
		AS	ACCAAAGACTCTTGCTACCCCGT		

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico STATA V12.0. Se reportaron las medias y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. Se utilizó la prueba de t-Student para comparar medias entre dos grupos y la correlación de Spearman para determinar la asociación entre los niveles de E6 y la expresión de los genes. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo. Para los gráficos se utilizó el programa GraphPrisma 6.

V. Resultados

Se analizaron 12 biopsias positivas a la infección por VPH16 con previo análisis del estado físico del genoma viral. Una muestra fue positiva a la secuencia de referencia del VPH16 (E-prototipo), cinco fueron positivas a la variante E-G350, cinco positivas a la variante AA-c y una a la variante AA-a. También se analizaron cuatro muestras de tejido normal no canceroso y negativas a la infección por VPH (dos con diagnóstico de leiomatosis uterina, dos de endo y exocervicitis y quiste de retención endocervical además de leiomiomatosis uterina) fueron incluidas en el estudio como muestras control (Cuadro 2). El genoma viral del VPH16 se encontró integrado al genoma de las pacientes en todas las muestras positivas a las variantes AAs, mientras que las muestras positivas a las variantes europeas presentaron un estado mixto (episomal e integrado).

Cuadro 2. Características clínicas de las biopsias analizadas

Genotipo viral	Estado físico del VPH	Variante de E6	Diagnostico Histológico	Estadio clínico de acuerdo a FIGO
Negativo	---	Negativo (n=4)	Leiomatosis uterina	---
16	Mixto	E-PROTOTIPO	LEIBG	---
16	Mixto	E-G350	Carcinoma epidermoide invasor queratinizante	IIB
16	Mixto	E-G350	LEIBG	---
16	Mixto	E-G350	Carcinoma epidermoide invasor de células grandes queratinizantes	IIB
16	Mixto	E-G350	Carcinoma	---
16	Mixto	E-G350	Carcinoma	---
16	Integrado	AA-a	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor	IIB
16	Integrado	AA-c	Carcinoma epidermoide invasor queratinizante	IB
16	Integrado	AA-c	Carcinoma epidermoide invasor bien diferenciado queratinizante	IB
16	Integrado	AA-c	Carcinoma epidermoide invasor de células grandes queratinizantes	IIIB
16	Integrado	AA-c	LEIAG	---
16	Integrado	AA-c	Carcinoma	---

LEIBG: Lesión escamosa epitelial de bajo grado, LEIAG: lesión escamosa epitelial de alto grado.

El VPH16 altera la expresión de genes de adhesión en cáncer cervical

El análisis de los genes de adhesión (*AMOTL*, *CDH6*, *NID1* y *SRPX*) por RT-qPCR mostró alteración en la expresión de los genes en las muestras positivas al VPH16 en comparación con los niveles encontrados en tejido normal. No así para el gen *PCDH9*, que se encontró sobre-expresado en tejido normal (Figura 1). Posteriormente se realizó el análisis de la expresión de los genes en relación a las variantes de VPH16, para determinar si estas podrían estar modulando diferencialmente la expresión de los genes de adhesión.

Las variantes de E6 del VPH16 modulan de manera diferencial la expresión de los genes de adhesión en cáncer cervical

Se encontró que el gen con mayor expresión fue *NID1* en la variante AA-c y AA-a (1,200 y 120 veces más, respectivamente) en comparación con las muestras con la E-P (Figura 2). En el caso de *AMOTL1* y *CDH6* se encontró que incrementaron 24 y 13 veces más respectivamente, en las muestras positivas a la variante E-G350, así como 16 y 10 veces más en las muestras positivas a la variante AA-a. El gen *SRPX* incrementó su expresión 10 veces en las muestras positivas a la variante AA-c en comparación con las muestras de tejido normal negativas a infección por VPH. Por el contrario, la expresión de *PCDH9* no fue detectada en ninguna de las muestras positivas al VPH16, pero sí en las biopsias de tejido normal (Figura 2). La expresión de *CDH2* y *COL11A1* no pudo ser detectada en tejido normal.

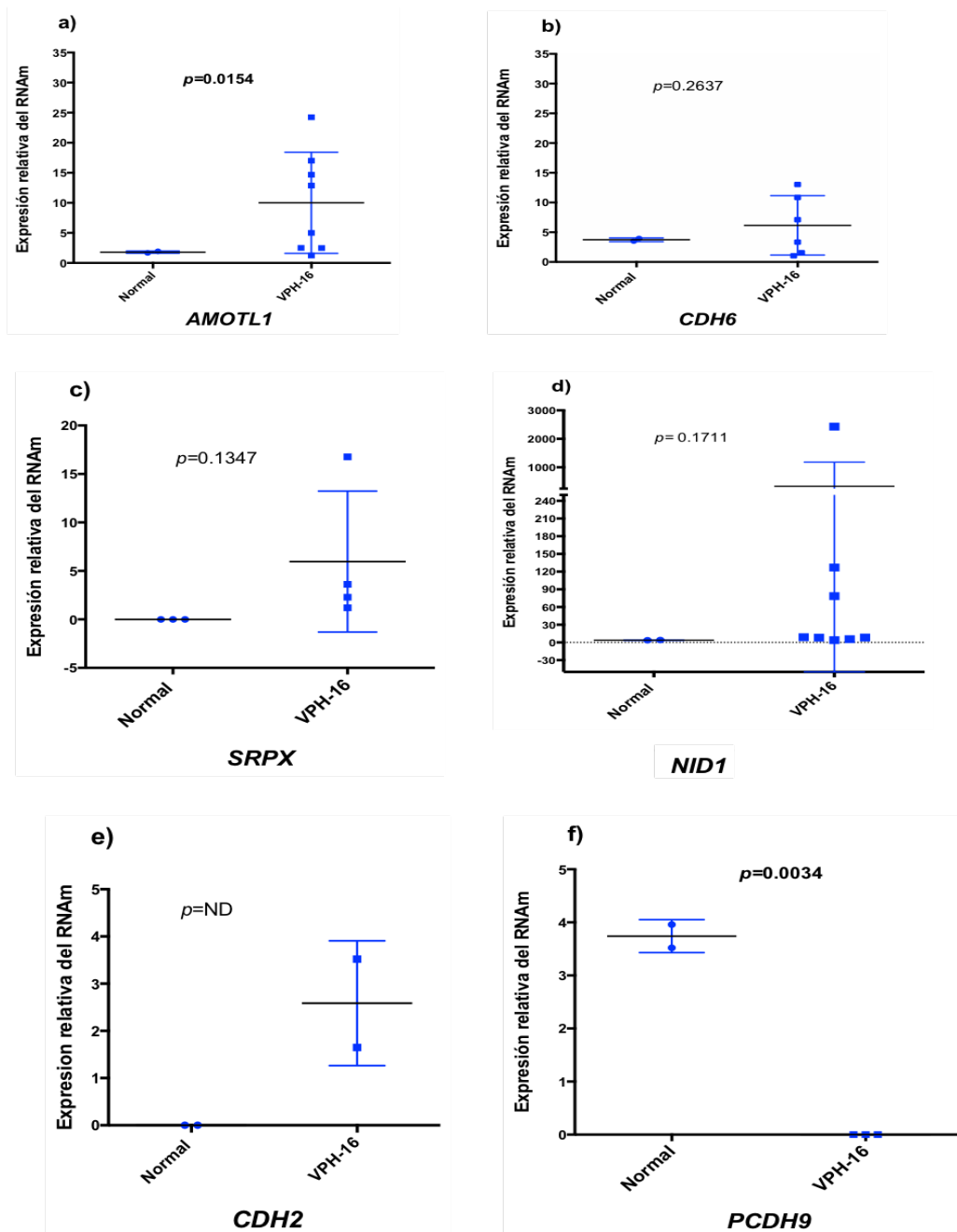


Figura 1. Expresión de los genes de adhesión en biopsias cervicales con infección por VPH16. Análisis de la expresión de genes de adhesión por RT-qPCR a) *AMOTL1*, b) *CDH6*, c) *SRPX*, d) *NID1*, e) *CDH2* y f) *PCDH9*. Se muestran las medias y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La prueba t-Student fue utilizada para la comparación de las medias. Cada punto azul representa la expresión relativa del gen en una muestra independiente. (ND= No determinado)

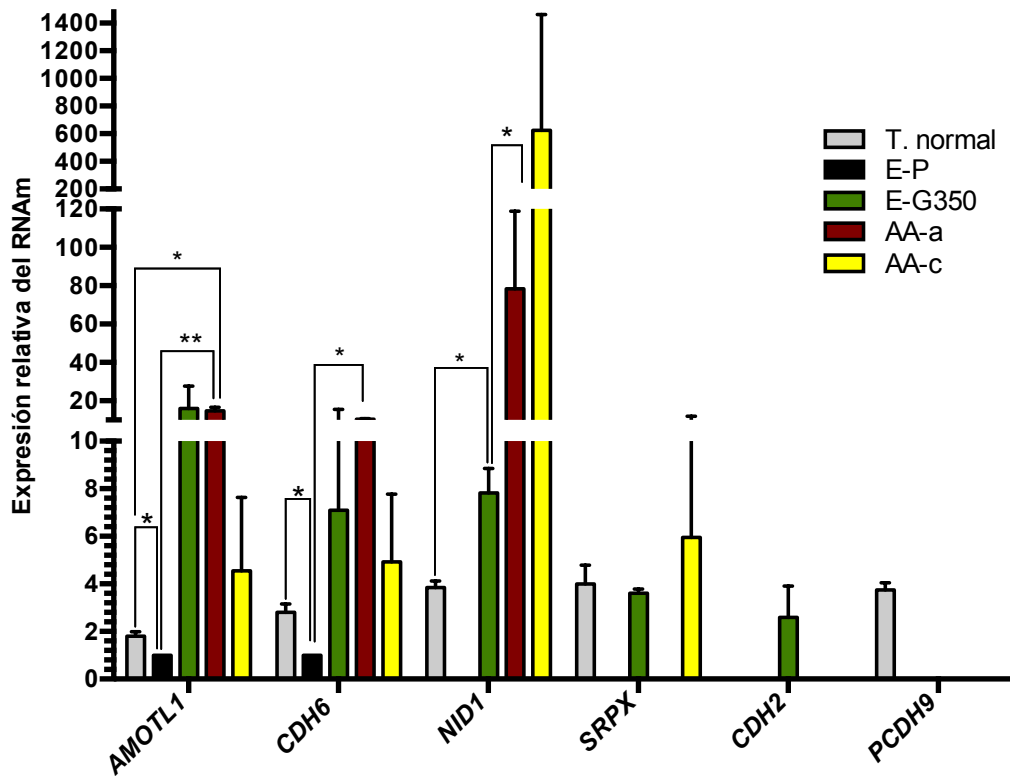


Figura 2. Expresión de genes de adhesión entre variantes del oncogén E6 del VPH16 y tejido normal. El análisis por RT-qPCR muestra los datos cuantitativos de la expresión del RNAm de los genes *AMOTL1*, *CDH6*, *CDH2*, *NID1*, *SRPX*, *CDH6* y *PCDH9* en biopsias cervicales positivas y negativas a variantes de VPH16. Se reportan las medias y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La prueba t-Student fue utilizada para la comparación de las medias $p \leq 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Por otra parte, observamos que la expresión de *NID1* tuvo mayor incremento en las muestras positivas a las variantes AAs (AA-a y AA-c) en comparación con las muestras positivas a la E-Prototipo (Figura 3b y 3c). Mientras que el gen *SRPX* se expresó mayoritariamente en las muestras positivas la variante AA-c, seguido de las muestras positivas a la variante E-G350 (Figura 3c y 3a). Finalmente, *CDH2* se encontró sobre expresado en una muestra con la variante E-G350, sin embargo, no se encontró significancia estadística (Figura 3a).

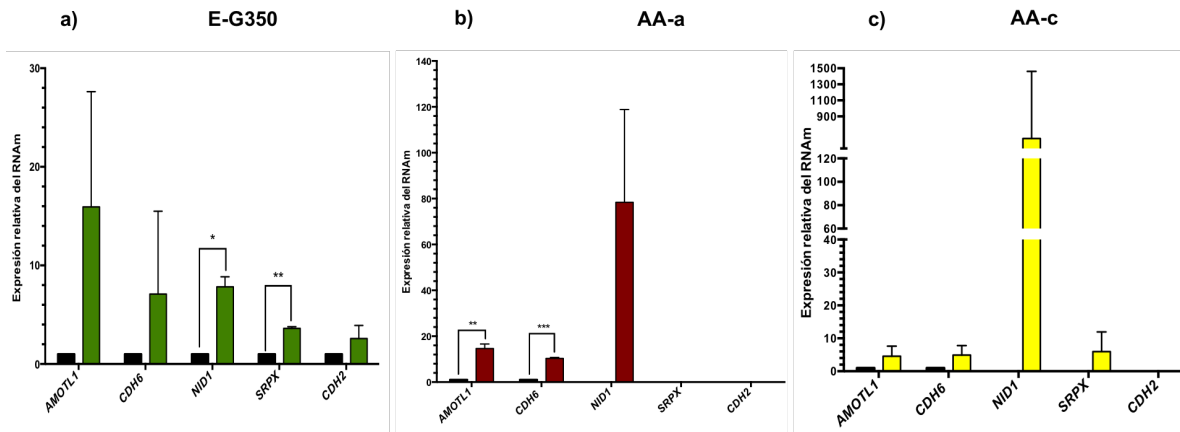


Figura 3. Expresión de los genes de adhesión por las variantes del VPH16 en comparación E6 E-P. El análisis por RT-qPCR muestra cuantitativamente la expresión de los genes *AMOTL1*, *CDH6*, *NID1*, *SRPX* y *CDH2* por las variantes a) E-G350, b) AA-a y c) AA-c vs. E-P. Se muestran las medias y error estándar de tres experimentos independientes. La prueba t-Student fue utilizada para determinar la significancia. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Las variantes AAs del VPH16 expresan altos niveles del oncogén E6

El análisis de la expresión del oncogén *E6* del VPH16 demostró que su nivel varía en las biopsias y que está relacionado con la variante del VPH16 que contiene cada muestra. Observamos que las variantes AA-a y AA-c expresan más *E6* que la variante E-G350 (1,530 y 963 vs. 703 veces). Mientras que la E-P presentó los niveles más bajos de *E6* (Figura 4). Por otro lado, el análisis de la expresión del oncogén *E7* mostró que las muestras positivas a las variantes E-G350 y AA-c tuvieron un incremento de 20 y 30 veces con respecto a la E-P (Figura 4).

Adicionalmente, se encontraron diferencias significativas entre la expresión del oncogén *E6* con el incremento de los genes *AMOTL1* y *NID1* por las variantes AA-c y E-G350, respectivamente. Sin embargo, la expresión de *CDH6* y *SRPX* no mostraron asociación significativa con los niveles de *E6*. Con respecto al oncogén *E7*, no se encontró correlación de su expresión con la expresión de los genes de adhesión (*datos no mostrados*).

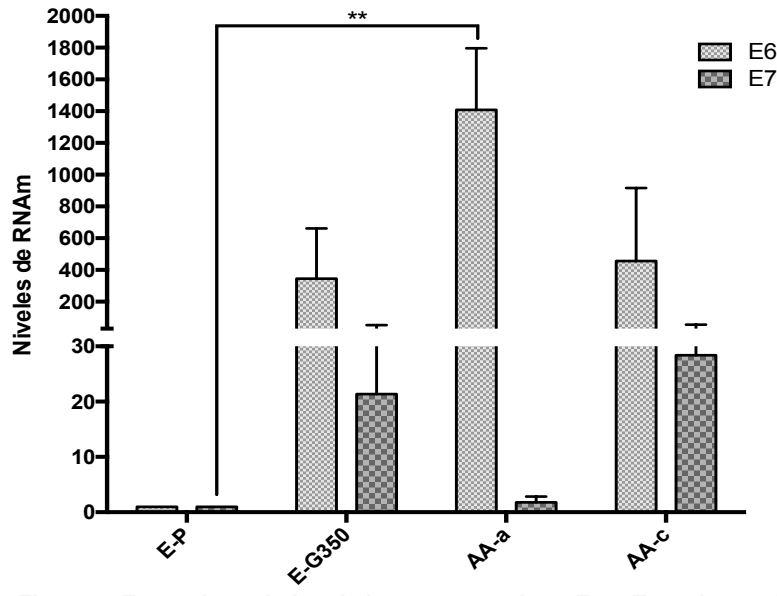


Figura 4. Expresión relativa de los oncogenes E6 y E7 en las variantes de VPH16. Por RT-qPCR se determinó la expresión del RNAm de E6 y E7 de las variantes E-G350, AA-a y AA-c vs E-P. Se muestran las medias y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La significancia se determinó con la prueba t-Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

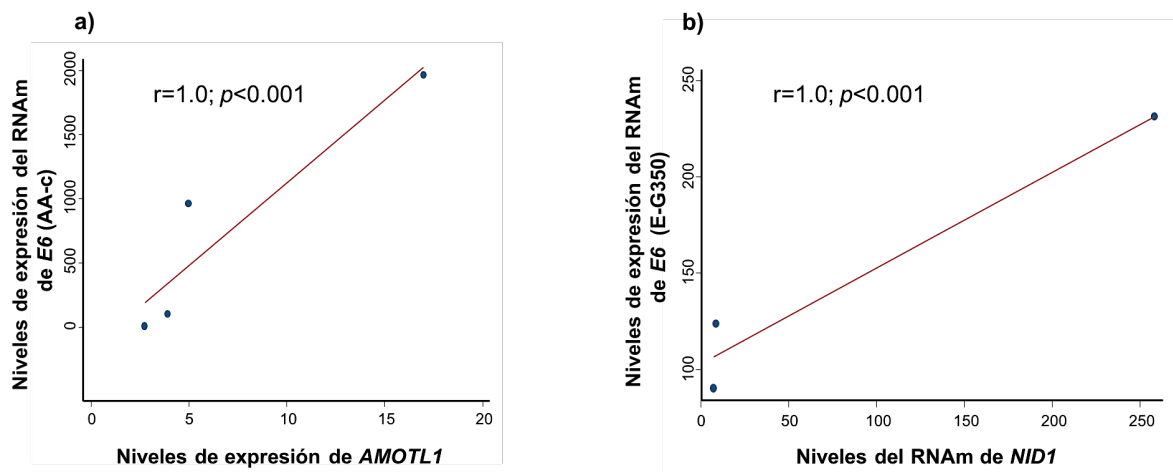


Figura 5. Correlación entre los niveles del oncogén E6 y la expresión de los genes de adhesión. a) niveles de AMOTL1 por E6 la variante AA-c, y b) niveles de NID1 por la variante E-G350. Puntos (•) muestras; la pendiente, correlación lineal estimada basada en la r de Spearman.

Las variantes de E6 del VPH16 modulan la expresión de genes de adhesión *In vitro* e *In vivo*

Previamente, nuestro grupo de trabajo encontró que las variantes de E6 del VPH16 modulan la expresión de genes de adhesión en células C33-A (modelo *in vitro*). Con la finalidad de determinar el comportamiento de la expresión de los genes estudiados en tejidos de pacientes (*in vivo*), analizamos la expresión de los genes alterados (reportados previamente) en un grupo de muestras de pacientes (cáncer y lesiones premalignas) con infección por VPH16 y en tejido normal negativo a VPH16.

En el cuadro 4 se muestran los genes analizados por RT-qPCR tanto *in vitro* (C33-A) como *in vivo* (en muestras clínicas). *CDH2* y *SRPX* fueron los únicos genes que muestran concordancia en sus niveles de expresión tanto *in vitro* como *in vivo* (cuadro 4). Cabe mencionar que encontramos un incremento en los niveles de expresión de los genes *AMOTL1*, *CDH6* y *SRPX* en muestras de tejido normal al compararlos con muestras de cáncer positivas al VPH16 (Figura 1, 2 y 3). Por otra parte, no pudimos detectar la expresión de los genes *CDH18*, *CDH9*, *COL11A1* y *CALCR*.

Cuadro 4. Comparación de la expresión relativa de genes alterados por las variantes de VPH16 en células C33-A y en muestras clínicas (cáncer cervical, lesiones precursoras y tejido normal).

Gen / variante	C33-A*			Muestras clínicas**			
	AA-a	AA-c	E-G350	Tejido normal	AA-a	AA-c	E-G350
<i>AMOTL1</i>	--	2.72 ^a	--	1.8	13.17	4.55	15.94
<i>CDH2</i>	--	--	2.35 ^a	--	--	--	3.52
<i>CDH6</i>	--	2.96 ^a	/	2.81	10.329	4.92	7.098
<i>CDH9</i>	5.97 ^a	--	--	--	--	--	--
<i>COL11A1</i>	19.86 ^a	--	--	--	--	--	--
<i>NID1</i>	--	--	12.62 ^a	3.48	78.4	618.73	7.825
<i>CALCR</i>	--	120.88 ^a	--	--	--	--	--
<i>SRPX</i>	--	3.37*	--	2.66	--	11.917	3.61
<i>CDH18</i>	--	-2.01*	--	--	--	--	--
<i>PCDH9</i>	--	--	2.45*	3.74	--	--	--

^a= genes determinados por microarreglo y validados por RT-qPCR, *= genes *in vitro*, determinados por microarreglo no validados por RT-qPCR (Zacapala-Gómez 2016), ** Cáncer y Lesiones intraepiteliales, genes determinados por RT-qPCR, --: negativo a la expresión por RT-qPCR.

VI. Discusión

Las evidencias experimentales sugieren que las variantes del VPH16 contribuyen diferencialmente al desarrollo de cáncer cervical (Niccoli et al. 2012). Previamente nuestro grupo de trabajo reportó que las variantes de E6 del VPH16 modifican la expresión de genes que participan en la adhesión celular (Zacapala-Gómez et al. 2016).

En este trabajo, analizamos la expresión de diez genes de adhesión (cuadro 4) en biopsias de cáncer cervical y lesiones precursoras positivas a las variantes AA-a, AA-c y E-G350 del VPH16, así como en tejido normal. Nuestros resultados muestran que los genes *NID1*, *AMOTL1*, *SRPX*, *CDH6* y *CDH2* están incrementados en las muestras positivas al VPH16 comparadas con tejido normal, mostrando diferencias en su nivel de expresión entre las muestras positivas a diferentes variantes del VPH16.

Nuestros resultados indican que las muestras positivas a las variantes AAs tuvieron la mayor expresión del gen *NID1*. La familia de los nidogenos también denominados entactinas, son una serie de glicoproteínas monoméricas sulfatadas presentes en la membrana basal de los epitelios (Breitkreutz et al. 2004). *NID1* codifica para la proteína Nidogen1 que interacciona con colágeno IV, perlecano y laminina para mantener la estabilización células epiteliales (Vasudevan et al. 2010).

La expresión de *NID1* en cáncer es controversial, mientras que en cáncer de colon se ha reportado metilación de su promotor y una baja expresión del gen (Ulazzi et al. 2007). En cáncer endometrial la sobre-expresión de *NID1* participa activamente en la progresión e invasión de células cancerosas (Pedrola et al. 2015). Por otra parte, en cáncer de ovario la sobre-expresión de esta proteína promueve la transición epitelio mesenquimal (TEM), invasividad, así como resistencia al tratamiento a cisplatino. Además, la alta expresión de esta proteína se relaciona con menor supervivencia de las pacientes (Zhou et al. 2017). En CaCU no se sabe el papel que juega *NID1*, sin embargo, encontramos su sobre-expresión tanto en cáncer como en lesiones precursoras (Figura 2). Las muestras de CaCU positivas a variantes altamente agresivas como las AAs tuvieron mayores niveles de *NID*, lo que podría indicar que estas variantes favorecen la expresión de *NID1* y de esta

forma contribuir a la agresividad del tumor. Sin embargo, se necesitan más estudios para corroborar esta hipótesis.

El gen *AMOTL1* pertenece a la familia de las motinas o angiomotinas, consiste en un grupo de proteínas que contienen un dominio PDZ de unión a proteínas. Estas moléculas juegan un papel importante en la formación del tubo neural, migración de células endoteliales, regulación de las uniones estrechas, polaridad y en las células epiteliales y participan en la transición epitelio mesenquimal (Ernkvist et al. 2012; Wells et al. 2006). En cáncer de mama la expresión de *AMOTL1* favorece la migración y la proliferación celular mediante la activación de la cinasa Src (Couderc et al. 2016). Así mismo, se ha descrito que *AMOTL1* es un regulador negativo del coactivador transcripcional YAP (Wang et al. 2011; Chan et al. 2011). En cáncer de mamá YAP está sobre expresado y los niveles de su proteína correlacionan con los niveles del RNAm de *AMOTL1* (Couderc et al. 2016). En cáncer cervical los niveles de YAP también se encuentran incrementados, y la oncoproteína E6 del VPH16 estabiliza sus niveles e induce su translocación al núcleo. YAP en el núcleo se puede unir a factores que activan la transcripción de genes relacionados a proliferación y supervivencia. (He et al. 2015). Nosotros sugerimos que este podría ser el mecanismo por el cual las variantes del VPH16 regulan la expresión de *AMOTL1*, por lo tanto, si el nivel del RNAm correlaciona con el de su proteína podría estar relacionado con procesos de metástasis en CaCU. Sería interesante medir los niveles de proteína de YAP para corroborar nuestra hipótesis.

Previamente, nuestro grupo de trabajo reportó que el gen *SRPX* se encuentra alterado en células que expresan la oncoproteína E6 de la variante AA-c en comparación con la E-P. En este trabajo nosotros encontramos que en biopsias de cáncer cervical que contienen la variante AA-c también está sobre-expresado en comparación con las biopsias que contienen otra variante del VPH16. Estos resultados validan nuestros descubrimientos en el modelo *in vitro* (Figura 1). En cáncer cervicouterino se desconoce totalmente el papel de este gen, ya que este es el primer reporte donde se encuentra alterado por efecto de la oncoproteína E6 del VPH16.

La expresión de *CDH6* fue homogénea en las muestras con la variante AA-c, (incrementó 7 veces en relación a la E-P). Mientras que para *CDH2* no se encontró diferencia significativa en su expresión. En queratinocitos se sabe que la expresión de E6/E7 del VPH16 inducen cambios en la expresión de cadherinas, por ejemplo, la expresión de E-cadherina disminuye mientras que P-cadherina incrementa a medida que una lesión premaligna progresa a carcinoma, lo que favorece a la invasión celular (Hu *et al.*, 2015). En nuestro grupo de trabajo se encontró sobreexpresión de N-cadherina por ensayos de microscopia confocal de fluorescencia y estos niveles correlacionan con los niveles de su mensajero correspondiente (Arcos Almazán & Estela- Ramírez-tesis de licenciatura). Sin embargo, en este trabajo se detectó baja expresión del mRNA en algunas muestras positivas a las variantes E-G-350 y AAs (Figura 2) si esto se traduce a proteína podría ser suficiente para interferir con las uniones celulares e inducir la migración de células tumorales de CaCU.

En este trabajo no pudimos detectar la expresión de *COL11A1*, *CDH18*, *PCDH9*, *CALCR* y *CDH9* en las biopsias de CaCU y lesiones precursoras. Sin embargo, en biopsia de tejido normal, la expresión de *PCDH9* fue detectada en muy baja expresión (Figura 2). *PCDH9* pertenece al miembro de las protocadherinas y familia de las cadherinas, su función es regular las interacciones celulares. En células gliales se ha reportado que *PCDH9* cumple la función de supresor de tumor (Wang et al. 2012).

Se ha reportado que el potencial carcinogénico de los VPH-AR se debe en gran parte a su integración al genoma celular, dando como resultado la sobre-expresión constitutiva de las oncoproteínas E6 y E7. Por esta razón analizamos la expresión de los genes E6 y E7 en las muestras positivas al VPH16. Interesantemente encontramos mayor expresión tanto de E6 como de E7 en las biopsias positivas a las variantes asiático americanas (AA-a y AA-c) en comparación con las europeas. Estos resultados concuerdan con un reporte previo, en el que transfectaron las

secuencias de las variantes AA-a, AA-c y europeas en células HeLa y SiHa para evaluar la actividad de E2 sobre la expresión de los oncogenes. Encontraron más transcritos *E6/E7* en las muestras positivas a las variantes AA comparadas con las muestras europeas. Ellos sugieren que las diferencias en la regulación de la transcripción de oncogenes virales podría involucrar al gen *E2* de las variantes AA (Ordoñez et al. 2004). En nuestro estudio todas las muestras AA tienen el genoma del VPH integrado, en contraste con las europeas que presentan la versión mixta lo cual podría explicar los altos niveles de *E6* y *E7* en las AA.

En este estudio encontramos que las variantes AAs muestran mayor nivel de transcritos de *E6* y *E7*, y que los genes *NID1* y *AMOTL1* incrementaron significativamente en las muestras con estas variantes. Nuestros datos sugieren que los niveles de *E6* de la variante E-G350 se relacionan con el incremento de niveles de *NID1*. En contraste, los niveles de *E6* de la variante AA-c se relacionan con la expresión del gen *AMOTL1* (Figura 5). Mientras que no fue posible realizar el análisis con la variante AA-a dado el número de muestras.

Finalmente, al comparar nuestros resultados con los genes reportados en el modelo *in vitro* (Cuadro 4) encontramos que la expresión de *CDH2* y *SRPX* concuerda con nuestro modelo de estudio. Lo que parece indicar que, a pesar de la heterogeneidad de las muestras analizadas, la expresión de los genes *in vitro* es reproducible en un tejido con infección por VPH16. En tanto que los genes *AMOL T1*, *CDH6* y *NID1* no fueron específicas de cada variante.

En conjunto, nuestros resultados indican que las muestras que tienen las variantes AAs tienen mayores niveles de *E6* y *E7* y que posiblemente al sobre-expresar los genes *NID1*, *AMOTL1* y *SRPX*, les confiera mayor ventaja en inducir pérdida de la adhesión celular y migración en cáncer cervicouterino.

VII. Conclusiones

- En las muestras de cáncer cervical y lesiones precursoras positivas al VPH16 únicamente se encontró disminución de *PCDH9*, y sobre-expresión de los genes de adhesión *NID1*, *AMOTL1*, *CDH6*, *SRPX* y *CDH2* en comparación con tejido normal.
- En las muestras que contienen las variantes AAs se encontró mayormente incrementado *NID1*, e interesantemente el gen *SRPX* fue específico para esta variante.
- Las variantes AAs del VPH16 expresaron niveles altos de los oncogenes *E6* y *E7* en comparación con variantes europeas, lo que podría conferirles mayor potencial oncogénico que al resto de las variantes.
- La expresión de los genes *NID1* y *AMOTL1* están relacionadas con los niveles E6 de las variantes AA-c y E-G350 del VPH16. Mientras que no se encontró relación entre los niveles de *E7* y la expresión de los genes de adhesión analizados.

VIII. Perspectivas

- Analizar la expresión de los genes de adhesión en un mayor número de muestras positivas a las variantes AA-a del VPH16 y analizar si existe asociación con los niveles de *E6* y *E7*.
- Determinar la expresión de las oncoproteínas *E6* y *E7* en las muestras positivas a las diferentes variantes del VPH16 y correlacionarlos con los niveles de sus RNA mensajeros correspondientes.
- Sería importante analizar el papel funcional de los genes *AMOTL1*, *NID1* y *SRPX* en células de cáncer cervical.
- Analizar la relación de la expresión de *AMOTL1* y YAP en muestras positivas a las variantes del VPH16.

IX. Referencias

- Ahmed, H.G. et al., 2012. Frequency and genotype of human papillomavirus among Sudanese patients with head and neck tumours. *Ecancermedicalscience*, 6(1), pp.4–11.
- Arcos Almazan & Estela Ramirez (2017) Efecto de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16 sobre la expresión de cadherinas en células C33-A. Facultad de ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Guerrero.
- Asadurian, Y. et al., 2007. Activities of Human Papillomavirus 16 E6 Natural Variants in Human Keratinocytes. , 1760(June), pp.1751–1760.
- Boggon, T.J., 2002. C-Cadherin Ectodomain Structure and Implications for Cell Adhesion Mechanisms. *Science*, 296(5571), pp.1308–1313.
- Breitkreutz, D. et al., 2004. Inhibition of basement membrane formation by a nidogen-binding laminin γ 1-chain fragment in human skin-organotypic cocultures.
- Carico, E. et al., 2009. Adhesion molecules and p16 expression in endocervical adenocarcinoma. *Virchows Archiv*, 455(3), pp.245–251.
- Chan, S.W. et al., 2011. Hippo pathway-independent restriction of TAZ and YAP by angiomin. *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), pp.7018–7026.
- Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J. & Ben-Ze'ev, A., 2002. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 109(8), pp.987–991.
- Conger, K.L. et al., 1999. Human Papillomavirus DNA Replication. , 274(5), pp.2696–2705.
- Cornet, I. et al., 2012. Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *Journal of Virology*, 86(12), pp.6855–6861.
- Conger, K.L. et al., 1999. Human Papillomavirus DNA Replication. , 274(5), pp.2696–2705.
- Cornet, I. et al., 2012. Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *Journal of Virology*, 86(12), pp.6855–6861. Available at: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00483-12>.
- Couderc, C. et al., 2016. AMOTL1 Promotes Breast Cancer Progression and Is Antagonized by Merlin. *Neoplasia*, 18(1), pp.10–24.
- D'Costa, Z.J. et al., 2012. Transcriptional Repression of E-Cadherin by Human Papillomavirus Type 16 E6. *PLoS ONE*, 7(11).
- Di Bartolomeo, M. et al., 2016. Osteopontin, E-cadherin, and β -catenin expression as prognostic biomarkers in patients with radically resected gastric cancer. *Gastric Cancer*, 19(2), pp.412–420.
- Doorbar, J., 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110(5), pp.525–541.
- Ernkvist, M. et al., 2012. The Amot / Patj / Syx signaling complex spatially controls RhoA GTPase activity in migrating endothelial cells The Amot / Patj / Syx signaling complex spatially controls RhoA GTPase activity in migrating endothelial cells. , 113(1), pp.244–253.
- Evander, M. et al., 1997. Identification of the α 6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *Journal of virology*, 71(3), pp.2449–56. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9032382> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC191355>.

- Ferlay, J. et al., 2015.** Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), pp.E359–E386
- Fife, C.M., McCarroll, J.A. & Kavallaris, M., 2014. Movers and shakers: Cell cytoskeleton in cancer metastasis. *British Journal of Pharmacology*, 171(24), pp.5507–5523.
- Frattini, M.G. & Laimins, L.A., 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), pp.12398–402.
- Friedl, P., Hegerfeldt, Y. & Tusch, M., 2004. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *International Journal of Developmental Biology*, 48(5–6), pp.441–449.
- Garnett, T.O., Filippova, M. & Duerksen-hughes, P.J., 2006. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. , pp.1915–1926.
- Hajra, K.M., Chen, D.Y. & Fearon, E.R., 2002. The SLUG Zinc-Finger Protein Represses E-Cadherin in Breast Cancer Advances in Brief The SLUG Zinc-Finger Protein Represses E-Cadherin in Breast Cancer 1. , (734), pp.1613–1618.
- He, C. et al., 2015. The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression. *EMBO molecular medicine*, 7(11), pp.1426–49.
- Hernández, E.D.L.C., 2004. Elementos víricos y celulares que intervienen en el proceso de replicación del virus del papiloma humano. *Revista de ...*, 6(5), pp.263–271.
- Hochmann, J. et al., 2016. The Asian-American variant of human papillomavirus type 16 exhibits higher activation of MAPK and PI3K/AKT signaling pathways, transformation, migration and invasion of primary human keratinocytes. *Virology*, 492, pp.145–154.
- Hu, D. et al., 2015. HPV-16 E6/E7 promotes cell migration and invasion in cervical cancer via regulating cadherin switch in vitro and in vivo. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 292(6), pp.1345–1354.
- Illades-Aguilar, B. et al., 2010. Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecologic Oncology*, 117(2), pp.291–296.
- Larrea, D. & Izaguirre, M.F., 2012. *Expresión Tridimensional de Cadherina E*, EAE.
- Lodish, H., 2005. *Biología celular y molecular*, Médica Panamericana. Available at: <https://books.google.com.mx/books?id=YdyMSxY2LjMC>.
- Manzo-merino, J. et al., 2014. The human papillomavirus (HPV) E6 oncoproteins promotes nuclear localization of active caspase 8. *Virology*, 450–451, pp.146–152.
- Müller-Esterl, W., 2008. *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*, Editorial Reverté.
- Muñoz, N. et al., 2006. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24(SUPPL. 3), pp.1–10.
- Murray, R., 1AD., 2005. *Harper: bioquímica ilustrada (29a. ed.)*, McGraw Hill Mexico. Available at: <https://books.google.com.mx/books?id=XRslCgAAQBAJ>.

- Nagasaka, K. et al., 2013. PDZ Domains and Viral Infection : Versatile Potentials of HPV-PDZ Interactions in relation to Malignancy. , 2013.
- Niccoli, S. et al., 2012. The Asian-American E6 variant protein of human papillomavirus 16 alone is sufficient to promote immortalization, transformation, and migration of primary human foreskin keratinocytes. *J Virol*, 86(22), pp.12384–12396.
- Nollet, F., Kools, P. & van Roy, F., 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members 1 Edited by M. Yaniv. *Journal of Molecular Biology*, 299(3), pp.551–572.
- Oh, S.T. & Kyo, S., 2001. Telomerase Activation by Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein : Induction of Human Telomerase Reverse Transcriptase Expression through Myc and GC-Rich Sp1 Binding Sites. , 75(12), pp.5559–5566.
- Ortiz-Ortiz, J. et al., 2015. Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virology Journal*, 12(1), p.29.
- Ordóñez, R.M. et al., 2004. Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *Journal of General Virology*, 85(6), pp.1433–1444.
- Ortiz-Sánchez, E. et al., 2016. Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and Human Papilloma Virus co-receptor expression. *Oncotarget*, 7(22). Available at: <http://www.oncotarget.com/abstract/8218>.
- Pedrola, N. et al., 2015. Nidogen 1 and Nuclear Protein 1: novel targets of ETV5 transcription factor involved in endometrial cancer invasion. *Clinical & Experimental Metastasis*, 32(5), pp.467–478. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10585-015-9720-7>.
- Ruiz, J.S., 2012. *Marcadores inmunológicos de la disfunción endotelial y de la aterosclerosis: Control global del riesgo cardiometabólico*, Editorial Díaz de Santos, S.A.
- Scheffner, M. et al., 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63(6), pp.1129–1136.
- Secretaria de salud. Datos publicados el 08 de septiembre de 2015. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>.
- Seedorf, K. et al., 1985. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*, 185, pp.181–185.
- Sharma, R. et al., 2017. Breast cancer metastasis: Putative therapeutic role of vascular cell adhesion molecule-1. *Cellular Oncology*, 40(3), pp.199–208.
- Shieh, M.T. et al., 1992. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J. Cell Biol.*, 116(5), pp.1273–1281.
- Thomas, M. & Banks, L., 2015. PDZRN3/LNX3 is a novel target of human papillomavirus type 16 (HPV-16) and HPV-18 E6. *Journal of virology*, 89(2), pp.1439–44.
- Thorland, E.C. et al., 2003. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene*, 22(8), pp.1225–1237.
- Ulazzi, L. et al., 2007. Nidogen 1 and 2 gene promoters are aberrantly methylated in human

- gastrointestinal cancer. *Molecular cancer*, 6, p.17.
- Van Roy, F. & Berx, G., 2008. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(23), pp.3756–3788.
- Vasudevan, A. et al., 2010. Basement membrane protein nidogen-1 shapes hippocampal synaptic plasticity and excitability. *Hippocampus*, 20(5), pp.608–620.
- Wang, W., Huang, J. & Chen, J., 2011. Angiomotin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), pp.4364–4370.
- Watson, R.A., 2003. Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes. *Journal of Cell Science*, 116(24), pp.4925–4934.
- Wells, C.D. et al., 2006. A Rich1 / Amot Complex Regulates the Cdc42 GTPase and Apical-Polarity Proteins in Epithelial Cells. , 6, pp.535–548.
- Xie, X. et al., 2014. Targeting HPV16 E6-p300 interaction reactivates p53 and inhibits the tumorigenicity of HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 33(8), pp.1037–1046.
- Yamashita, N., Tokunaga, E., Inoue, Y., Tanaka, K., Saeki, H., Oki, E., & Maehara, Y. (2017). Abstract P6-01-17: Epithelial paradox; clinical significance of co-expression of E-cadherin and vimentin in the invasion and the metastasis of breast cancer.
- Zacapala-Gómez, A.E. et al., 2016. Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. *Virology*, 488, pp.187–195. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.11.017>.
- Zhou, Y. et al., 2017. NID1 , a new regulator of EMT required for metastasis and chemoresistance of ovarian cancer cells. , 8(20), pp.33110–33121.

X. Anexos

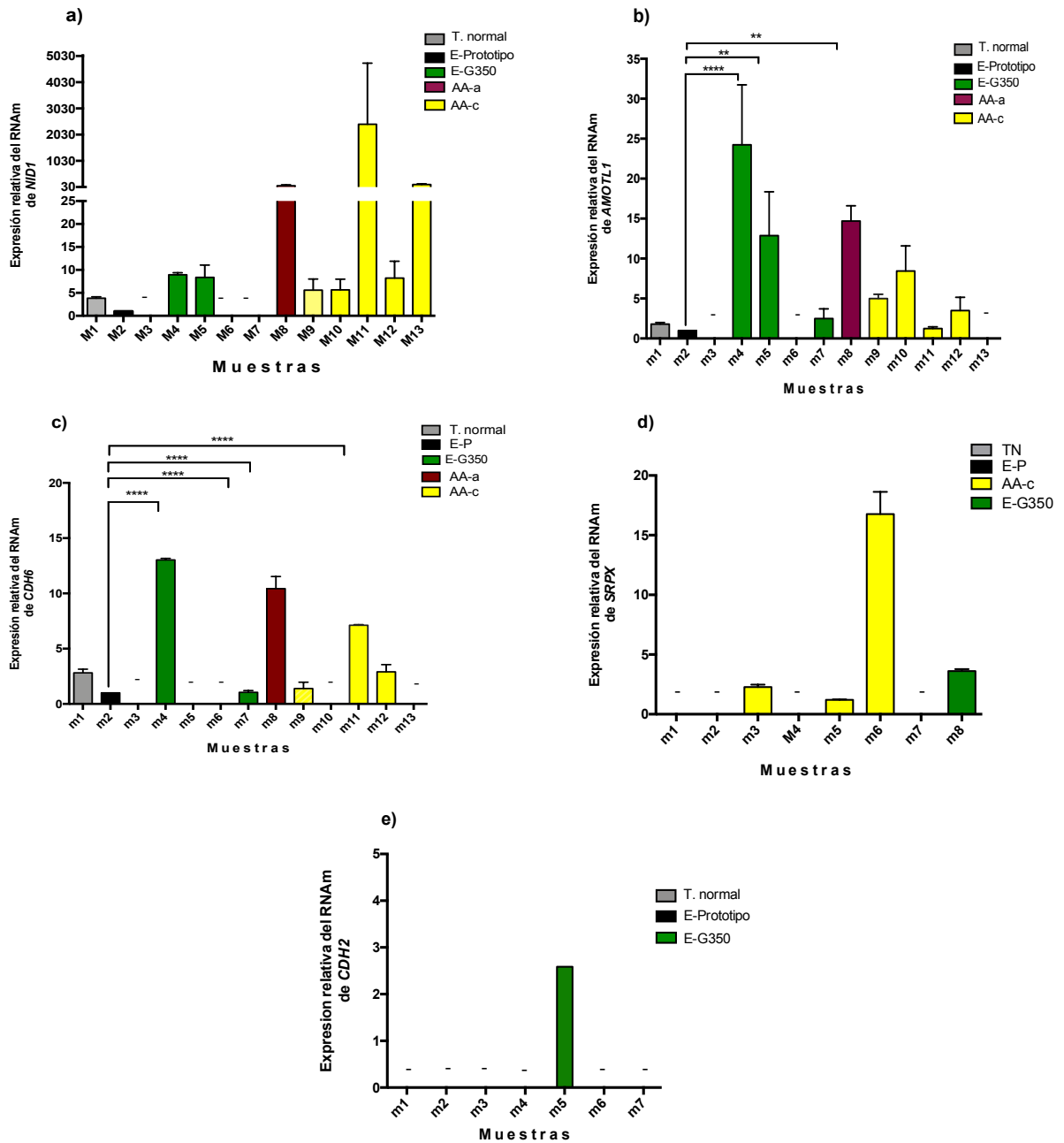


Figura 6. Niveles del RNAm de los genes en muestras individuales con las variantes de la oncoproteína E6 del VPH16. Expresión relativa del de los genes **a) NID1**, **b) AMOTL1**, **c) CDH6**, **d) SRPX** y **e) CDH2** en cada una de las muestras analizadas. En biopsias de tejido normal (n=4)(m1-gris), E-Prototipo (m2-negro), E-G350 (m3-7, verde), AA-a (m8-Rojo), AA-c (m9-m13, amarillo). El guion (-) indica que no se detectó el gen por RT-qPCR.