



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Unidad Académica de Medicina

Unidad de Investigación Especializada en Microbiología

Maestría en Ciencia Biomédicas

“Modulación de la proliferación y supervivencia celular por la oncoproteína E6 de la variante E-G350 del VPH-16 en células HaCaT en respuesta a quimioterapia y radioterapia”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

Q.B.P. Rocío Rodríguez Godínez

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Oscar del Moral Hernández.

COORDIRECTORA:

Dra. Elena Aréchaga Ocampo.

Chilpancingo de los Bravo, Gro., Enero de 2015.

“Modulación de la proliferación y supervivencia celular por la oncoproteína E6 de la variante E-G350 del VPH-16 en células HaCaT en respuesta a quimioterapia y radioterapia”




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

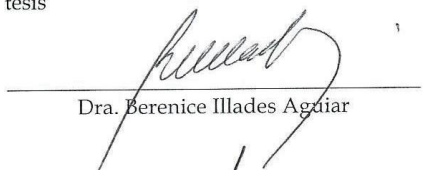
APROBACIÓN DE TESIS


En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 02 días del mes de diciembre de dos mil catorce, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Modulación de la proliferación y supervivencia celular por la oncoproteína E6 de la variante E-G350 del VPH-16 en células HaCaT en respuesta a quimioterapia y radioterapia", presentada por la alumna Rocío Rodríguez Godínez, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dr. Oscar del Moral Hernández
Dirección de tesis


Dra. Elena Aréchaga Ocampo
Codirección de tesis


Dra. Berenice Illades Aguiar


Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero


Dr. Daniel Hernández Sotelo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



UAGro
Unidad Académica de
Ciencias Químico Biológicas

Vo. Bo


Vo. Bo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias
Biomédicas



UAGro
Coordinación del
Posgrado-UACQB

DIRECCIÓN

Dra. Amalia Vences Velázquez
Directora de la Unidad Académica de Ciencias
Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación de Virología y Epigenética del Cáncer y el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad autónoma de Guerrero, así mismo, en el Laboratorio de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (InCan) de la ciudad de México.

Bajo la dirección del: Dr. Oscar del Moral Hernández
Dra. Elena Aréchaga Ocampo

La asesoría de:
Dra. Berenice Illades Aguiar
Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero
Dr. Daniel Hernández Sotelo

Durante el periodo en que curso la Maestría en Ciencias Biomédicas la C. Rocío Rodríguez Godínez recibió beca del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis:

Dr. Oscar del Moral Hernández

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

Gracias por su tiempo brindado y dedicación para la realización de este trabajo. Gracias por depositar su confianza y formar parte de mí formación académica.

A mis sinodales:

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Gracias por sus sugerencias y comentarios durante la revisión de este trabajo. Gracias por su paciencia durante los seminarios.

A mi tutor:

Dr. Donaciano Flores |

Gracias por su apoyo incondicional y sus sabios consejos, durante mi estancia en la Maestría. También por su tiempo para la revisión del trabajo.

A mi profesor de seminario:

Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame.

Gracias por su comprensión y paciencia, durante la estructuración de este trabajo.

A la M en C:

Ana Elvira Zacapala Gómez

Gracias por tu amistad y todo el apoyo brindado, porque estuviste ahí para aclarar mis dudas. Gracias Anita.

Agradezco al Dr. Alejandro García Carranca, la Dra. Miriam Guido y Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez por haber permitido trabajar en su espacio de investigación y proporcionarme el equipo necesario para la parte experimental del trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios

Por el don de la vida, por permitirme estar aquí, por darme a demostrar una vez más cuan inmenso es tu Amor y permitir que todo fuera perfecto. Infinitamente gracias. ♡♡♡

A mi Padres

Alberta Godínez Rodríguez & Félix Rodríguez Navarrete

Por todo su apoyo incondicional, por estar ahí e interesarse de nosotros. Sé que anhelan el bien para cada uno de nosotros, y estoy muy agradecida por todo el esfuerzo que han hecho por sustentar esta hermosa Familia y demostrarnos todo su Amor. Me quedo corta para agradecerles toda esa vida que han compartido conmigo.

A mis hermanos

A Filí, Lucy, Vita, Sonia, Mine, Félix y Samue, por todo el apoyo brindado, por su gran Amor que me mantiene viva. Por sus consejos cuando me veía presionada y Chaparros gracias por su compañía cuando tenía que venir al laboratorio en días festivos, fines de semana y vacaciones.

A mis amigos

A Deysi, Leny, Mariel, Iván, Gabby, Marco y Tere, gracias por motivarme e impulsar para continuar aunque el camino sea duro. Porque la felicidad no necesariamente significa cero sufrimiento.

A mi generación 2012-2014

Jonathan, Gabby, Laura, Ivette, Tere, Aby, Conchis, Abdiel, Marco, Ismene, Nara, Iván, Nadia, Néstor gracias por compartir los buenos y malos momentos en clases.

A los compañeros de laboratorio

A la química Naty, a Chayo, a Josué, al Dr. Migue, al Dr. Julio, a la Dra. Mercedes, a Genaro, Claudio, Irlanda, Hober, Israel, Irving, Sami, Anita, Ismene, Néstor, Giovannii, Massao, Brenda, Damaris, Jazmin, Eliud, Leny, Mariel, Mau, Iván, Heriberto, Verito MB, Verito AV, Erika, Vincent, Grace, Peter, Carmelita, Itzel, Carlos, Mike, Ali, por esos momentos gratos en el laboratorio y hacerme sentir como en casa.

Infinitamente Gracias.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	7
RESULTADOS	10
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	16
REFERENCIAS	20

RESUMEN

Antecedentes. La oncoproteína E6 del virus de papiloma humano de alto riesgo tipo 16 (VPH-16) altera la proliferación celular, la apoptosis y la regulación transcripcional de varios genes a través de la unión con proteínas celulares como E6AP, p53, Bax y caspasa 8. Se ha descrito que E6 puede unirse y degradar a p53 favoreciendo la proliferación celular e inhibiendo la muerte celular. Así mismo, se ha reportado que los cambios estructurales en la oncoproteína E6 de las variantes del VPH-16 son suficientes para regular diferencialmente el crecimiento celular, por lo tanto, en este trabajo se evaluó la proliferación y supervivencia celular en células HaCaT transfectadas con la oncoproteína E6 de la variante E-G350 del VPH-16 en comparación con la variante E-Prototipo (E-P) bajo el tratamiento con cisplatino y radiación ionizante. **Materiales y Métodos.** Las células HaCaT fueron transfectadas establemente con el vector de expresión pEGFP-N1 que contiene el gen E6 de la variante E-G350 y E-P del VPH-16. Las células transfectadas establemente fueron tratadas con cisplatino durante 24, 48 y 72 horas (hrs) y con diferentes dosis de rayos X. La proliferación se determinó por ensayos con MTT y la supervivencia celular fue evaluada por ensayos clonogénicos. La diferencia de las medias entre los grupos se determinó por la prueba de ANOVA considerando un valor de $p < 0.05$ como significativo. **Resultados.** Después del tratamiento con $10\mu\text{M}$ de cisplatino por 24hrs la proliferación celular disminuyó en un 29% en las células con la variante E-G350 con respecto a su control, mientras que en las E-P fue del 39%. El ensayo clonogénico reveló que las células que expresan E6 de la variante E-G350 fueron más sensibles a la radiación ($\text{FS}=0.67$ a 2 Gy) que las células con la variante prototipo de E6 ($\text{FS}=0.81$ a 2 Gy). **Conclusiones.** Las células que expresan la variante E-G350 de E6 del VPH-16 presentan una mayor resistencia a agentes quimioterapéuticos como el cisplatino pero muestran una mayor sensibilidad a la radioterapia comparada con las células que expresan la variante E-P.

Palabras clave: Proliferación, supervivencia, quimioterapia, radioterapia, cáncer cervical, variantes VPH.

ABSTRACT

Background. E6 oncoprotein of HPV-16 alters cell proliferation, apoptosis, and the transcriptional regulation of several genes by binding to cellular proteins as E6AP, p53, Bax and caspase-8. Have been reported to E6 can bind and degrade p53 promoting cell proliferation and inhibiting cell death. Also, it has been reported that structural changes in the E6 oncoprotein of the variants of HPV-16 are sufficient to differentially regulate cell growth, therefore, in this work cell proliferation and survival in cells was evaluated in HaCaT cells transfected with the oncoprotein E6 variant E-G350 HPV-16 compared to the E-Prototype (E-P) variant under treatment with cisplatin and ionizing radiation. **Materials and Methods.** HaCaT cells were stably transfected with the expression vector pEGFP-N1 containing the E6 gene of variant E-G350 and E-P HPV-16. Cells were treated with cisplatin for 24, 48 and 72 hours (h), and doses of X-ray. Proliferation of cisplatin-treated cells was determined by testing MTT and cell survival post-irradiation was assessed by clonogenic assays. The mean difference between groups were determined by ANOVA considering a value of $p < 0.05$ as significant. **Results.** After treatment with cisplatin $10\mu\text{M}$ by 24hrs cell proliferation was decreased only by 29% in cells expressing variant E-G350 with respect to control, while in E-P was 39%. Clonogenic assay revealed that cells expressing E6 variant prototype E-G350 were more sensitivities to radiation (SF = 0.67 to 2 Gy) that the prototype E6 (SF = 0.81 to 2 Gy) variant cells. **Conclusions.** Cells expressing the E-G350 HPV-16 E6 variant have an increased resistance to chemotherapeutic agents as cisplatin but they are more sensitive to radiotherapy compared to cells expressing E-P variant.

Keywords: Proliferation, survival, chemotherapy, radiotherapy, cervical cancer, HPV variants.

INTRODUCCIÓN

La oncoproteína E6 del virus de papiloma humano de alto riesgo tipo 16 (VPH-AR 16) tiene 151 aminoácidos, en su estructura presenta dos dedos de zinc con dominio C-X-X-C altamente conservados implicados en su función oncogénica (Münger *et al.*, 2004; Wise-Draper & Wells, 2008). La oncoproteína E6 de VPH-AR se une a proteínas como p53, Bax, E6AP, Paxilina, TNFR1, caspasa 8, hDlg, p300/CBP, hTERT y otros blancos celulares, permitiendo de esta forma alterar la proliferación celular, interrumpir o inhibir la apoptosis, regular la transcripción viral, abatir la diferenciación celular, alterar las interacciones célula-célula e incrementar la inestabilidad cromosómica (Lizano *et al.*, 2009; Moody & Laimins, 2010). La función transformante de E6 del VPH-AR involucra la degradación del supresor de tumor p53 por asociación con la ubiquitin ligasa E6AP. La inactivación de p53 por E6 conduce a la alteración de la apoptosis, arresto del ciclo celular, senescencia y diferenciación celular. E6 también se une directamente a p53 en el citoplasma secuestrándolo e impidiendo su translocación al núcleo, suprimiendo la transcripción de genes blancos como p21, BAX, PUMA, NOXA; GADD45 y PCNA (Mantovani y Banks 2001; Vaeteewoottacharn *et al.*, 2005; Joerger & Fersht, 2008).

E6 suele afectar la proliferación celular activando la telomerasa, esta es una ribonucleoproteína con función enzimática, importante para el mantenimiento de las estructuras teloméricas contenidas al final de los cromosomas. La actividad de la subunidad catalítica de la transcriptasa reversa de la telomerasa (hTERT), se presenta en más del 90% de las células inmortalizadas y cancerosas, pero está ausente en las células somáticas normales. La oncoproteína E6, es capaz de inducir la transcripción y la activación de hTERT, por un mecanismo que aún no ha sido completamente dilucidado, pero se ha propuesto esta mediado por la degradación de NEX1-91 (represor del promotor de hTERT), la cual es inducida por E6 al unirse con la proteína E6AP (Gewin *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008; Ganguly y Parihar, 2009).

Mediante el análisis de la secuencia del gen E6 de VPH-16 se han establecido variantes que difieren en menos del 2% en la secuencia de ADN, agrupándolas en 6 ramas filogenéticas de acuerdo a su distribución geográfica y en función de cambios

de nucleótidos clave: Europea (E), Asiática (As), Asiática-Americana (AA), Africana-1 (Af-1), Africana-2 (Af-2) y Norte-Americana-1 (NA-1) (Yamada *et al.*, 1997, Huertas-Salgado, *et al.*, 2011).

En México se han realizado algunos estudios epidemiológicos sobre variantes de VPH-16, Berumen *et al.*, (2001) realizaron un estudio de 181 casos de mujeres con cáncer y 181 controles, encontrando con mayor frecuencia la variante E-G350 (23.8%), seguida de la AA (23.2%). Illades-Aguiar *et al.*, (2010) en un estudio realizado en el estado de Guerrero encontraron con más frecuencia la variante Europea-Prototipo en muestras con cáncer cervical invasivo 66.6% seguido por las variantes AA 33.4%. Recientemente en un estudio realizado por Ortiz-Ortiz, *et al.*, (2015) estableció la distribución de las variantes de E6 del VPH-16 en lesiones escamosas intraepiteliales y en cáncer cervical, encontrando la variante E-G350 más frecuente en lesiones de bajo grado (45.5%) y en cáncer cervical (36.8%).

Respecto al potencial oncogénico que presentan las variaciones intratípicas del VPH16, se ha reportado que la variante E-G350 muestra un factor de riesgo adicional para la persistencia de la infección y progresión citológica de NIC 2/3 a carcinoma de células escamosas (Zehbe *et al.*, 1998; Xi, L.F., *et al.*, 2007). Así mismo se ha documentado que dicha variante favorece la vía de señalización de las MAPK y regula diferencialmente la tumorigenesis por la vía de Notch (Chakrabarti *et al.*, 2004). Es importante señalar que la variante E-G350 presenta un cambio de nucleótido de timina por guanina en la posición 350 con respecto a la variante E-P, mientras que en la proteína genera un cambio de aminoácido de leucina por valina en la posición 83 (LV83), lo cual puede estar favoreciendo su potencial oncogénico.

Zehbe *et al.*, (2009) reportaron que las variantes de E6 del VPH-16 (Prototipo, L83V, R10V/L83V y Q14H/H78Y/L83V) presenta diferente potencial oncogénico. Cuando se midieron los niveles de apoptosis la variante Prototipo y L83V mostró una resistencia a la apoptosis respecto al control de transfección, mientras que en las variantes R10V/L83V y Q14H/H78Y/L83V la apoptosis por anoikis se vio favorecida en un 50%.

El tratamiento de primera línea en las etapas localmente avanzadas (IB2-IIA2-IVA FIGO) del cáncer cervical es la quimio-radioterapia concomitante (Montalvo, E G., *et al.*, 2011). El cisplatino es el principal fármaco anticancerígeno usado en la quimioterapia, el cual induce arresto del ciclo celular y apoptosis en las células tumorales. Por otra parte la radioterapia consiste en el uso de radiación ionizante (rayos X) para destruir las células cancerosas y por ende disminuir el tamaño del tumor (Sakamoto-Hojo, E. T., *et al.*, 2005). Sin embargo, el daño originado por la radiación ionizante en las células cancerosas puede ser reparado por recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ), contribuyendo de esta forma a la radio-resistencia (Hefferin & Tomkinson, 2005).

En un estudio *in vitro* realizado por Liu, *et al.*, (2008) en la línea celular HeLa encontraron que el cisplatino induce apoptosis de manera dependiente de la dosis y del tiempo de exposición a la droga, así mismo reportaron una disminución en la expresión de E6 y la restauración de la función de p53, p21 y Bax.

Cetina, L. *et al.*, en el 2006 reportaron que en una población de 294 pacientes con cáncer cervical que recibieron radiación y cisplatino, 243 (83%) de los pacientes respondió completamente al tratamiento, mientras que en 51(17%) pacientes se observó una resistencia al tratamiento; sugiriendo que aun después del tratamiento las células tumorales sobreviven y continúan proliferando. En otros estudios se ha reportado un aumento de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), en los procesos de resistencia a apoptosis por tratamiento con cisplatino. Así mismo se demostró que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16 regulan la expresión del gen c-IAP2 vía NF-kB, confiriendo resistencia a la apoptosis (James, MA., *et al.*, 2006).

Por otro lado, Hampson, L., *et al.*, 2001, reportaron que niveles altos de expresión de E6 facilitan la expresión de la proteína ERCC1 implicada en la reparación por unión de extremos no homólogos, en condiciones de hipoxia favoreciendo de esta manera la radioresistencia. El tratamiento combinado de quimio-radioterapia o por separado es la modalidad estándar y más efectiva para la terapia en pacientes con cáncer cervical. No obstante se ha reportado que las pacientes de cáncer cervical que presentan un tipo de VPH-16, muestran una resistencia al tratamiento de

quimioterapia y radioterapia en comparación con otro tipo viral, así mismo suponemos que la resistencia de los tumores también pudiera deberse a la presencia de las variantes de VPH-16 en el tumor. En este trabajo pretendemos evaluar el efecto citotóxico del cisplatino y los rayos X sobre la proliferación y supervivencia celular en células HaCaT transfectadas con E6 VPH-16 de la variante E-G350, con lo cual se contribuirá a conocer alguno de los mecanismos por los cuales esta variante es mas oncogénica y sugerir una posible explicación a la resistencia a la quimio-radioterapia en los tumores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

La línea celular HaCaT (queratinocitos inmortalizados no tumorigénicos) fue cultivada en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina. Los cultivos se incubaron a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂. Las células transfectadas con el plásmido p-EGFP-N1 (acceso GenBank #U55762) (figura 1), con la secuencia clonada de E6 VPH-16 E-G350 y E-P fueron cultivadas bajo las mismas condiciones más 5mg/ml del antibiótico de selección G418. Como control de transfección se utilizaron células HaCaT transfectadas solo con el plásmido p-EGFP-N1 (Mock).

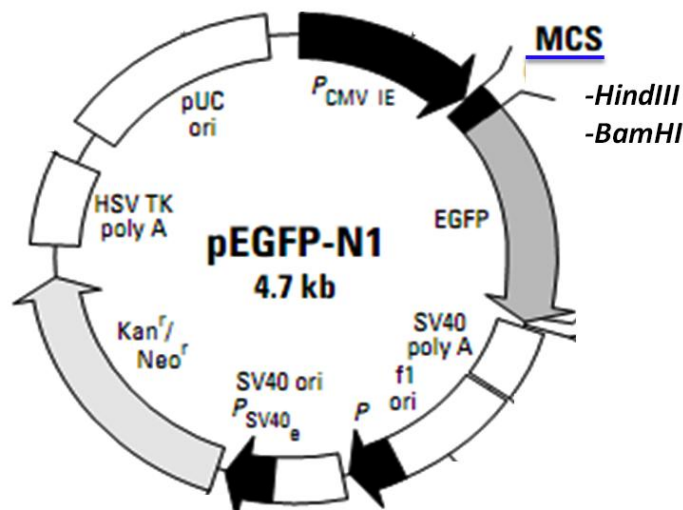


Figura 1. Mapa del vector pEGFP-N1. En el sitio de restricción múltiple (MCS) fue clonado el gen E6 del VPH-16 variante E-P y EG350. Se cortó con las enzimas HindIII y BamHI.

Ensayos de proliferación con MTT

5,000 células fueron sembradas en placas de 96 pozos, se incubaron toda la noche y al día siguiente se agregó el tratamiento con cisplatino (**ZURIDRY**), el cual fue diluido en medio DMEM a una concentración final de 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 μ M, las placas se incubaron durante 24, 48 y 72hrs a 37°C en un ambiente con 5% de dióxido de carbono (CO₂). Posteriormente, se evaluó la proliferación por ensayo MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, Sigma]. Para este

ensayo 5 miligramos (mg) de MTT fue diluido en 1ml de PBS1X estéril y posteriormente se realizó una dilución 1:10 en DMEM basal, el cual fue añadido a cada pozo. Las células se incubaron por 4 hrs y se añadió dimetil-sulfoxido (DMSO, Sigma) para solubilizar los cristales de formazán. La densidad óptica (DO) de cada pozo fue leída a 570 nm en el espectrofotómetro de microplacas Epoch™ (Biotek) El porcentaje de proliferación fue calculado con la siguiente fórmula: (DO de grupo tx/DO grupo ctrl) x 100 (Mosmann, T., 1983).

Ensayo clonogénico

Para determinar la concentración inhibitoria 50 (IC50) de radiación se sembraron 1×10^6 células en frascos de cultivo de 25 cm^2 , se incubaron toda la noche y al día siguiente fueron radiadas con 2, 4, 6, y 8 Gy de rayos X en el acelerador lineal Varian 600C (6 MV), usando un campo de $10 \times 10 \text{ cm}$; como control se utilizaron cultivos de células no irradiadas. Después de la radiación se añadió medio DMEM nuevo y se incubaron por 24 hrs a 37°C . Posteriormente, las células irradiadas y no irradiadas (0 Gy) fueron tripsinizadas. Mediante la técnica con azul de tripano se determinó la viabilidad celular y a partir del conteo de las células irradiadas se sembraron 2,000 células viables por pozo en placas de 6 pozos y de su contraparte sin tratamiento. Después de 15 días de incubación en medio de cultivo completo las colonias formadas fueron fijadas con metanol-ácido acético 7:1 v/v y teñidas con cristal de violeta al 1%. Las colonias con 50 células o más se consideraron como sobrevivientes clonogénicos. La fracción de supervivencia se calculó con la normalización de la eficiencia de la formación de colonias de las células control (sin radiación). A partir del conteo de colonias de cada pozo se calculó la fracción de supervivencia con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de plaqueo (EP)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colonias formadas}}{\text{n}^\circ \text{ de células sembradas}} \times 100$$

$$\text{Fracción de supervivencia (FS)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colonias formadas}}{\text{n}^\circ \text{ de células sembradas}} \times \text{EP}$$

Donde FS es la fracción sobreviviente, es decir, el número de colonias que crecen después del tratamiento de las células (Franken, N.A.D., *et al.*, 2006).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico STATA versión 12.0. Los valores de los grupos se representan como media \pm desviaciones estándar, para la comparación de las diferencias entre los grupos se utilizó la prueba de ANOVA, considerando un valor de $p < 0.05$ como significativo.

RESULTADOS

Efecto del cisplatino sobre la proliferación celular

Para evaluar la capacidad anti-proliferativa del cisplatino sobre las células HaCaT se realizaron ensayos MTT. Las células HaCaT fueron tratadas con diferentes concentraciones de cisplatino por 24, 48 y 72hrs. Como se observa en la figura 2 A) la disminución de la proliferación celular después del tratamiento con cisplatino es dependiente de la dosis y el tiempo de exposición del cisplatino. Se determinó la IC50 obteniendo un 49% de proliferación celular a 24hrs, 23% a 48hrs y 10% a 72hrs en las células tratadas con 10 μ M de cisplatino con respecto al control no tratado.

Posteriormente se realizaron ensayos MTT bajo las mismas condiciones en las células HaCaT transfectadas solo con el vector (Mock), para verificar el efecto del cisplatino sobre el crecimiento celular y descartar un efecto de la transfección del vector. En este experimento se observó que el comportamiento de la curva dosis-respuesta curso-temporal es similar a las HaCaT sin transfectar. El porcentaje de proliferación celular a 10 μ M fue de 57% a 24hrs, 21% a 48hrs y 14% a 72hrs (figura 2 B).

Con base a los resultados se decidió realizar los ensayos de proliferación en las células transfectadas con el gen E6 del VPH-16 de la variante E-P y la variante E-G350 utilizando solo la IC50 (10 μ M) del cisplatino determinada previamente. En las células E-P se observó una proliferación del 61%, 13% y 9% a 24, 48 y 72hrs respectivamente, observando en las primeras 24hrs una inhibición del crecimiento celular del 40%, sin embargo, a 48 y 72 hrs hubo una significativa citotoxicidad (figura 3 A).

De manera interesante, en las células transfectadas con la variante E-G350 E6 VPH-16, la proliferación fue de 71%, 47%, 28% a 24, 48 y 72 hrs respectivamente con 10 μ M de cisplatino. Indicando que las células E-G350 requieren de una dosis mayor de cisplatino para lograr inhibir la población celular a un 50%, en comparación con la variante E-P. Estos resultados sugieren que la presencia del oncogén E6 en estas

células aumenta la capacidad de proliferar aun cuando son expuestas a un agente anti-proliferativo como el cisplatino (figura 3 B).

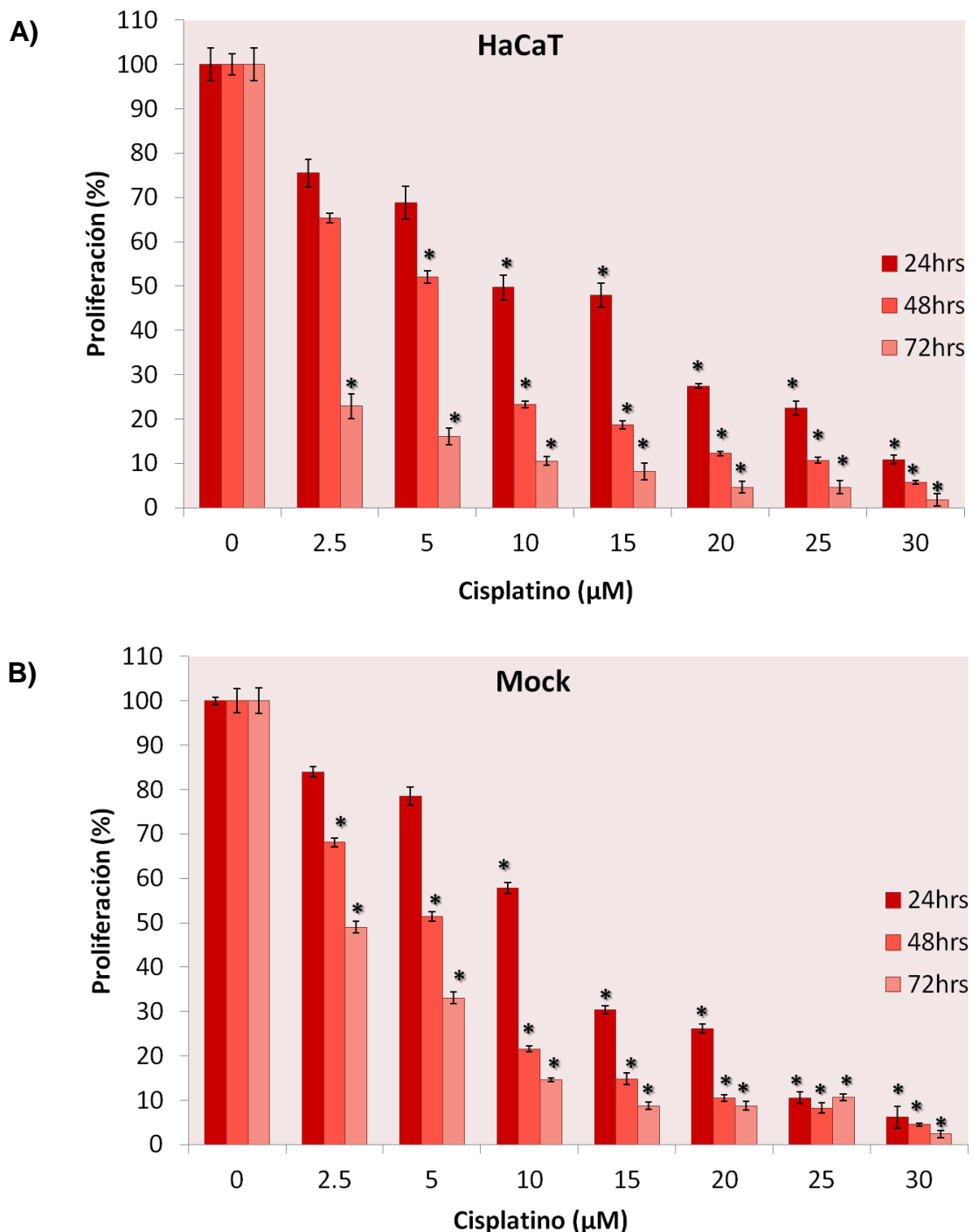
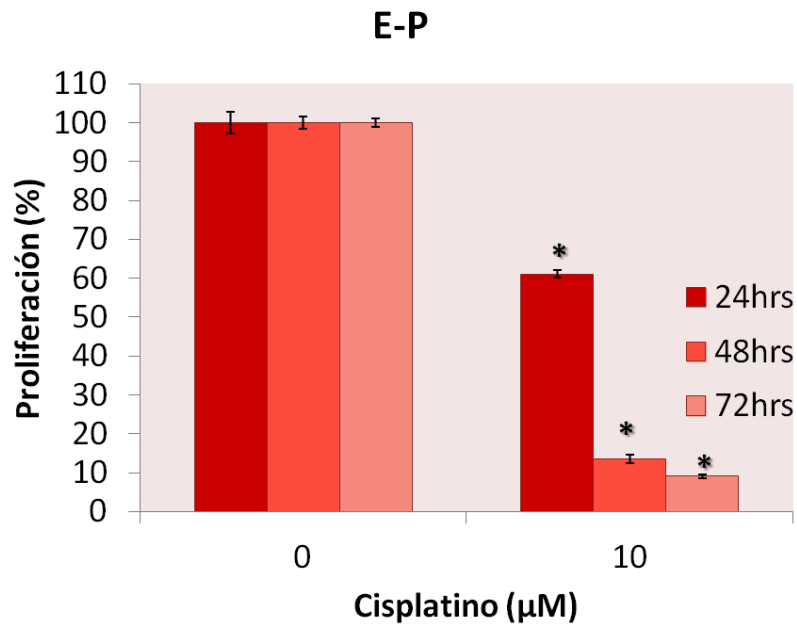


Figura 2. Efecto del cisplatino sobre la proliferación en células HaCaT. A) y B) Curva de crecimiento de las células HaCaT y las transfectadas solo con el plásmido pEGFP-N1, expuestas a diferentes concentraciones de cisplatino durante 24, 48 y 72hrs determinado por ensayo MTT. La IC50 de cisplatino a 24hrs es 10 μM en las HaCaT. Se muestra la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm desviación estándar. * $p < 0.05$

A)



B)

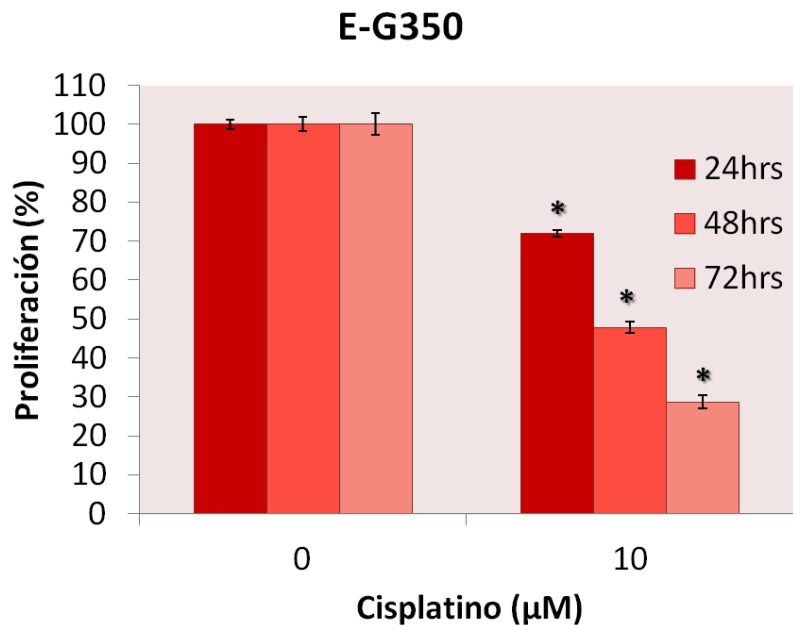


Figura 3. Efecto del cisplatino sobre la proliferación en las células transfectadas con E6 del VPH16. A) En las células transfectadas con la variante E-P E6 VPH-16 a 24hrs con 10 μM del quimioterapéutico hay una proliferación del 61%, mientras que a 48 y 72 hrs notoriamente hay una disminución de la población. **B)** En las transfectadas con la variante E-G350 E6 VPH-16, a una concentración de 10 μM existe un aumento en la proliferación celular del 21% y del 10% respecto a las HaCaT y la E-P. Se muestra la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm desviación estándar. * $p < 0.05$

Efecto de la radiación sobre la supervivencia celular

La supervivencia o clonogenicidad post-irradiación fue evaluada mediante ensayos clonogénicos. Los cultivos celulares fueron expuestos a 2, 4, 6, y 8 Gy de radiación. La fracción de supervivencia de las células HaCaT y Mock disminuyó al aumentar la dosis de radiación. El comportamiento de la curva de supervivencia demuestra que estas células son sensibles a la radiación (figura 4). No obstante, a 6 y 8 Gy de radiación el crecimiento de colonias fue escaso y por ello; para los ensayos clonogénicos con las células transfectadas decidimos usar 2 y 4 Gy de radiación, para realizar las comparaciones de la fracción de supervivencia se tomó como IC50 2 Gy (FS=0.59 en las HaCaT sin transfectar) (figura 4).

El ensayo clonogénico de las células transfectadas con la variante E-P y E-G350 de E6, reveló que la supervivencia de las células irradiadas disminuyó considerablemente cuando fueron irradiadas con 4 Gy dándonos un valor de la FS de 0.2 y 0.1 respectivamente. No obstante cuando la dosis de radiación aplicada fue de 2Gy en las E-P hubo más sobrevivientes clonogénicos (FS=0.81) que en las células E-G350 (FS=0.67), sin embargo, cuando analizamos de manera conjunta las curvas de las células transfectadas, las HaCaT y el control de transfección, podemos ver que tanto las HaCaT como las Mock que no tiene E6 se comportan de manera similar mientras que las transfectadas con las variantes de E6 siguen otro comportamiento, aumentando la sensibilidad a 4 Gy de rayos X (Figura 5).

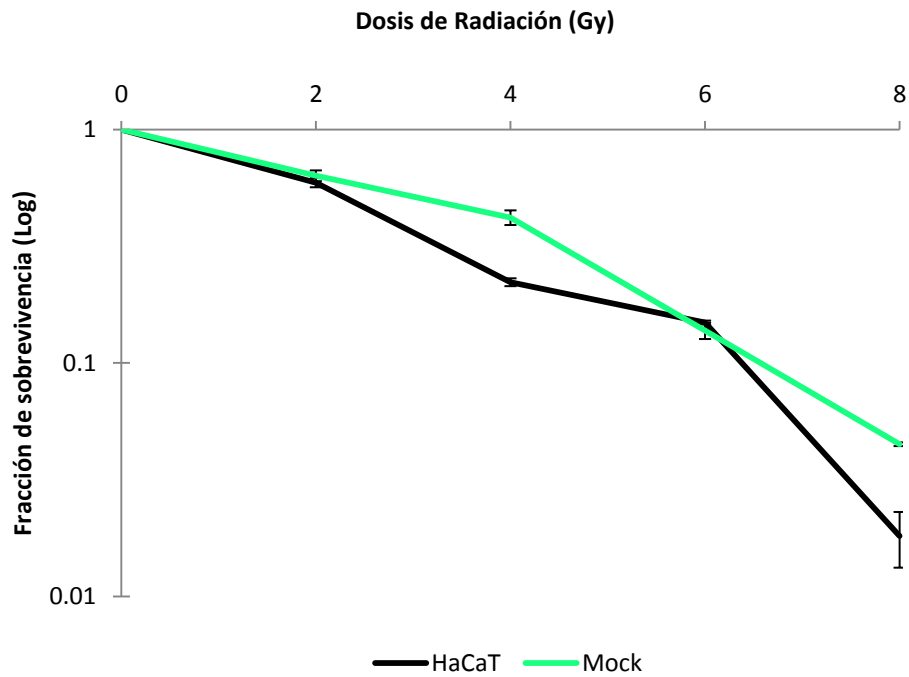


Figura 4. Curva de supervivencia. El efecto de la radioterapia sobre las células HaCaT y Mock es notorio debido a que disminuye la fracción de supervivencia al aumentar la radiación y disminuye la capacidad de formar colonias en la caja. La SF para las HaCaT fue de 0.59 a 2 Gy, 0.01 a 8Gy, para las mock fue 0.63 y 0.04 respectivamente. Se muestra la media de la fracción de supervivencia \pm la desviación estandar de un experimento representativo

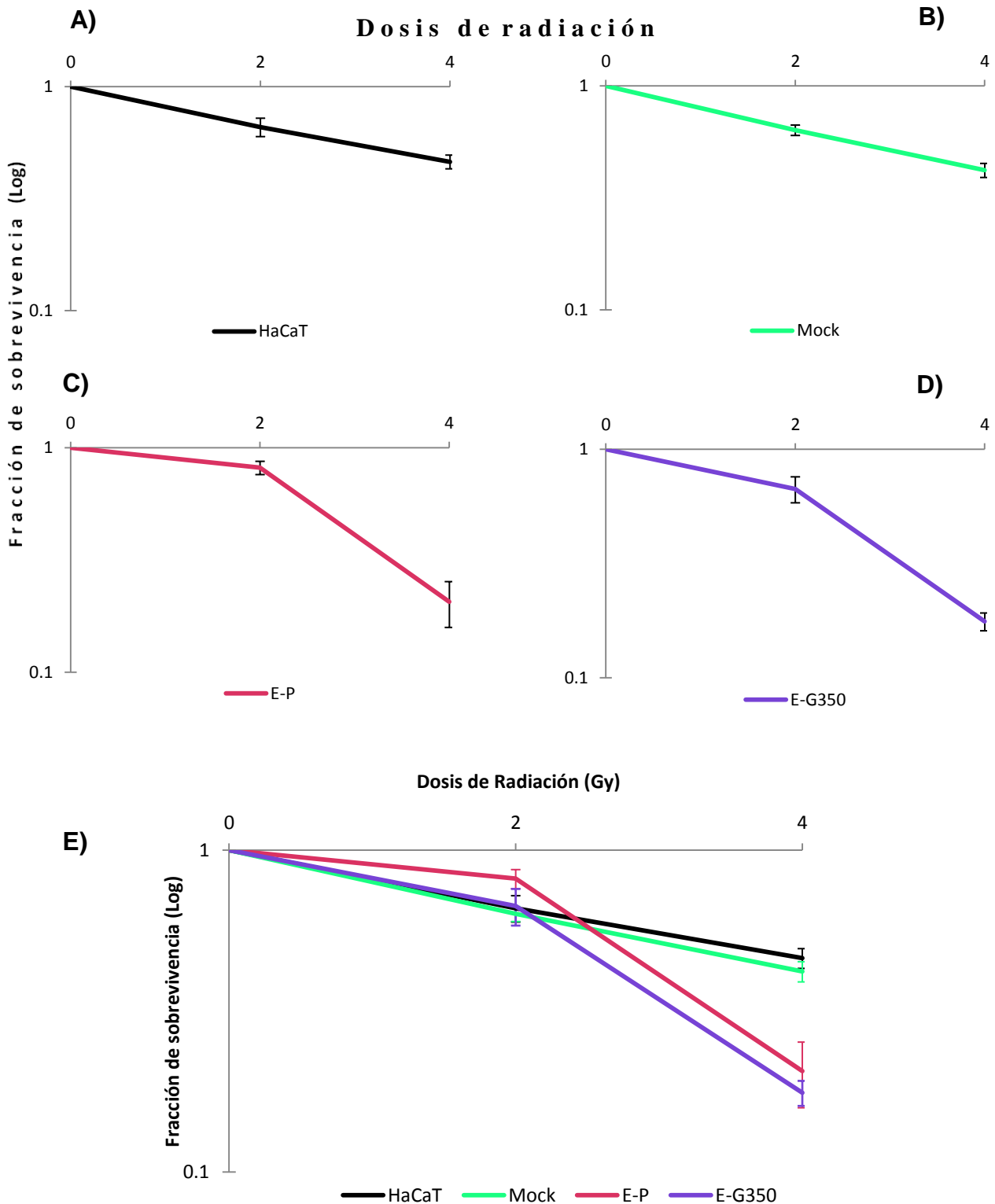


Figura 5. Determinación de la supervivencia celular. A), B), C) y D) Se observan las curvas de los ensayos clonogenicos de las HaCaT, Mock, E-P, E-G350, con 2 y 4 Gy de radiación respectivamente. E) Se representan de manera conjunta todas las de los paneles anteriores. Las E-G350 son más radiosensibles que las E-P; tal vez por la presencia de la variante de E6, mientras que las células sin presencia de E6 exhiben una radioresistencia a 4 Gy. Se muestran las medias de la fracción de supervivencia \pm la desviación estandar de un experimento representativo.

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

En este estudio determinamos el papel de la oncoproteína E6 de las variantes E-P y E-G350 del E6 VPH-16, en la proliferación y supervivencia celular en respuesta a quimioterapia y radioterapia. Cabe destacar que estas variantes de E6 usadas en el estudio fueron aisladas a partir de lesiones escamosas intraepiteliales de pacientes guerrerenses.

Se ha reportado ampliamente que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-AR están implicadas en el desarrollo de carcinoma cervical. E6 interacciona principalmente con p53 e induce su degradación en el proteasoma vía ubiquitinación. La proteína p53 es muy importante para la célula ya que se activa cuando existe daño al ADN y envía señales para activar los mecanismos de reparación e inducir a las células a arresto celular o si el daño es irreparable inducir apoptosis (Münger *et al.*, 2004; Joerger y Fersht, 2008).

En este estudio, los cuatro grupos de células (HaCaT, Mock, E-P y E-G350) fueron expuestas con cisplatino y rayos x, ambos agentes antitumorales que generan daño en el ADN, conduciendo finalmente a muerte celular. Cuando se midió la proliferación celular posterior al tratamiento con cisplatino (10µM por 24 hrs), las células transfectadas con el oncogén E6 de la variante E-P del VPH-16 aumentan la proliferación celular 4% con respecto al control de transfección, sin embargo cuando el tratamiento se prolongó por 48 y 72hrs se encontró cerca del 90% de citotoxicidad. Esto pudiera deberse de acuerdo a lo reportado por Liu *et al.*, (2008) a que el cisplatino suprime los niveles de E6 y por otra parte restaura los niveles de p53, favoreciendo la apoptosis. No obstante, con la variante E-G350 de E6 del VPH-16 que solo presenta un cambio de nucleótido de timina por guanina en la posición 350 respecto a la variante E-P, la proliferación se vio favorecida en un 22% y 13% en comparación con las HaCaT y Mock a 24hrs post-tratamiento con cisplatino. Sugiriendo una resistencia al tratamiento con cisplatino, lo cual, puede explicarse por el cambio de aminoácido de leucina por valina en la posición 83 de la oncoproteína E6. Se ha reportado que este solo cambio de L83V favorece la vía de señalización de las MAPK y regula diferencialmente la tumorigenesis por la vía de *Notch*

(Chakrabarti *et al.*, 2004). Además esto pudiera explicarse por la degradación que sufre p53 inducida por E6. Sabemos que el cisplatino induce daño al ADN, debido a que se intercala en las bases nitrogenadas generando aductos en el ADN y en algunas proteínas. Ante este panorama se activa p53 enviando señales para que ocurra la reparación del ADN y si el daño es irreparable las células se envían a apoptosis por la vía intrínseca (Sakamoto-Hojo, E. T., *et al.*, 2005; Wise-Draper y Wells, 2008). Sin embargo, por la presencia de la variante E-G350 de E6 del VPH-16 podemos inferir que hay una degradación o disminución de p53, por lo tanto no existe una respuesta al daño en el ADN originado por el cisplatino y las células continúan proliferando.

En cuanto a la supervivencia celular determinada por ensayos clonogénicos observamos que las células transfectadas con el oncogén E6 de la variante E-P del VPH-16 radiadas con 2 Gy tuvieron la capacidad de formar colonias a partir de una clona, lo que representa el 80% de supervivencia (FS=0.8), no fue así con 4Gy ya que hubo un 20% (FS=0.2) de sobrevivientes clonogénicos. Por lo tanto, en estas células que expresan la oncoproteína E6 de la variante Prototipo podemos inferir que a 2 Gy existe una resistencia a la radioterapia. Esta observación es importante porque la dosis clínica de radioterapia para cáncer cervical es de 2 Gy. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Ferdousi *et al.*, (2010) en una población de pacientes con cáncer cervical, en la cual reportó una respuesta pobre a la radioterapia en las pacientes que presentaban VHP-16. Por otro lado, en cultivos de células HeLa (VPH-18) estimuladas con 2.0 μ M de artemisina (agente antimalarico) por 24hrs previo a la radiación, se observó un incremento en la radiosensibilidad (disminución de supervivientes clonogénicos) en comparación con la radiación sola; en tanto que en la línea celular SiHa (VPH-16) aun después del tratamiento combinado (artemisina 2.5 μ M + 2, 4 y 6 Gy de radiación), se observó una radioresistencia, lo cual se relacionó con una disminución en la apoptosis(14.35% a 2 Gy y 33.67% a 6 Gy) (Lou *et al.*, 2014).

En base a los resultados obtenidos con el cisplatino en las células con la variante E-G350 del VPH-16, suponíamos que también serían resistentes a la radiación, sin

embargo, sorprendentemente las células fueron sensibles a los rayos X, ya que a 2 Gy los sobrevivientes clonogénicos fueron del 67%(FS=0.67) y a 4 Gy del 17%(FS=0.17), comportándose de manera similar a las HaCaT y las tranfectadas solo con el vector (Mock), lo que pudiera sugerir que la variante E-G350 (L83V) de E6 del VPH-16 no está implicada en la radioresistencia bajo estas condiciones experimentales. En contraste a estos resultados Sichero *et al.*, en el 2012 reportaron que los cultivos primarios de queratinocitos transfectados con la variante E-G350 de E6 tenían la capacidad de sobrevivir hasta 30 pases y así mismo formar colonias, en comparación a los cultivos primarios parenterales y los transfectados con solo el vector (pLXSN). Por otro lado, se ha reportado que la expresión de la oncoproteína E6 del VPH-16 puede regular la respuesta a la radioterapia mediante la inactivación inapropiada de los mecanismos de reparación del ADN (Hampson, L., *et al.*, 2001).

De manera preliminar evaluamos los niveles de apoptosis en la variante E-P post-tratamiento con cisplatino (10 μ M por 24hrs) por citometria de flujo empleando la técnica de Anexina V, encontrando que la mayoría de la población (27%) tuvo la marca Anexina-/IP+ (necrosis), el 16% se marcó como Anexina+/IP+ (apoptosis tardía) y un 6% se tiñó con Anexina+/IP- (apoptosis tardía) (datos no mostrados). Por lo cual suponemos que gran parte de las células que se mueren después del tratamiento con cisplatino se mueren por apoptosis y que esta pudiera variar dependiendo de la variante del VPH-16 que se exprese en la células infectadas.

En conclusión, las células HaCaT que expresan la oncoproteína E6 de la variante E-G350 del VPH16 son más resistentes al tratamiento con cisplatino que las células que expresan la oncoproteína E6 de la variante E-P. Estos resultados apoyan la evidencia epidemiológica reportada en nuestra población, donde la variante E-G350 del VPH16 se encuentra con mayor frecuencia en casos de cáncer (Ortiz-Ortiz, *et al.*, 2015). Por otro lado, la resistencia y sensibilidad a la radiación en las células E-P y E-G350 respectivamente, se atribuye por la presencia de la variante de E6 del VPH-16. Lo que nos lleva a confirmar una vez más que las variantes presentan diferente potencial oncogénico y es por ello que sugerimos que el tratamiento de quimio y

radioterapia en las pacientes con cáncer cervical debe ser personalizado, tomando en cuenta la variante de E6 del VPH-16 presente en el tumor.

Perspectivas:

Con estos resultados mostramos que existe una capacidad de las células por proliferar aun después de haber recibido un agente antitumoral, lo cual nos indica una resistencia a la muerte celular, por ello, es importante determinar la muerte celular por apoptosis.

REFERENCIAS

- Berumen, J., Ordoñez, R. M., Lazcano, E., Salmerón, J., Galván, S. C., Estrada, R. A., et al.,** (2001). Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(17), 1325-1330.
- Cetina, L., Rivera, L., Hinojosa, J., Poitevin, A., Uribe, J., López-Graniel, C., et al.,** (2006). Routine management of locally advanced cervical cancer with concurrent radiation and cisplatin. Five-year results. *BMC Women's Health*, 6(3), 1-17.
- Chakrabarti, O., Veeraraghavalu, K., Tergaonkar, V., Liu, Y., Androphy, E. J., Stanley, M. A., et al.,** (2004). Human Papillomavirus Type 16 E6 Amino Acid 83 Variants Enhance E6-Mediated MAPK Signaling and Differentially Regulate Tumorigenesis by Notch Signaling and Oncogenic Ras. *Journal of Virology*, 78(11), 5934-5945.
- Ferdousi, J., Nagai, Y., Asato, T., Hirakawa, M., Inamine, M., Kudaka, W., et al.,** (2010). Impact of human papillomavirus genotype on response to treatment and survival in patients receiving radiotherapy for squamous cell carcinoma of the cervix. *Experimental and therapeutic medicine*, 1, 525-530.
- Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C.,** (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315-2319.
- Ganguly, N., and Parihar, P.** (2009). Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis, *J. Biosc*, 34(1), 113–123.
- Gewin, L., Myers, H., Kiyono, T., Galloway, D. A.,** (2004). Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev*, 18, 2269–2282.
- Hampson, L., Abd, E.E., Moore, J.V., Kitchener, H., Hampson, I. N.,** (2001). The HPV16 E6 and E7 proteins and the radiation resistance of cervical carcinoma. *The FASEB Journal*, 15(8), 1445-1447.
- Hefferin, M.L., & Tomkinson, A.E.,** (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA repair (Amst)*, 4(6), 639-648.
- Huertas-Salgado, A., Martín-Gámez, D.C., Moreno, P., Murilo, R., Bravo, M.M., Villa, L. et al.,** (2011). E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: An updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology*, 410, 201–215.
- Illades-Aguiar, B., Alarcón-Romero, I., Antonio-Véjar, V., Zamudio-López, N., Sales-Linares, N., Flores-Alfaro, E., 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), 291-296.
- James, M.A., Lee, J.H., Klingelutz, A.J.,** (2006). Human papillomavirus type 16 E6 activates NF- κ B, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *J Virol*, 80, 5301–5307.
- Joerger, C.A., & Fersht, R.A.,** (2008). Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. *The Annual Review of Biochemistry*, 77, 557–582.
- Lou, J., Zhu, W., Tang, Y., Cao, H., Zhou, Y., Ji, R., et al.,** (2014). Artemisinin derivative artesunate induces radiosensitivity in cervical cancer cells in vitro and in vivo. *Radiation Oncology*, 9(84),1-12.

- Liu, Y., Xing, H., Han, X., Shi, X., Liang, F., Cheng, G., *et al.*, (2008). Apoptosis of HeLa Cells Induced by Cisplatin and Its Mechanism. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 28 (2),197-199.
- Lizano, M., Berumen, J., García-Carranca, A. (2009). HPV-related carcinogenesis: Basic concepts, viral types and variants. *Arch Med Res*, 40, 428-434.
- Mantovani, F., & Banks, L. (2001). The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression, *Oncogene*, 20(54), 7874–7887.
- Montalvo, E.G., Coronel, M.J.A., Alvarado, Z.A., Cantú, L.D.E., Flores, A.D., Ortega, R. A., *et al.*, (2011). Oncoguía. *Cancerología*. 6, 61-69.
- Mosmann, T., (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K.M., Hayakawa, H., Nguyen, C.L., Owens, M., *et al.*, (2004). Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *Journal of Virology*, 78 (21), 11451–11460.
- Ortiz-Ortiz, J., Alarcón-Romero, L., Jiménez-López, M.A., Garzón-Barrientos, V.H., Callejas-Macías, I., Barrera-Saldaña, H.A., *et al.*, (2015). Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. Artículo aceptado para su publicación en el Journal Virology.
- Sakamoto-Hojo, E.T., Mello, S.S., Bassi, C.L., Merchi, I.M., Carminati, P.O., Fachin, A. L., *et al.*, Genomic Instability: Signaling Pathways Orchestrating the Responses to Ionizing Radiation and Cisplatin. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2005: 424-451.
- Sichero, L., Simao, S.J., & Lina, V.L. (2012). Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. *Virology*, 432, 127-132.
- Vaeteewoottacharn, K., Chamutpong, S., Ponglikitmongkol, M., Angeletti, P. (2005). Differential localization of HPV16 E6 splice products with E6-associated protein. *Virology Journal*, 2(50), 1-6.
- Wise-Draper, T. & Wells, S. (2008). Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. *Frontiers in Bioscience*, 13, 1003-1017.
- Xi, L.F., Koutsky, I.A., Hildesheim, A., Galloway, D.A., Wheeler, C.M., Winer, R.L., *et al.*, (2007). Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 16 (1), 4-10.
- Xu, M., Luo, W., Elzi, D.J., Grandori, C., Galloway, D.A., (2008). NFX1 interacts with mSin3A/histone deacetylase to repress hTERT transcription in keratinocytes. *Mol Cell Biol*, 28, 4819-4828.
- Yamada, T., Manos, M.M., Peto, J., Greer, C.E., Muñoz, N., Bosch, F.X., (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *Journal of Virology*, 71 (3), 2463-2472.
- Zehbe, I., Richard, C., DeCarlo, C.A., Shai, A., Lambert, P.F., Lichtig, H., *et al.*, (2009). Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology*, 383, 69-77.
- Zehbe, I., Wilander, E., Delius, H., Tommasino, M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res*, 58, 829-833.