



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

Facultad De Ciencias Químico Biológicas

Maestría En Ciencias Biomédicas

**EFFECTO DE E7 DE REFERENCIA Y DE SU VARIANTE C732/C789/G795
DEL VPH 16 SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE OCT4.**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestría En Ciencias Biomédicas

P r e s e n t a:

SAYURI ITZEL CLEMENTE PERIVAN

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BERENICE ILLADES AGUIAR

CODIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE ORGANISTA NAVA



Chilpancingo de los Bravo; Guerrero, diciembre 2019



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

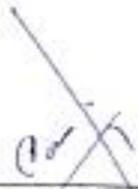
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

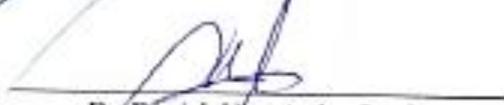
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 11 días del mes de julio de dos mil diecinueve se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto de E7 de referencia y de su variante C732/C789/G795 del VPH 16 sobre la expresión de las isoformas de OCT4", presentada por la alumna Sayuri Itzel Clemente Periván, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dra. Berenice Illades Aguiar
Dirección de tesis


Dr. Oscar del Moral Hernández

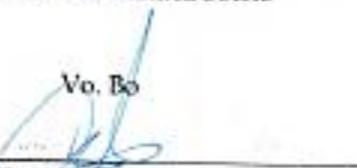

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

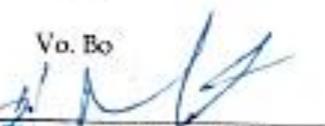

Dr. Daniel Hernández Sotelo


Dr. Alfredo Lagunas Martínez

Vo. Bo

Vo. Bo

 
Dr. Daniel Hernández Sotelo
Director de la Maestría en Ciencias Biomédicas
RECCIÓN 2018 - 2021

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas (FCQB) de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro) en la Ciudad de Chilpancingo Gro, México y en el Laboratorio de Epidemiología Genética del Instituto Nacional de Salud Pública, de la ciudad de Cuernavaca, Morelos, México.

Bajo la dirección de
Dra. Berencice Illades Aguiar

La co-dirección de
Dr. Jorge Organista Nava

La asesoría de
Dr. Alfredo Lagunas Martínez
Dr. Daniel Hernández Sotelo
Dr. Óscar del Moral Hernández
Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Este proyecto se desarrolló en colaboración con el
Laboratorio de Epidemiología Genética del Instituto Nacional de Salud Pública
Dr. Alfredo Lagunas Martínez

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la B E. Sayuri Itzel Clemente Periván CVU:857665), recibió beca (627613) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a los programas de posgrados de calidad (PNCP).

El financiamiento de la tesis fue otorgado por el proyecto de Ciencia Básica 288612
Convocatoria 2016 del CONACYT

AGRADECIMIENTOS.

A LA DRA. BERENICE ILLADES AGUIAR POR PERMITIRME INTEGRAR A SU EQUIPO DE TRABAJO Y REALIZAR ESTA INVESTIGACIÓN, ASÍ COMO SU APOYO INCONDICIONAL E INTERÉS EN CADA UNA DE LAS ETAPAS DE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

AL DR. JORGE ORGANISTA NAVA POR SU APOYO INCONDICIONAL, SUGERENCIAS Y TIEMPO DEDICADO A LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

AL DR. ALFREDO LAGUNAS MARTÍNEZ POR ACEPTARME EN SU LABORATORIO, POR BRINDARME SU TIEMPO Y DEDICACIÓN EN CADA UNA DE LAS CORRECCIONES Y ENSEÑANZAS OTORGADAS. ASÍ COMO POR LA MOTIVACIÓN PARA SEGUIR HACIENDO TODO LO MEJOR EN ESTE TRABAJO.

A LA DRA. LUZ DEL CARMEN ALARCÓN ROMERO POR SUS CORRECCIONES Y SU APOYO EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

AL DR. ÓSCAR DEL MORAL HERNÁNDEZ POR SUS OBSERVACIONES Y APOYO EN MEJORA DEL TRABAJO.

AL DR. DANIEL HERNÁNDEZ SOTELO. POR SUS CORRECCIONES Y PARTICIPACIÓN EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES POR SU APOYO INCONDICIONAL EN TODOS LOS SENTIDOS DURANTE ESTA ETAPA Y DURANTE TODA MI VIDA HASTA AHORA, POR SER PACIENTES CONMIGO A PESAR DE LAS DIFICULTADES, POR ENSEÑARME Y MOTIVARME A DAR SIEMPRE LO MEJOR DE MÍ EN CADA COSA QUE HAGO. POR SU CARIÑO Y CUIDADOS, MUCHAS GRACIAS.

A MIS HERMANAS POR SUS CONSEJOS Y ESTAR SIEMPRE APOYÁNDOME EN TODO LO QUE HAGO, POR SU CARIÑO Y CONFIANZA, POR SER MIS CONFIDENTES Y CUIDAR SIEMPRE DE MÍ, MUCHAS GRACIAS.

A MIS SOBRINOS POR ENSEÑARME SIEMPRE ALGO NUEVO, POR MOSTRARME OTRA PERSPECTIVA DE LA VIDA Y MOTIVARME A SER MEJOR PERSONA, POR COMPARTIR SU CARIÑO CONMIGO.

A MIS AMIGOS POR HABERME ACOMPAÑADO DURANTE ESTA ETAPA POR ESCUCHARME, ACONSEJARME, ESTAR A MI LADO EN LAS DIFICULTADES Y MOTIVARME A SALIR ADELANTE, POR LAS AVENTURAS QUE HICIERON MÁS AGRADABLE TODO ESTE PROCESO.

INDICE

I.	RESUMEN	7
II.	ABSTRACT	8
III.	INTRODUCCIÓN	9
IV.	MATERIALY MÉTODOS	14
V.	RESULTADOS	17
VI.	DICUSIÓN	21
VII.	CONCLUSIONES	25
VIII.	ANEXOS	27
IX.	REFERENCIAS	29

I. RESUMEN.

INTRODUCCIÓN: Los Virus de Papiloma Humano de alto riesgo (VPH-AR), como el VPH16, se han asociado al desarrollo de cáncer cervicouterino (CaCU). Diversos estudios sugieren que variaciones específicas en la secuencia de sus oncogenes como E7 del VPH 16 pueden estar asociadas con la progresión de CaCU. Además, alteraciones en la expresión de las isoformas de Oct4 (Oct4A, Oct4B y Oct4B1), un factor de transcripción involucrado en el mantenimiento de las propiedades de pluripotencia y auto-renovación de las células madre, podrían favorecer el desarrollo de CaCU. Hasta el momento no se ha reportado el nivel de expresión de Oct4A, Oct4B y Oct4B1 en presencia de E7 o de alguna de sus variantes. Por lo tanto el objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de E7 de referencia y la variante génica E7-C732/C789/G795 del VPH16 sobre la expresión del RNA mensajero (mRNA) de Oct4A, Oct4B y Oct4B1. **METODOLOGÍA:** Se utilizaron transfecciones transitorias con el vector PEGFP-N1, PEGFP-N1-E7-de referencia y PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795 en la línea celular C-33 A. Posteriormente se realizó el análisis para comparar la expresión de Oct4A, Oct4B y Oct4B1 en cuatro grupos experimentales (Células no transfectadas, células transfectadas con PEGFP-N1, células transfectadas con PEGFP-N1-E7-de referencia y células transfectadas con PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795). **RESULTADOS:** Se mostró que la expresión del mRNA de Oct4A incrementa en presencia de E7 de referencia y de la variante E7-C732/C789/G795, mientras que la expresión del mRNA de las isoformas Oct4B y Oct4B1 muestra un nivel similar entre los diferentes grupos experimentales, no observando efecto alguno por parte de E7 o de su variante. **CONCLUSIONES:** La proteína E7 de referencia y la variante E7-C732/C789/G795 inducen la expresión del mRNA de Oct4A. Sin embargo, el nivel de expresión del mRNA de las isoformas de Oct4 no muestra diferencias en presencia de E7 de referencia con respecto a la variante E7-C732/C789/G795

Palabras clave: Cáncer cervicouterino, VPH-16, Variante E7, Oct4, Isoformas.

II. ABSTRACT.

INTRODUCTION: High-risk Human Papillomavirus (HPV-AR), such as HPV16, has been associated with the development of cervical cancer (CaCU). Several studies suggest that specific variations in the sequence of its oncogenes such as HPV E7 16 may be associated with the progression of CaCU. In addition, alterations in the expression of the isoforms of Oct4 (Oct4A, Oct4B and Oct4B1), a transcription factor involved in the maintenance of the properties of pluripotency and self-renewal of the stem cells, could favor the development of CaCU. So far, the expression level of Oct4A, Oct4B and Oct4B1 has not been reported in the presence of E7 or any of its variants. Therefore, the objective of the present study was to analyze the effect of reference E7 and the gene variant E7-C732/C789/G795 of HPV16 on the expression of messenger RNA (mRNA) of Oct4A, Oct4B and Oct4B1. **METHODOLOGY:** Transient transfections were used with the PEGFP-N1, PEGFP-N1-E7-reference and PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795 vector in the C-33A cell line. Subsequently, the analysis was performed to compare the Expression of Oct4A, Oct4B and Oct4B1 in four experimental groups (Non-transfected cells, cells transfected with PEGFP-N1, cells transfected with PEGFP-N1-E7-reference and cells transfected with PEGFP-N1-E7-C732 / C789 / G795). **RESULTS:** It was shown that the expression of the Oct4A mRNA increases in the presence of reference E7 and the variant E7-C732/C789/G795, while the expression of the mRNA of the Oct4B and Oct4B1 isoforms shows a similar level between the different groups experimental, not observing any effect by E7 or its variant. **CONCLUSIONS:** The reference E7 protein and the E7-C732/C789/G795 variant induce the expression of the Oct4A mRNA. However, the mRNA expression level of the Oct4 isoforms does not show differences in the presence of reference E7 with respect to the E7-C732/C789/G795 variant

Keywords: Cervical cancer, HPV-16, Variant E7, Oct4, Isoforms

III. INTRODUCCIÓN.

A nivel mundial el cáncer cervicouterino (CaCU) es un problema de salud pública, que ocupa el cuarto lugar en incidencia y mortalidad (GLOBOCAN, 2018). El CaCU es una enfermedad multifactorial, dentro de los factores que influyen en el desarrollo de esta neoplasia, se encuentran el uso por más de cinco años de anticonceptivos orales, la multiparidad, el estatus socioeconómico, el embarazo y la actividad sexual a edad temprana (WHO, 2014), así como la obesidad (American Cancer Society, 2014). Sin embargo, el factor necesario es una infección persistente por el Virus de Papiloma Humano de alto riesgo (VPH-AR), principalmente VPH 16 y 18 (Lin *et al.*, 2014).

El genoma del VPH 16 está constituido por tres regiones: la región E o región temprana (codifica para las proteínas tempranas E1-E7, las cuales modulan los procesos de transformación celular, replicación y transcripción viral); la región L o región tardía (codifica proteínas estructurales de la cápside) y una región LCR (contiene el origen de replicación, una región promotora y una secuencia que controlan la transcripción de los genes virales) (Arroyo, 2010; Bernard, 2013). De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), el VPH16 presenta suficiente evidencia en el desarrollo de carcinogénesis (Arbyn *et al.*, 2014). Su potencial oncogénico está principalmente relacionado con las funciones de las oncoproteínas E6 y E7 (Wise-Draper *et al.*, 2008).

La proteína viral E7 presenta aproximadamente 100 residuos de aminoácidos y está dividida en tres dominios: CR1, ubicado en el extremo amino terminal; el dominio CR2, ubicado entre los amino ácidos 16 y 37, que a su vez contiene un motivo LXCXE y un sitio consenso de fosforilación para la caseína quinasa II (Barbosa *et al.*, 1990); y por último, el dominio CR3 de unión a zinc que consiste de dos motivos CXXC separados por 29-30 residuos de aminoácidos, ubicado en el extremo C-terminal. (Barbosa *et al.*, 1989). La proteína E7 promueve la proliferación celular e inactiva el punto de control de la fase G1-S del ciclo celular (Román *et al.*, 2013) mediante la unión e inactivación del supresor tumoral retinoblastoma (RB1),

conllevarlo a la disociación de los complejos RB1-E2F, promoviendo un entorno celular propicio para la replicación del DNA viral en células diferenciadas (White *et al.*, 2012).

Con respecto a su clasificación, el Comité de Nomenclatura del virus del papiloma, define un nuevo tipo de VPH como una variación en la secuencia de nucleótidos de más del 10% en el marco de lectura abierto de L1 comparado con un tipo ya conocido. Los genotipos que difieren de 2 a 10% en su secuencia se consideran subtipos, mientras que las variantes intratipo varían en un 2% en la región L1 (Pande *et al.* 2008). Se ha definido como linaje a la diferencia de aproximadamente un 1,0% entre los genomas completos de un mismo tipo de VPH, y sublinajes con diferencias de 0,5 a 0,9 % (Burk *et al.* 2011; Chen *et al.* 1994; Chen *et al.* 2011)

El genoma de referencia de VPH 16 fue secuenciado en 1985, y muchas variantes se han encontrado desde entonces (Seedorf *et al.* 1985). La distribución y variación de los tipos de VPH muestran un cierto grado de diferencias étnicas y geográficas (Li *et al.*, 2011; De Sanjose *et al.*, 2010). La variabilidad entre genomas de los VPH-AR podría afectar el potencial carcinogénico y la activación de la respuesta inmune del huésped a través de mutaciones puntuales en sus genomas, e incluso pequeñas variaciones (Chen *et al.*, 2011).

Se ha observado que mutaciones en el gen E7 pueden presentar un impacto notable en la eficiencia de la infección, la antigenicidad viral y la inmunogenicidad (Tabla 1) (Zuna *et al.*, 2011).

Se ha mostrado que la variante N29S de E7 es la más prevalente en CaCU (Yang L *et al.*, 2014), y que este cambio de aminoácido N29S aumenta los niveles de fosforilación por CKII creando un sitio fosfoceptor adicional en S29, lo cual confiere una mayor interacción fosfo-dependiente con la Proteína de Unión a la caja TATA (TBP) y pRb, además de que incrementa su capacidad para degradar pRb y p130 (Zine *et al.*, 2017).

Tabla 1. Posiciones de las variantes en E7 de VPH 16

Amino ácido	M-V	F-S	F-S	L-R	L-P	P-Q
Nt	647	732	789	795	846	864
Prototipo	A	T	T	T	T	C
NA1						
AA	-	C	C	G	-	-
AAf1	-	-	C	G	-	-
Af2	G	-	C	G	-	-
As	G	-	-	-	C	-
E-C109G	-	-	-	-	-	-
E-G131G	-	-	-	-	-	A
E-G350	-	-	-	-	-	-
Ep	-	-	-	-	-	-
Ep-a	-	-	-	-	-	-
Ep-b	-	-	-	-	-	-
Ep-c	-	-	-	-	-	-

En la primera fila las letras mayúsculas corresponden a los cambios de amino ácidos, en la segunda fila los números indican la posición del cambio en los nucleótidos y en la tercera fila las letras mayúsculas indican el nucleótido de referencia de la secuencia de VPH 16 prototipo, en las siguientes filas se muestran los cambios de nucleótidos indicados por letras mayúsculas y – cuando no existe cambio (Modificada de Swan *et al.*, 2005). NA (Norte Americana), AA (Asiático Americana), Aaf (Asiático Africana), Af (Africana), As (Asiática), E (Europea).

Nuestro grupo de trabajo ha encontrado que mujeres del estado de Guerrero presentan diversas variantes de E7 del VPH 16, entre ellas, la variante E7-C732/C789/G795 que no presenta cambio de aminoácidos. Sin embargo, fue la variante más frecuente en muestras correspondientes a Lesiones Intraepiteliales de Alto Grado (LEIAG) y CaCU; además, la presencia de esta variante confiere a las pacientes 3.79 veces más riesgo de desarrollar CaCU (Navor, 2018). Por otra parte, en líneas celulares de CaCU como C-33 A (Wang *et al.*, 2013) y SiHa (Li *et al.*, 2015) se ha observado sobreexpresión de Oct4.

El factor de transcripción de unión a octámero 4 (Oct4), también conocido como POU5F1, es un factor de transcripción nuclear de la familia POU que se une al motivo octamérico 5'-ATTTGCAT-3'. Oct4 forma un complejo trimérico con Sox2 en el DNA y controla la expresión de varios genes implicados en el desarrollo embrionario (Takahashi *et al.*, 2007). Este factor es indispensable para el mantenimiento de la totipotencia celular, participa en la regulación del crecimiento

embrionario, de tejidos, y en la auto renovación de células madre embrionarias o células germinales primordiales, mientras que su nivel de expresión disminuye en tejidos diferenciados o maduros (Matoba *et al.*, 2006).

El gen Oct4, ubicado en el cromosoma 6, se constituye por cinco exones y es editado mediante empalme alternativo en tres isoformas principales: Oct4A, Oct4B (Takeda *et al.*, 1992) y Oct4B1 (Atlasi *et al.*, 2008), generando cuatro proteínas: Oct4A, Oct4B-190, Oct4B-265 y Oct4B-164. Oct4A y Oct4B/B1 las cuáles están funcional y estructuralmente divididas en un dominio de activación transcripcional N-terminal, un dominio POU central y un dominio de transactivación específico de tipo de célula en el extremo C-terminal (Wang *et al.*, 2010).

En muestras de CaCU se ha observado que la proteína Oct4 es expresada principalmente en núcleos de células (Zhou *et al.*, 2017). Sin embargo, se sabe que la ubicación intracelular varía de acuerdo a las isoformas, ya que Oct4A se localiza en el núcleo, mientras que Oct4B se encuentra en el citoplasma (Lee *et al.*, 2006). Oct4A se ha considerado como responsable de la auto renovación de células similares a células madre cancerosas (CCSC) (Cauffman *et al.*, 2005a; 2006b). Además, la sobreexpresión de Oct4B en la línea celular SiHa favorece diversos procesos asociados al desarrollo de cáncer como proliferación celular, tumorigénesis mediante la inhibición de la apoptosis, angiogénesis mediante la regulación positiva de CD34, VEGF, HIF-1 α e IL-6, y es capaz de promover la movilidad de las células tumorales mediante la regulación positiva de metaloproteinasa de matriz 2 Y 9 (MMP2 y MMP9), y la inducción de la transición epitelio mesenquima (EMT por sus siglas en inglés). Esto sugiere que ambas isoformas cooperan para favorecer la progresión de CaCU (Li *et al.*, 2015).

Con el fin de explorar si Oct4 podría usarse para predecir la radio resistencia, Shen *et al.*, evaluaron la expresión de Oct4 y Sox2 mediante inmunohistoquímica en dos grupos de pacientes con carcinoma cervical de células escamosas localmente avanzado (LACSCC); un grupo resistente y otro grupo sensible a la radiación, observando una mayor sobreexpresión de Oct4 en el grupo resistente a la radiación en comparación con el grupo sensible, sugiriendo que el incremento de la expresión

de Oct4 se asocia con la resistencia a la radioterapia; además de ser un factor predictor importante de mala supervivencia en pacientes con LACSCC (Shen *et al.*, 2014).

Así mismo, en un estudio realizado recientemente por el equipo de trabajo, donde se midió el efecto de la oncoproteína E7 de VPH16 sobre la expresión de Oct4, Nanog, Sox2 y Fgf4, se observó que la oncoproteína E7 regula positivamente su expresión tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo que se propone que la oncoproteína E7 del VPH16 podría ser un factor crítico para la auto renovación celular mediante la sobreexpresión de estos factores (Organista *et al.*, 2016). Sin embargo, no existen reportes acerca del papel que tienen las variantes génicas de E7 de VPH16 sobre la regulación de la expresión de las isoformas Oct4A, Oct4B y Oct4B1.

La finalidad de este estudio fue analizar el efecto de E7 de referencia y la variante E7-C732/C789/G795 del VPH 16, sobre el nivel de expresión del mRNA de las isoformas de Oct4, con el propósito de aportar datos que permitan saber si la presencia de esta variante afecta de manera diferente con respecto a E7 de referencia el nivel de expresión del mRNA de las diferentes isoformas de Oct4, a las cuales se les ha atribuido participación en la regulación de diversos procesos claves para el desarrollo de cáncer tales como; apoptosis, angiogénesis, metástasis y radioresistencia (Li *et al.*, 2015).

Al conocer el efecto de la variante E7-C732/C789/G795 del VPH 16 sobre el nivel de expresión del mRNA de las isoformas de Oct4, se generarán datos que nos ayuden a entender la relación entre las variantes de E7 y la expresión de Oct4A, Oct4B y Oct4B1 como factores que favorecen el desarrollo del CaCU.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

Cultivo de la línea celular C-33 A

La línea celular C-33 A fue cultivada en medio DMEM [Medio Eagle Modificado de Dulbecco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA], suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco, Life Technologies, USA) y 1X de una mezcla de antibióticos-antimicóticos (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e incubada a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂.

Transfección de variantes génicas E7

Las células C-33 A fueron transfectadas transitoriamente con PEGFP-N1, PEGFP-N1-E7-G732/C789/C795 y, PEGFP-N1-E7 de referencia, las construcciones utilizadas fueron generadas previamente por Zuñiga (Zuñiga, 2019). Para llevar a cabo las transfecciones fueron usados 4 ug de DNA plásmidico del vector PEGFP-N1, PEGFP-N1-E7 de referencia ó PEGFP-N1-E7-G732/C789/C795, medio Eagle Modificado de Dulbecco y Lipofectamina 2000 transfection reagent, siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen).

Evaluación de la eficiencia de transfección

Citometría de flujo. Se utilizaron células C-33 A transfectadas con el vector PEGFP-N1, PEGFP-N1-E7 de referencia y PEGFP-N1-E7-G732/C789/C795 en placas de 6 pozos, utilizando el protocolo de lipofectamina 2000. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% para su análisis en el citómetro. Para el análisis de las células se utilizó un citómetro FACSCalibur (BD Bioscience) y los resultados del citómetro fueron evaluados utilizando el programa Flowing Software.

Expresión del RNA mensajero (mRNA) de E7-prototipo y E7-C732/C789/G795

Extracción de RNA. Se realizó extracción de RNA total mediante el método de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Anexo 1). La integridad del RNA total fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, y su concentración fue determinada por medio de espectrofotometría, midiendo la relación de absorbancia a 260/280 nm.

Retrotranscriptasa (RT). Para la cuantificación de mRNA específico, a partir del RNA total (1 µg) se sintetizó cDNA usando una mezcla que incluye 0.5ul de oligo dT, 0.25ul de inhibidor de RNasa, 4ul de dNTPs, 4ul de Buffer5x, 1ul de RT y H₂O DEPC, en un volumen final de 20ul. La mezcla se incubó en las siguientes condiciones: 65°C por 5 min, 37°C por 60 min y 70°C por 10 min.

PCR para GAPDH y E7. A partir del cDNA se realizó la amplificación de GAPDH por PCR punto final, utilizando los iniciadores enlistados en la Tabla 2, que generan un amplicón de 450 pb. Para la mezcla de PCR se utilizaron 500 ng de cDNA que se adicionaron a la mezcla de reacción en un volumen final de 20 µl, conteniendo: 1 µl de cada iniciador (10 pmol/µl), 10µl de Master Mix 2X de alta fidelidad (NEBNext®), y H₂O desionizada estéril. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes; a) GAPDH: 1 ciclo a 94°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 1 min, 57°C por 1 min, 72°C por 1 min; y un ciclo a 72°C por 5 min, mientras que para E7 fue realizado en 1 ciclo a 94°C por 3 min, 35 ciclos a 94°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 1min; y un ciclo a 72°C por 10 min.

Análisis de la expresión de Oct4A, Oct4B y OCTB1

qPCR para Oct4A, Oct4B y Oct4B1. La PCR en tiempo real se realizó utilizando el termociclador Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Foster City, CA, USA) y TaqMan Universal PCR Master Mix II (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada isoforma de Oct4 (Oct4A, Oct4B y Oct4B1) (Tabla 2). Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo a 95 °C por 10 min, 40 ciclos a 95°C por 15 s y 60°C por 1 min. La reacción de PCR de los miembros de la familia Oct4 fue realizada en 15 µl de volumen final, la cual consistió de 7.5 µl de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix II, 1 µl de cada oligonucleótido (0.5 µM), 0.5 µl de sonda TaqMan y 200 ng de cDNA. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado y la expresión relativa de los mRNAs de las isoformas de Oct4 fue normalizada a la expresión de GAPDH.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos y sondas para GAPDH, E7 y cada una de las isoformas de Oct4.

Isoformas	Oligonucleótido sentido (5' a 3')	Oligonucleótido antisentido (5' a 3')	Sonda	Tamaño (pb)
OCT4A	CGCAAGCCCTCATTTCAC	CATCACCTCCACCACCTG	CTTCGGATTCGCCTTCTCGCCC	111
OCT4B	CAGGAATGGGTGAATGAC	AGGCAGAAGACTTGTAAAGAAC	AGTTAGGTGGGCAGCTTGAAGGCA	177
OCT4B1	GGGTTCTATTTGGTGGGTTCC	TCCCTCTCCCTACTCCTCTTCA	ATTCTGACCGCATCTCCCCTCTAAG	128
GAPDH	GTGAACCATGAGAAGTATGAC	CATGAGTCCTTCCACGATACC	CCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCCTG	123
GAPDH	AAC ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCCTGTTGCTGTA		450
E7	CCCAGCTGTAATCATGCATG	TGCCATTAAACAGGTCTTCC		269

(Oct4A, Oct4B y Oct4B1 y E7) (Asadi et al., 2011; Jeter *et al.*, 2011)

La expresión de los mRNAs fue determinada con el ciclo umbral (C_t) y los niveles relativos de expresión fueron calculados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Nolan *et al.*, 2006).

Consideraciones éticas y de bioseguridad.

Todos los materiales utilizados en la parte experimental fueron considerados como residuos peligrosos biológicos-infecciosos, el manejo y la eliminación de éstos se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

Análisis de datos.

El software SigmaPlot fue utilizado para calcular la expresión relativa de los mRNA de Oct4A, Oct4B, Oct4B1. Los datos obtenidos se analizaron en el software GraphPad, la prueba de U de Mann-Whitney fue utilizada para comparar las medianas de los niveles de expresión de los mRNAs de Oct4A, Oct4B y Oct4B1 entre los grupos (células C-33 A transfectadas con el vector PEGFP-N1, PEGFP-N1-E7 de referencia y PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795) los resultados se presentan como medianas, percentil 25 y 75. El valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

V. RESULTADOS

Validación del modelo de estudio.

Para expresar E7-prototipo y la variante E7-C732/C789/G795, se realizaron transfecciones con el vector PEGFP-N1, PEGFP-N1-E7 de referencia y PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795 en cultivos de células epiteliales C-33 A derivadas de CaCU previamente establecidos por ATCC (Fig. 1a). La eficiencia de transfección fue evaluada en cada uno de los grupos experimentales mediante ensayos de citometría de flujo detectando la proteína verde fluorescente acoplada al vector PEGFP-N1 (Fig.1b). Con la obtención de las transfecciones de los tres grupos de estudio se procedió a realizar extracción de RNA total usando el método de TRIzol (Figura 1c y Anexo1), comprobando su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

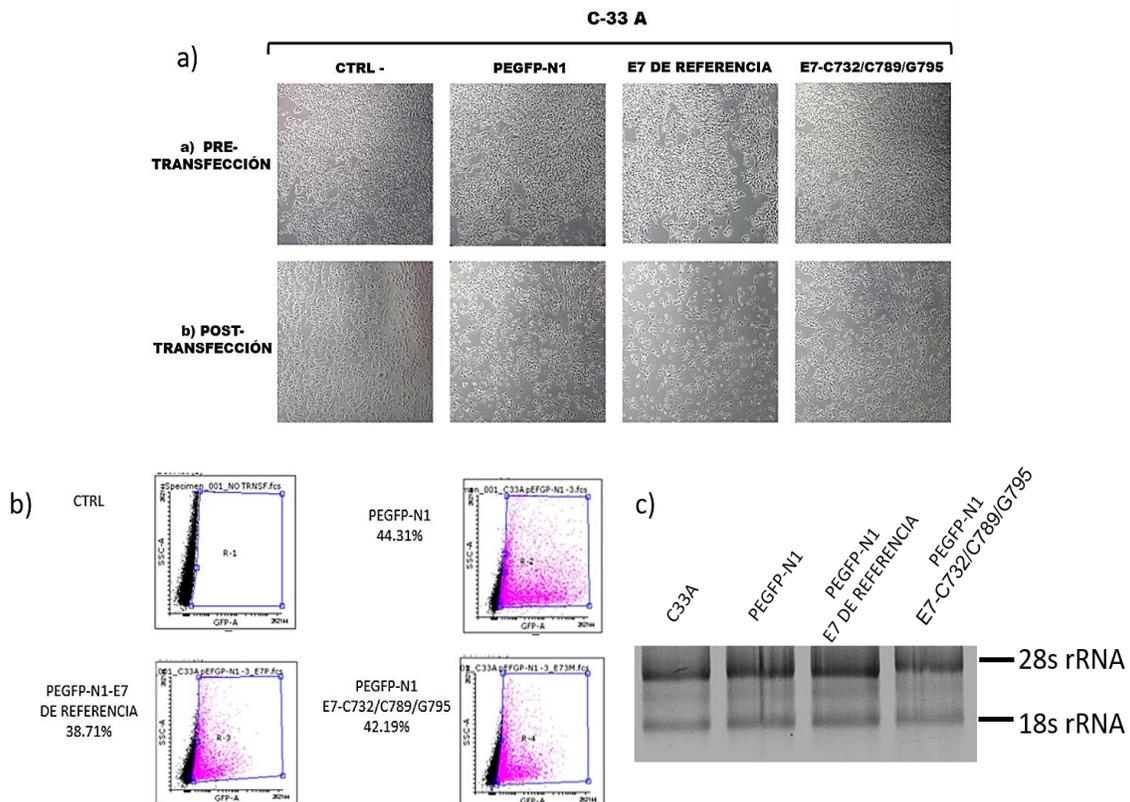


Fig. 1. Validación del modelo de estudio. a) Cultivo de células C-33 A. Microscopía invertida (10x), muestra el cultivo de la línea celular C-33 A. Superior: Antes de la transfección, inferior 24 horas después de la transfección. **b)** Análisis de eficiencia de transfección por citometría de flujo

en células C-33 A. Las células no transfectadas se muestran en color negro y en rosa (R) se muestran células positivas a GFP, transfectadas con el vector vacío PEGFP-N1, PEGFP-N1-E7 de referencia y PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795. Células C-33 A transfectadas utilizando el protocolo de Lipofectamina 2000. Se muestra imagen representativa con los datos de las tres réplicas independientes, teniendo un porcentaje promedio de 44.31% para PEGFP-N1, 38.71% para PEGFP-N1-E7-de referencia y finalmente 42.19% para PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795. c) Obtención de RNA total. Se muestran las subunidades 28s y 18s. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Expresión del mRNA E7 de referencia y E7-C732/C789/G795.

A partir del RNA obtenido se realizó la síntesis de cDNA, una vez obtenido el cDNA de células C-33 A transfectadas con el vector PEGFP-N1, PEGFP-N1-E7 de referencia; así como PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795. Se realizó PCR punto final para E7 para verificar que las células transfectadas estuvieran expresando a E7 del VPH 16. Se utilizó como molde el mismo cDNA de células C-33 A transfectadas con los vectores PEGFP-N1, PEGFP-N1-E7 de referencia y PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795, empleado para la amplificación del gen endógeno GAPDH. El producto de PCR fue observado en un gel de agarosa al 2% confirmando la expresión de E7 en células C-33 A transfectadas previamente con PEGFP-N1-E7 de referencia y PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795 (Fig.2).

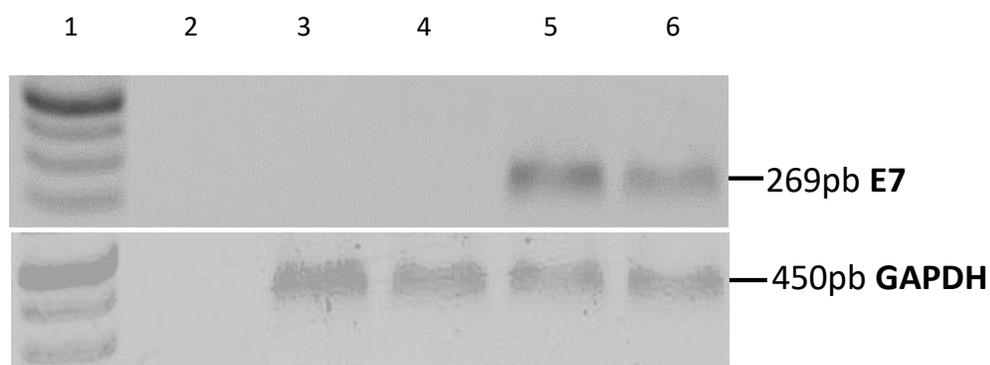


Fig 2. PCR punto final para E7. Amplificación de E7 en células C-33 A transfectadas con PEGFP-N1, PEGFP-N1-E7 de referencia y la variante PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el carril 2 al control negativo (Colocando agua ultrapura en sustitución de la muestra), el carril 3 corresponde al producto de PCR amplificado a partir de cDNA de células C-33 A sin transfectar, el carril 4 al producto de PCR amplificado a partir de cDNA de células C-33 A transfectadas con el vector PEGFP-N1, el carril 5 al producto de PCR amplificado a partir de cDNA de células C-33 A transfectadas con PEGFP-N1-E7 de referencia y por último el carril 6 corresponde al producto de PCR amplificado a partir de cDNA de células C-33 A transfectadas con PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795. Imagen representativa de una de las tres repeticiones realizadas. En la parte inferior se muestra la expresión del gen endógeno GAPDH correspondiente a cada una de las muestras utilizadas en los carriles mostrados para E7. Gel de agarosa al 2.5%.

Análisis de la expresión de Oct4A, Oct4B y OCTB1.

Una vez confirmada la presencia de E7 en los cultivos transfectados se procedió a realizar la PCR cuantitativa (qPCR) de las isoformas Oct4A, Oct4B y Oct4B1, utilizando el gen constitutivo GAPDH para normalizar los datos. La RT-qPCR en los diferentes grupos de estudio dio como resultado un incremento en la expresión de Oct4A en los grupos PEGFP-N1-E7 de referencia (media: 3.59; desviación estándar: 2.74; $p= 0.025$) y PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795 (media: 3.29; desviación estándar: 1.75; $p= 0.011$), en comparación al grupo control (media: 1.16; desviación estándar: 0.54) y el grupo de células transfectadas con PEGFP-N1 (mediana: 1.26; desviación estándar: 0.49; $p= 0.71$) (Fig. 3a), mostrando así que E7 si afecta el nivel de expresión del mRNA de esta isoforma de Oct4. Con respecto a Oct4B no se observó algún cambio en el nivel de expresión entre los grupos de estudio [grupo control: (media: 1.38; desviación estándar: 0.46), PEGFP-N1: (media: 1.39; desviación estándar: 0.71; $p= 0.69$), PEGFP-N1-E7 de referencia: (media: 1.41; desviación estándar: 1.09; $p= 0.778$), PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795 (media: 1.43; desviación estándar: 0.96; $p= 0.680$)] (Fig.3b). Los datos referentes a la expresión de la isoforma Oct4B1 no muestran algún cambio significativo entre aquellas células C33A transfectadas con PEGFP-N1 (media: 1.47; desviación estándar: 0.71; $p= 0.79$), PEGFP-N1-E7 de referencia (media: 1.59; desviación estándar: 1.68; $p= 0.33$) y PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795 (media: 1.67; desviación estándar: 2.25; $p= 0.13$) con respecto al control (media: 1.77; desviación estándar: 0.98) (Fig. 3c). Por lo que solamente la isoforma Oct4A es afectada positivamente por la presencia de E7 de referencia y su variante E7-C732/C789/G795 del VPH16.

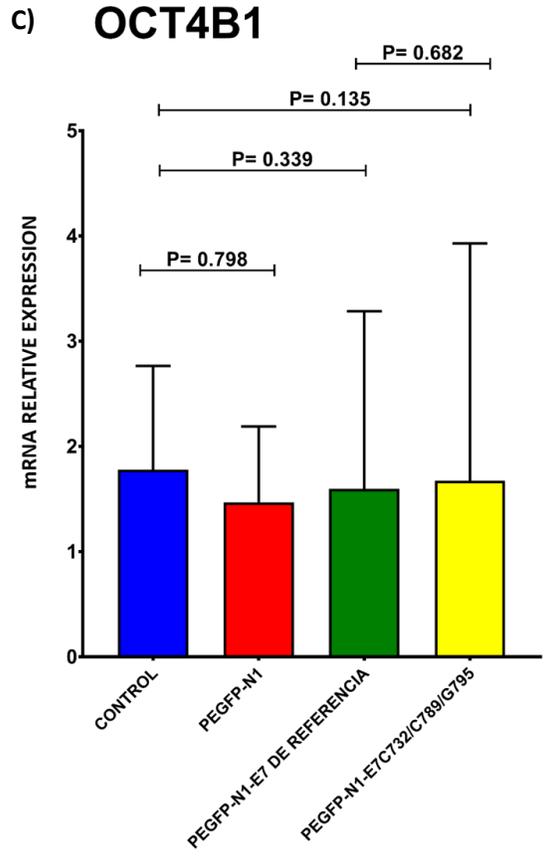
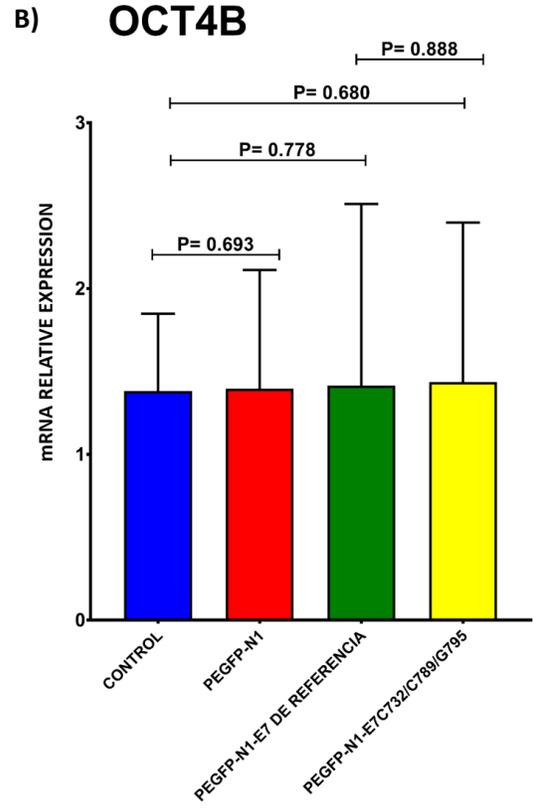
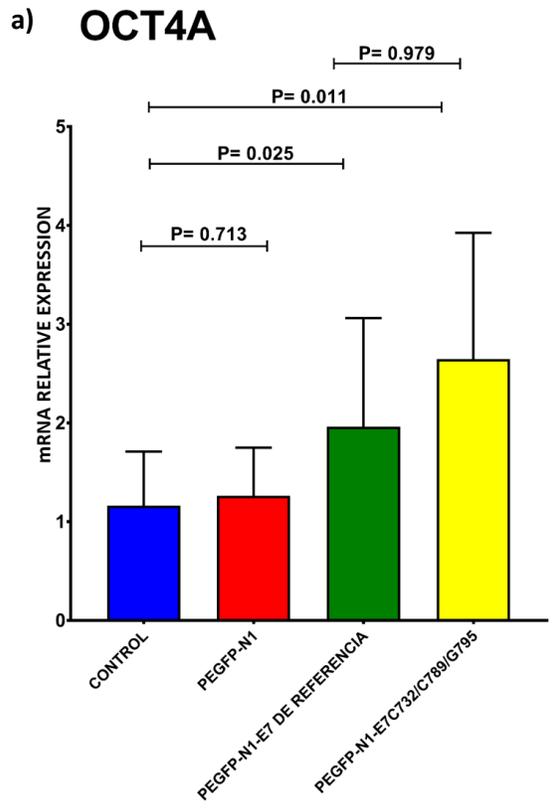


Fig 3. RT-qPCR para Oct4A. Análisis de RT-qPCR para determinar la expresión del mRNA de a) OCT4A, b) OCT4B y c) OCT4B1 realizado a partir de cDNA obtenido de cultivos de células C-33 A no transfectados, así como aquellos transfectados con PEGFP-N1, PEGFP-N1-E7 de referencia y PEGFP-N1-E7-C732/C789/G795. La RT-qPCR se realizó por triplicado. Los valores representan como medias y desviación estándar, los datos fueron normalizados a GAPDH. Para comparar los grupos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney, el valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

VI. DISCUSIÓN.

El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de E7 y de la variante génica E7-C732/C789/G795 del VPH16 sobre la expresión Oct4A, Oct4B y Oct4B1, utilizando la línea celular epitelial C-33 A (VPH-) derivada de CaCU que expresa transitoriamente E7 de referencia ó la variante E7-C732/C789/G795 correspondientemente (Tranfecciones con PEGFP-N1-E7-Prototipo y PEGFP-N1-C732/C789/G795). Previamente se ha reportado que la oncoproteína E7 del VPH se une específicamente al dominio POU de Oct4 formando un complejo tanto *in vitro* como *in vivo* y que Oct4 está activo cuando se expresa en células transformadas por el VPH, sugiriendo que al tener como blanco a Oct4, E7 podría tener la capacidad de imitar una actividad específica de células madre (Brehm *et al.*, 1999).

También se ha observado que E7 regula positivamente la expresión de Oct4 a nivel de RNA mensajero y proteína, tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo que se propone a E7 como un factor crítico para la auto renovación celular mediante la sobreexpresión de factores relacionados con el mantenimiento de las características troncales (Organista *et al.*, 2016). Además, la expresión de genes de troncalidad ha mostrado capacidad de promover carcinogénesis y el desarrollo de tumores malignos, mientras que la pérdida de su expresión conduce a la pérdida de las capacidades de auto-renovación y proliferación (Hu *et al.*, 2008; Ikushima *et al.*, 2011; Sung *et al.*, 2012).

En este estudio determinamos si E7 de referencia ó la variante E7-C732/C789/G795 del VPH16 tiene efecto en el nivel de expresión de las isoformas Oct4A, Oct4B y Oct4B1. Se mostró un incremento en la expresión de Oct4A la cual se ha reportado se encuentra principalmente en el núcleo y se considera como la isoforma activa (Lee *et al.*, 2006). Por su parte las isoformas Oct4B y Oct4B1 no mostraron efecto en su nivel de expresión.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo, se determinó la expresión de las isoformas de Oct4 en muestras de pacientes con diferente grado de lesión y CaCU positivas a VPH 16, mostrando un incremento en la expresión de las isoformas de Oct4 en muestras de CaCU en comparación a muestras sin lesión

(Ayala y Villanueva, 2019). La diferencia en el nivel de expresión de Oct4A, Oct4B Y Oct4B1 podría ser estimulada por algún otro factor adicional a la presencia de E7 del VPH 16. Se ha reportado que Oct4 puede actuar como un oncogén y ha sido asociado con el desencadenamiento de células troncales cancerosas (Li *et al.*, 2015). Durante la infección por VPH-AR el DNA viral puede ser integrado en el DNA del hospedero e iniciar la síntesis de las oncoproteínas E6 y E7 promoviendo la proliferación mediante la inactivación de los supresores de tumor p53 y pRb, respectivamente (Olivero *et al.*, 2018). La degradación de pRb termina con la represión de Oct4 y Sox2, mientras que la degradación de p53 conduce a un incremento en la expresión de Nanog (Kareta *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2005). Estos datos podrían ayudar a comprender el por qué el nivel de expresión de Oct4 difiere en el estudio previamente realizado por nuestro grupo de trabajo, ya que en el caso del previo estudio con muestras de pacientes se tiene el estímulo adicional otorgado por la degradación de p53 mediante la sobreexpresión de E6 conllevando a la sobreexpresión de Nanog el cuál es un regulador positivo de la expresión de Oct4. Tomando en cuenta el efecto adicional que podría otorgar la oncoproteína E6, se podrían explicar las diferencias entre nuestros resultados y los obtenidos por el grupo de trabajo utilizando muestras de pacientes con lesión y CaCU.

Adicionalmente se ha sugerido que los VPH-AR promueven la auto renovación mediante la regulación positiva de Oct4, Sox2 y Nanog manteniendo así la población de células madre en tumores del cuello uterino (Organista *et al.*, 2019).

Nuestros datos son consistentes con lo reportado por Wang *et al.*, quienes mostraron una expresión basal de Oct4 en células C-33 A lo cual concuerda con nuestros datos correspondientes a los niveles de expresión de las diferentes isoformas de Oct4 en células C-33 A sin transfectar (Wang *et al.*, 2013). Así mismo nuestros resultados correspondientes al nivel de expresión de Oct4A en presencia de E7 o de su variante E7-C732/C789/G795 muestran similitud con lo reportado por Liu *et al.*, donde la expresión del mRNA de Oct4 fue más alta en células positivas a VPH de alto riesgo como 16 y 18 en células CasKi y HeLa en comparación a la línea celular VPH negativa C-33 A (Liu *et al.*, 2011), por lo que en este caso se

sugiere que tanto E7-prototipo y la variante E7-C732/C789/G795 aumentan los niveles de expresión de Oct4A.

Como se ha mencionado previamente, en el presente estudio se muestra solamente efecto en la expresión del mRNA en Oct4A generado por la variante E7-C732/C789/G795; sin embargo, es ligeramente mayor este incremento en presencia de E7 de referencia siendo esta diferencia no significativa. Estos resultados se asemejan a lo reportado por nuestro equipo de trabajo donde aquellos pacientes que presentaban E7 de referencia mostraban mayor expresión del mRNA de Oct4A en comparación a aquellos que presentaban la variante E7-C732/C789/G795; sin embargo, no se presentó diferencia significativa entre estos dos grupos (Ayala y Villanueva, 2019).

Por otro lado, la expresión de Oct4 en pacientes con CaCU se ha relacionado con radio y quimio resistencia (Shen et al., 2014), y el incremento de su expresión muestra pobre supervivencia en general; así como libre de enfermedad, sugiriendo a Oct4 como un posible marcador de CaCU (Kim et al., 2015).

A pesar de que el mecanismo por el cuál E7 podría estar regulando la expresión de Oct4 es aún desconocido, nos centraremos en el mecanismo sugerido por Organista *et al.*, donde E7 del VPH16 tiene la capacidad de formar un complejo con Oct4 y Sp1, y dicho complejo puede modificar la transcripción de Oct4 mediante su unión directa a la región promotora de Oct4 (Organista *et al.*, 2016) (Fig 8).

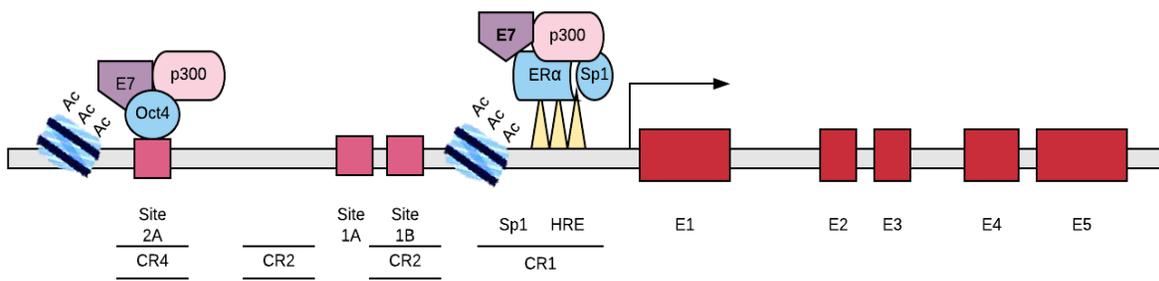


Fig. 8. Modelo del mecanismo de modulación de la expresión de Oct4 mediante E7.

Modelo propuesto para la modulación de la expresión de Oct4, se muestra la estructura del gen de Oct4, en color rojo los exones, en color rosa los sitios localizados en las regiones conservadas (CRs), en amarillo el sitio de unión para ERα y Sp1 que forman un complejo y posteriormente reclutan a p300, que a su vez interactúa con E7 que incrementa la función de transactivación de p300 y a su vez p300 favorece la acetilación de histonas y la activación del gen Oct4. En la región CR4 se muestra la interacción del complejo E7-Oct4-p300 directamente en la región promotora de Oct4.

Los datos aquí mostrados sugieren una regulación positiva de la isoforma Oct4A mediada por la oncoproteína E7 del VPH16, la cual cumple principalmente la función de factor de transcripción. Sin embargo, se sugieren futuros estudios en distintos modelos, para esclarecer más acerca del mecanismo mediante el cual E7 y su variante E7-C732/C789/G795 del VPH16 regula la expresión de las isoformas Oct4A, Oct4B y Oct4B1 durante el desarrollo de CaCU.

VII. CONCLUSIONES.

- La proteína E7 de referencia y la variante E7-C732/C789/G795 inducen la expresión del mRNA de Oct4A.
- El nivel de expresión del mRNA de las isoformas Oct4A, Oct4B y Oct4B1 no muestra diferencias en presencia de E7 de referencia con respecto a la presencia de la variante E7-C732/C789/G795.

PERSPECTIVAS

- Obtener cultivos de células C-33 A que expresen establemente a la oncoproteína E7 de referencia y la variante E7-C732/C789/G795 del VPH16
- Analizar el efecto de E7 de referencia y la variante E7-C732/C789/G795 a nivel de proteína
- Determinar si otra oncoproteína como E6 tiene efecto en la expresión de las isoformas de Oct4.

VIII. ANEXOS

1. Método de extracción de RNA con TRIzol

Homogenizar la muestra habiendo agregado 1ml de TRIzol a la misma separación en fases.

Reposar el homogenizado durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de proteínas.

Agregar al homogenizado 0.2mL de cloroformo por cada 1ml de trizol utilizado.

Agitar vigorosamente durante 15 segundos en un vortex.

Incubar el homogenizado durante 5 minutos a temperatura ambiente

Centrifugar la muestra a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C, después de centrifugar la muestra debe estar separada en dos fases, una roja que corresponde a la fase fenol-cloroformo y una fase incolora que corresponde a la fase acuosa, el RNA permanece exclusivamente en esta última fase.

Precipitación del RNA

Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo, guarde la fase orgánica si se desea una posterior extracción del DNA.

Precipitar el RNA de la fase acuosa utilizando isopropanol, agregar 1mL por cada 1 ml de TRIzol usado en la fase de homogenización.

Incubar las muestras a -20°C durante 20 min.

Centrifugar la muestra a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C, después de centrifugar la muestra, el RNA precipitado a menudo es visible formando un botón al fondo del tubo.

Lavado del RNA

Retirar el sobrenadante y lavar una vez el botón de RNA con 0.75 mL de etanol DEPC al 75% por cada 1 ml de TRIzol utilizado en la homogenización, lavar dando pequeños golpecillos con el dedo en la punta del tubo.

Centrifugar a 7,500 rpm durante 5 min a 4°C.

Por ultimo re-suspenda la muestra de RNA en agua libre de RNAsas.

IX. REFERENCIAS.

1. Aksoy P, Gottschalk EY and Meneses PI. (2017). HPV entry into cells. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 772:13–22..
2. Alberti L, Losi L, Leyvraz S, Benhattar J. (2015). Different Effects of BORIS/CTCF on Stemness Gene Expression, Sphere Formation and Cell Survival in Epithelial Cancer Stem Cells. *PLoS One.*10: 7.
3. Arbyn M., Tommasino M., Depuydt C., Dillner J. (2014). Are 20 human papillomavirus types causing cervical cancer. *J. Pathol;* 234:431–435.
4. Arroyo, D. (2010). Papilomavirus humanos, cáncer cervical y vacunación. *Virol,* 13: 317.
5. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Gokhale PJ, Andrews PW. (2008). Oct4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells* 26: 3068–3074.
6. Ayala-Reyna DY y Villanueva-Morales D. Expresión de las isoformas de Oct4 y su relación con las variantes génicas de E7 del VPH16 en lesiones precursoras y cáncer cervicouterino. Tesis de licenciatura. Guerrero, Facultad de Ciencias Químico Biológico, Universidad Autónoma de Guerrero- Chilpancingo: 63.
7. Barbosa, M. S., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *Journal of Virology,* 63: 1404–1407.
8. Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR, Vousden KH. (1990). The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J;* 9:153-60.
9. Bernard H. U. (2013) Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: An overview and recent developments. *Infection, Genetics and Evolution;*18: 357-361
10. Berumen, J., Ordoñez, R.M., Lazcano, E., Salmeron, J., Galvan, 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: 1325-1330.
11. Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ *et al.* (1999). The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J* 18: 2449–2458.
12. Burk, R.D., Chen, Z., Harari, A., Smith, B.C., Kocjan, B.J., Maver, P.J, *et al.* (2011). Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. *Acta dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica,* 20: 113.
13. Cauffman G, Van de Velde H, Liebaers I, Van Steirteghem A. (2005a). Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Mol Hum Reprod* 11: 173–181.
14. Cauffman G, Liebaers I, Van Steirteghem A, Van de Velde H. (2006b). POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Stem Cells* 24: 2685–2691.

15. Chen, C.M., Shyu, M.P., Au, L.C., Chu, H.W., Cheng, W.T. & Choo, K.B. (1994). Analysis of deletion of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase chain reaction approach. *Journal of medical virology*, 44: 206-211.
16. Chen, Z., Schiffman, M., Herrero, R., DeSalle, R., Anastos, K., Segondy, M, *et al.* (2011). Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS one*, 6: e20183.
17. De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, *et al.* (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*;11: 1048–1056.
18. Karetka MS, Gorges LL, Hafeez S, Benayoun BA, Marro S, Zmoos AF, *et al.* (2015) Inhibition of pluripotency networks by the Rb tumor suppressor restricts reprogramming and tumorigenesis. *Cell Stem Cell*. 16:39–50.
19. Kim, B. W., Cho, H., Choi, C. H., Ylaja, K., Chung, J.-Y., Kim, J.-H., *et al.* (2015). Clinical significance of OCT4 and SOX2 protein expression in cervical cancer. *BMC cancer*, 15: 1015-1015.
20. Lee J, Kim HK, Rho JY, Han YM, Kim J. (2006). The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem* 281: 33554–33565.
21. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. (2011). Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*;128: 927–935.
22. Li, S.-W., Wu, X.-L., Dong, C.-L., Xie, X.-Y., Wu, J.-F., Zhang X. (2015). La expresión diferencial de las isoformas Oct4 en el carcinoma de cuello uterino. *PLoS ONE*, 10:3.
23. Lin, J., Albers, A.E., Qin, J., Kaufman, A.M. (2014). Prognostic Significance of Overexpressed p16INK4a in Patients with Cervical Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 9: e0106384-e0106391.
24. Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E, *et al.* (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol*. 7:165–171.
25. Liu, D., Zhou, P., Zhang, L., Wu, G., Zheng, Y., and He, F. (2011). Differential expression of Oct4 in HPV-positive and HPV-negative cervical cancer cells is not regulated by DNA methyltransferase 3A. *Tumor Biology* 32: 941-950.
26. López J, Ruíz G, Organista-Nava J, Gariglio P and García-Carrancá A. (2012). Human papillomavirus infections and cancer stem cells of tumors from the uterine cervix. *Open Virol J*. 6:232–240.
27. Matoba R, Niwa H, Masui S, *et al.* (2006). Dissecting Oct3/4-regulated gene networks in embryonic stem cells by expression profiling. *PLoS One*; 1:e26.
28. Mirzaei, M.R., Afsah Hejri, S.J., Kazemi Arababadi, M., Hassanshahi, G., and Mahmoodi, M. (2014). OCT4B1 Down-regulates Self-renewal Genes in Cancer Cell Lines. *Pharm Sci* 19: 117-123.
29. Navor-Hernández, JA., (2018). Asociación de Variantes génicas E7 del VPH 16 con el cancer cérvicouterino en mujeres guerrerenses. Tesis de licenciatura. Guerrero,

- Facultad de Ciencias Químico Biológico, Universidad Autónoma de Guerrero-Chilpancingo. 10-20.
30. Olivero C, Lanfredini S, Borgogna C, Gariglio M and Patel GK. (2018). HPV-induced field cancerisation: Transformation of adult tissue stem cell into cancer stem cell. *Front Microbiol.* 9:5462018.
 31. Organista J., Gómez Y., Ocadiz R., García E., Bonilla J., Lagunas A., *et al.* (2016). The HPV16 E7 oncoprotein increases the expression of Oct3/4 and stemness-related genes and augments cell self-renewal. *Virology*; 499: 230-242.
 - Roman A, Munger K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 445: 138–168.
 32. Organista-Nava, J., Gómez-Gómez, Y., Garibay-Cerdenares, O.L., Leyva-Vázquez, M.A., & Illades-Aguiar, B. (2019). Cervical cancer stem cell-associated genes: Prognostic implications in cervical cancer (Review). *Oncology Letters*, 18: 7-14.
 33. Roman A, Munger K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 445, 138–168
 34. Seedorf, K., Krämmer, G., Dürst, M., Suhai, S. & Röwekamp, W.G. (1985). Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*, 145: 181-185.
 35. Takahashi K, Koji T, Mari O, Megumi N, Tomoko I, Kiichiro, *et al.* (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131; 861–872.
 36. Shen, L., Huang, X., Xie, X., Su, J., Yuan, J., & Chen, X. (2014). High Expression of SOX2 and Oct4 Indicates Radiation Resistance and an Independent Negative Prognosis in Cervical Squamous Cell Carcinoma. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*; 62: 499-509.
 37. Takeda J, Seino S, Bell GI. (1992). Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res* 20: 4613–4620.
 38. Wang X, Dai J. (2010). Concise review: isoforms of Oct4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells* 28: 885–893.
 39. Wang YD, Cai N, Wu XL, Cao HZ, Xie LL, Zheng PS. (2013). Oct4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death*: 4: e760.
 40. White, E. A., Kramer, R. E., Tan, M. J. A., Hayes, S. D., Harper, J. W., & Howley, P. M. (2012). Comprehensive Analysis of Host Cellular Interactions with Human Papillomavirus E6 Proteins Identifies New E6 Binding Partners and Reflects Viral Diversity. *Journal of Virology*, 86: 13174–13186.
 41. Wise-Draper, T.M. & Wells, S.I. (2008). Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13,:1003-1017.
 42. Yang L, Yang JL, Byrne S, Pan J, Church GM. (2014). CRISPR/Cas9-Directed Genome Editing of Cultured Cells. *Curr Protoc Mol Biol.*107:31.1.1-17.
 43. Zacapala-Gómez, A.E., Del Moral-Hernández, O., Villegas-Sepúlveda, N., Hidalgo-Miranda, A., Romero-Córdoba, S.L., Beltrán-Anaya, F. O, *et al.* (2016). Changes in

- global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. *Virology*, 488: 187-195.
44. Zhou, X., Yue, Y., Wang, R., Gong, B., & Duan, Z. (2017). MicroRNA-145 inhibits tumorigenesis and invasion of cervical cancer stem cells. *International journal of oncology*, 50: 853-862.
 45. Zine El Abidine A, Tomaić V, Bel Haj Rhouma R, Massimi P, Guizani I, Boubaker S, *et al.* (2017). A naturally occurring variant of HPV-16 E7 exerts increased transforming activity through acquisition of an additional phospho-acceptor site. *Virology*. 500:218-225.
 46. Zuna RE, Tuller E, Wentzensen N, Mathews C, Allen RA, Shanesmith R, Dunn ST, *et al.* (2011). HPV16 variant lineage, clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer. *Int J Cancer*; 6:19.
 47. Zúñiga Alviar, LG. (2019). Análisis del efecto de las variantes génicas E7 del VPH 16 en la proliferación celular. Tesis de maestría. Guerrero, Facultad de Ciencias Químico Biológico, Universidad Autónoma de Guerrero- Chilpancingo: 18-24.

FUENTES ELECTRONICAS.

1. American Cancer Society, Inc. (2014). The American Cancer Society. Obtenida de (www.cancer.org)
2. GLOBOCAN. (2012). GLOBOCAN (IARC) Sección de información de cáncer. Obtenida de: <http://globocan.iarc.fr>
3. World Health Organization. (2014). Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice. 2nd edition. Obtenida de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK269619/>