



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
Facultad ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
Unidad Especializada en Microbiología  
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA



**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

---

**Análisis estructural y funcional de las variantes génicas E7 del VPH 16  
presentes en muestras cervicales de mujeres del estado de Guerrero.**

---

**TESIS**

**Que para obtener el grado de:**

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**P R E S E N T A:**

**M. en C. Ramón Antaño Arias**

**Directora de Tesis:** Dra. Berenice Illades Aguiar

**Codirector:** Dr. Oscar del Moral Hernández

*Chilpancingo, Guerrero*

*Junio del 2021*




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

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 15 días del mes de enero del dos mil veintiuno, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Análisis estructural y funcional de las variantes génicas E7 del VPH 16 presentes en muestras cervicales de mujeres del estado de Guerrero", presentada por el alumno Ramón Antaño Arias, para obtener el Grado de Doctor 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. Napoleón Navarro Tito

  
Dra. Eugenia Flores Alfaro


  
Dr. Oscar del Moral Hernández

  
Dra. Dinorah Leyva Illades

Vo. Bo

  
Dra. María Fernández Tilapa  
Coordinadora del Doctorado en Ciencias Biomédicas  
DIRECCIÓN 2018 - 2021

Vo. Bo

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo de los Bravo, Guerrero.

**Bajo la Dirección de:**

Dra. Berenice Illades Aguiar

**La Codirección de:**

Dr. Oscar del Moral Hernández

**Y con la asesoría de:**

Dra. Dinorah Leyva Illades

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dr. Napoleón Navarro Tito

Para este trabajo se contó con la colaboración del Laboratorio de Biomoléculas de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo de los Bravo, Guerrero y del Laboratorio de Citometría de flujo, Centro de Instrumentos del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, CDMX.

Esta investigación se desarrollo con financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del Fondo Ciencia Básica 2016 (288612). Así mismo, el M. en C, Ramón Antaño Arias, recibió una beca del CONACYT con número de registro (334011).

## **Dedicatoria**

A mis padres Ignacia Arias Estrada y Eduardo Antaño Rios, y hermanas, por su confianza, apoyo y amor que siempre me han brindado, gracias a ustedes puedo alcanzar este logro. Gracias por siempre mostrarme ese amor de familia.

A mi esposa, Blanca, por tu paciencia, apoyo y amor que me has brindado durante este proyecto. Has sido una fortaleza para mi, para seguir adelante y cumplir con todos nuestros proyectos. Te amo.

A mis hijos, Luzamy y Lalito, los amo. Son mi fuerza y alegría. Por endulzar todos los días con sus risas, sus travesuras y su amor.

## Agradecimientos

A mi directora de Tesis, a la Dra Berenice Illades Aguiar, gracias por su apoyo en realizar este proyecto. Usted ha sido fuente de inspiración para seguir superándome.

A mis sinodales, al Dr Oscar, a la Dr Eugenia, al Dr Tito y a la Dra Dinorah, por sus sugerencias y valiosas aportaciones a este proyecto.

A todos los Doctores y a mis compañeros del Laboratorio de Biomedicina Molecular, por sus consejos, su amistad y agradables momentos de convivencia. Trabajar con ustedes siempre ha sido enriquecedor, ojala todos sigan superándose y logren sus objetivos.

A mis amigos, que siempre han estado apoyándome, brindándome sus consejos y su amistad.

**Análisis estructural y funcional de las variantes génicas E7 del  
VPH 16 presentes en muestras cervicales de mujeres del estado  
de Guerrero.**

# Contenido

<b>RESUMEN .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>36</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>55</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERENCIAS GENERALES .....</b>	<b>58</b>

## RESUMEN

**INTRODUCCION:** La proteína E7 del Virus del Papiloma Humano 16 es una de las oncoproteínas asociadas al potencial oncogénico del papilomavirus. E7 participa en distintos procesos celulares como proliferación celular, adhesión, migración, alteraciones del metabolismo celular, etc y en conjunto con E6 se ha observado que afecta la capacidad de migración celular. Algunos estudios han reportado algunas mutaciones en el gen E7 y un estudio reciente con una variante génica de E7 muestra que la mutación generó un nuevo sitio fosfoceptor y una mayor afinidad por el pRB. Debido al papel de la oncoproteína E7 en la oncogenicidad del VPH, es imperativo conocer su variabilidad genética y su efecto en el desarrollo del tumor. En México, sin embargo, no se han realizado estudios para analizar las mutaciones en el gen E7. **OBJETIVOS:** Analizar la variabilidad genética del E7 HPV16, la asociación de variantes E6 E7 con lesiones cervicales y cáncer, su efecto sobre la estructura secundaria del RNAm de E6 E7 y la migración celular. **MÉTODOS:** Se analizaron 190 muestras del biobanco del Laboratorio Molecular de Biomedicina de la Universidad Autónoma de Guerrero mediante la secuenciación del gen E7 y se alinearon con la secuencia de referencia de HPV16. Todas las muestras cervicales tenían identificadas las variantes del gen E6. Para generar la estructura secundaria del ARNm se utilizó un servidor web de estructura de ARN (Mathews Lab). Para analizar el efecto en la migración celular, se transfectaron células C33a con las variantes E6 E7 y se realizaron ensayos de cierre de herida y transwell. **RESULTADOS:** E7 HPV16 tenía 6 variantes génicas en la población estudiada. Sólo dos variantes tenían mutaciones que modificaron la secuencia de aminoácidos E7-A712 (H51N) y E7-G647 (N29S). La variante génica más frecuente en todas las muestras y muestras con cáncer cervical fue E7-C732/C789/G795. La proporción de probabilidades de HPV 16 E7-C732/C789/G795 para predecir la progresión al cáncer cervical fue de 3.79 (IC del 95% 1.46-9.85), Analizando la combinación de variantes de E6 y E7 presentes en un mismo paciente se observó que las variantes AA-a E7-C732/C789/G795 presentó un OR de 110 (95% CI = 6.04–2001.3) para el desarrollo de CaCU y esta misma combinación de variantes presentó la mayor



diferencia estructural en la predicción de la estructura de sus RNA mensajeros. Sin embargo, no se observó algún cambio significativo en la migración debido a alguna variante de E6 E7. CONCLUSIONES: La distribución de la variante genética E7 HPV16 en la población estudiada es diferente a la reportada en los países asiáticos. Este estudio proporciona evidencia de la asociación de las variantes del gen E7-C732/C789/G795 y AA-a E7-C732/C789/G795 con el riesgo de cáncer cervical en mujeres del estado de Guerrero.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es una neoplasia con alta incidencia a nivel mundial, para el 2012 se situó en el cuarto lugar en incidencia y mortalidad en mujeres adultas con 527 600 y 265 700 casos respectivamente (Torre et al., 2015). Según datos del Globocan del 2012, en México el CaCu es la segunda neoplasia en incidencia y mortalidad en mujeres, con 13 960 y 4769 casos respectivamente (Globocan, 2012). En el 2013 Guerrero ocupó el quinto lugar a nivel nacional por tasa de defunción por CaCu en mujeres mayores de 25 años más alta, 14.1 por cada 100 000 mujeres, solo después de Morelos, Chiapas, Veracruz y Sonora (Secretaría de salud, 2015).

Más del 70% de los CaCu se originan de células escamosas cervicales (Jenkins D., 2007) este inicia con cambios premalignos que pueden ser identificados por la examinación de células cervicales exfoliadas y estudios histológicos. Estas lesiones premalignas pueden clasificarse por el sistema Bethesda en sin lesión escamosa intraepitelial (Sin LEI), lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG), lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) y CaCu (Tabla 1). La examinación cito e histológica, no puede, sin embargo, identificar cuales lesiones premalignas tendrán una regresión espontanea de aquellas que progresarán a cáncer invasivo (Jenkins D., 2007; Woodman et al., 2007). Diversos factores influyen en la progresión de la lesión, entre ellos, el tipo de virus de papiloma humano (VPH) asociado, factores socioeconómicos, demográficos, estilo de vida, etnia, acceso a programas preventivos y servicios de salud (Chatterjee et al., 2016).

**Tabla 1. Terminología usada en reportes de pruebas citológicas e histológicas de cérvix.**

Sistema Papanicolaou		Organización mundial de la salud	NIC	Sistema Bethesda	Sistema de clasificación Reino unido
Grado	Descripción				
	Prueba citológica	Prueba cito e histológica	Prueba histológica	Prueba cito e histológica	Prueba citológica
<b>I</b>	Ausencia de células atípicas o anormales			Límites normales	Normal
<b>II</b>	Citología atípica, sin evidencia de malignidad			Inicio de cambios celulares ASC-US/ASC-H	Discariosis
<b>III</b>	Citología sugestiva pero no conclusiva para malignidad	Displasia leve Displasia moderada Displasia severa	NIC 1 NIC 2 NIC 3	LEIBG LEIAG	Discariosis leve Discariosis moderada
<b>IV</b>	Citología fuertemente sugestiva para malignidad	Carcinoma in situ	NIC 3		¿Discariosis severa/carcinoma invasivo
<b>V</b>	Citología conclusiva de malignidad	Carcinoma microinvasor Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo	Neoplasia glandular

NIC: Neoplasia Intraepitelial cervical. ASCUS: células escamosas de significado indeterminado. LEIBG: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. LEIAG: Lesión escamosa de alto grado. Tabla tomada de Jenkins D., 2007.

El VPH es un virus oncogénico transmitido por contacto sexual. Un inicio temprano de la vida sexual activa y múltiples compañeros sexuales aumentan el riesgo de padecer CaCu. Casi todas las mujeres con cáncer cervical invasivo presentan evidencia de infección por VPH, sin embargo, no todas las infecciones progresan a lesión maligna, algunas desaparecen en uno o dos años, las que persisten pueden progresar a lesiones premalignas y CaCu, actualmente se considera que la infección es necesaria pero no suficiente para desarrollar CaCu (Woodman et al., 2007; Doorbar et al., 2015, Denny et al., 2015).

Más de 150 VPHs han sido identificados y agrupados en cinco géneros: alfa, beta, gamma, mu y nu. Si un VPH tiene al menos 10% de diferencia en su secuencia de nucleótidos de la región L1 respecto a otros papillomavirus, se le designa como un

tipo distinto. Las partículas virales tienen una estructura icosaédrica sin envoltura de un diámetro aproximado de 55 nm, la cápside se compone de 360 proteínas L1 expuestas en la superficie del virión y un número variable de proteínas L2. Su genoma es una molécula de ADN circular de doble hebra de aproximadamente 8 Kb dividida en tres regiones: temprana, tardía y región larga de control (LCR o región no codificante (NCR). La región temprana codifica para 6 proteínas no estructurales (E1, E2, E4 E5, E6 y E7) y la región tardía para las dos proteínas de la cápside (L1 y L2) (Zheng y Baker, 2006; Doorbar et al., 2015).

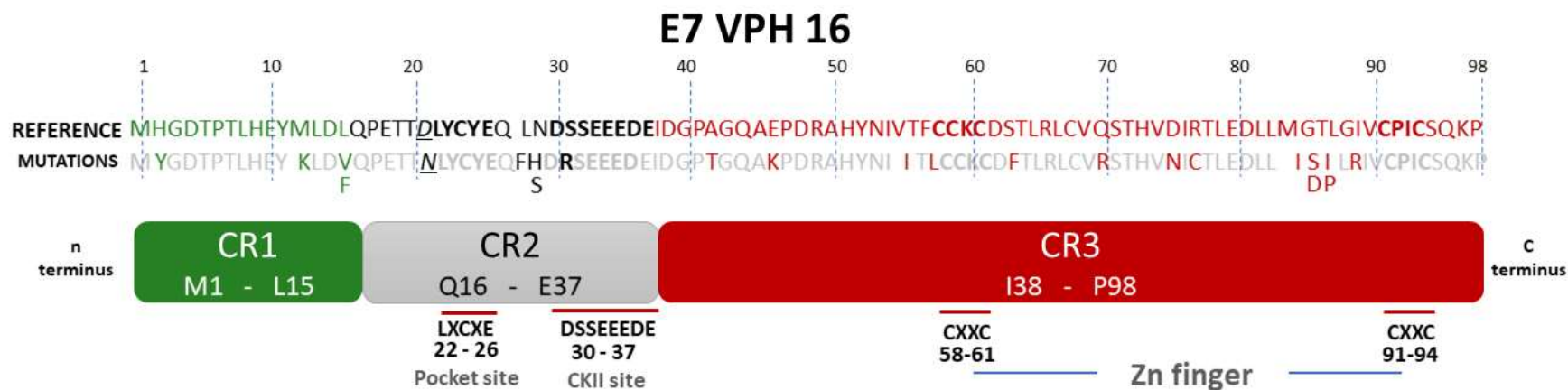
El VPH se puede encontrar en muestras cervicales en forma episomal, integrado o mixto. La integración ocurre generalmente río abajo de los genes E6 y E7 por rompimiento de la región E1 ó E2. La proteína viral E2 tiene la habilidad de reprimir la expresión de los oncogenes E6 y E7, al ocurrir la integración, el gen E2 se fragmenta, pierde su función y esto conlleva a una sobre expresión de E6 y E7 (Woodman et al., 2007). Esto, ha sido demostrado en líneas celulares donde se muestra que la expresión de E7, es más alto en células con VPH 16 integrado por rompimiento de la región E2, comparado con células con VPH 16 episomal (Jeon et al., 1995).

Por su capacidad oncogénica, los VPH se han clasificado en VPH de alto riesgo (y VPH asociados, VPH de probable alto riesgo), de bajo riesgo y de riesgo no determinado. A nivel mundial, los VPH más comunes en muestras cervicales sin lesión son el 16 (3.2%), 18 (1.4%), 52 (0.9), 31 (0.8%) y 58 (0.7%) (Bruni et al., 2010). Entre los 30 tipos de VPH que se conocen infectan el cérvix, los VPH de alto riesgo 16 y 18 están presentes en más del 90 % de los cáncer cervicales invasivos, con una frecuencia del 62.6% y 15.7% respectivamente (Guan et al., 2012; Ramakrishan et al., 2015).

Se ha observado que en CaCu positivos a VPH de alto riesgo el genoma viral se encuentra frecuentemente integrado y que la expresión aumentada de E7 y E6 es esencial para que el fenotipo maligno se mantenga y se desarrolle. Estudios en queratinocitos humanos transfectados con E6 y E7 de VPH de alto riesgo muestran que estas proteínas son necesarias y suficientes para la inmortalización y transformación de los queratinocitos. En cultivos de células epiteliales de prepucio humano con expresión de E6 o E7 VPH 16, se observa que E7 tiene actividad de inmortalización en estas células, pero esto no ocurre cuando se expresa solo E6. Las proteínas E6 y E7 de VPH de bajo riesgo tienen poca o nula actividad de inmortalización (Ghittoni et al., 2010; Jeon et al., 1995; Halbert et al., 1991; Klingelhutz y Roman., 2012).

E7 es una fosfoproteína ácida de 98 aminoácidos y un peso de 21 kD, tiene tres regiones conservadas: CR1 (metionina 1 a leucina 15) y CR2 (glutamina 16 a ácido glutámico 37) en el amino terminal y CR3 (isoleucina 38 a prolina 98) en el carboxilo terminal. El gen de E7 VPH 16 está entre los nucleótidos 562 y 858 del genoma viral (Figura 1) (Phelps et al., 1992; Roman y Munger, 2013).

La proteína E7 del VPH 16 se localiza principalmente en el citoplasma pero también en el núcleo, tiene secuencias de exportación nuclear (aminoácidos 76 al 84) y localización nuclear (Knapp et al., 2009). La vida media de E7 VPH 16 es de menos de una hora (Smotkin y Wettstein, 1987).



**Figura 1. Representación esquemática de E7 VPH 16 de referencia (NC\_001526.3 [562-858]) y sus secuencias aminoacídicas.** Se muestra el alineamiento de las secuencias de referencia de E7 de VPH 16. La CR1 está sombreada en azul, CR2 en naranja y CR3 en gris. El aminoácido 21 que confiere baja o alta afinidad de unión a pRB está en itálica y subrayado; el motivo LXCXE y la secuencia de reconocimiento a CK II está en rojo y negritas; los motivos de unión a Zn<sup>2+</sup> (CXXC) están en negritas. Se esquematizan las posiciones de CR1, CR2 y CR3 y el sitio de unión a pRB, p107, p130 así como el motivo LXCXE, sitio CK II en CR2 y CXXC en CR3.

E7 es fosforilada por casein cinasa II (CK-II) en uno o más residuos de serina, el sitio consenso de reconocimiento se encuentra entre al ácido aspártico 30 y ácido glutámico 37 (D S S E E E D E) del dominio CR2 (Phelps et al., 1992). CK II puede ser inhibida por MRP 8/14 (Proteína relacionada al factor inhibidor de macrófagos), esto causa un descenso en la fosforilación de E7 VPH 16 por CK II. La MRP 8/14 se ha detectado en células normales, pero no en células inmortalizadas, con un incremento 4 veces mayor en la actividad de CK II (Tugizov et al., 2005).

La vida media de E7 VPH 16 es de 30-40 minutos mientras que para E7 VPH 18 es menor a 15 min, esto debido a que E7 es poliubiquitinada en 11 aminoácidos N-terminales y degradada vía proteosoma. Se han identificado a las ligasas E3 SOCS1 y Cull1-Skp2 y la ligasa E2 Ubch7 como componentes de la maquinaria de ubiquitinación de E7, sin embargo, en mutantes negativos de SOCS1 y Cull1-Skp2, E7 logró ser parcialmente ubiquitinada. Estudios *in vitro* e *in vivo* han encontrado que una enzima de deubiquitinación, USP11, se une a E7 y reduce la poliubiquitinación de la oncoproteína. La sobre expresión de USP11 incrementa la vida media de E7 y el bloqueo de USP11 por siRNAs aumenta la degradación de E7 y su actividad transformante *in vitro* (Tabla 2) (Oh et al., 2004; Wilson, 2014; Lin et al., 2008).

**Tabla 2. Moléculas que modifican postraduccionalmente a E7 del VPH 16**

Molécula	Sitio de interacción en E7	Efecto biológico	Referencia
<b>Caseína cinasa II (CKII)</b>	Fosforila en sitios consenso en el dominio de homología CR2 en E7 VPH 16	La fosforilación es más rápida en E7 VPH18 y cuatro veces más rápida en E7 VPH6	Barbosa et al., 1990; Firzalaff et al., 1989
<b>Cinasa 1A dual específica reguladora de fosforilación en tirosina (DYRK1A)</b>	Fosforila los residuos de treonina 5 y 7 de E7 VPH 16	La fosforilación en estos sitios de E7 está ligada a un incremento en la estabilidad de E7 y su actividad transformante.	Liang et al., 2008
<b>Ubch7 (UBE2L3) Ubiquitin ligasa E3 cullina 1/Skp2</b>	Ubiquitinación de E7 VPH16	E7 VPH 16 tiene una vida media de menos de 1 hora y es degradada por proteosoma (Smotkin y Wettstein, 1987)	Oh et al ., 2004
<b>USP11</b>	Desconocido. El dominio box Cys de USP11 es requerido para su actividad sobre E7	Deubiquitina a E7 VPH 16/18	Lin et al., 2008

CR: región conservada.

E7 se asocia a la proteína pRB (proteína supresora de tumor del retinoblastoma) y a las proteínas relacionadas p107 y p130 (Tabla 3). El sitio de unión es el motivo LXCXE (aminoácidos 22 y 26 en VPH 16) en el dominio CR2. pRB por asociación directa, regula negativamente la actividad de varios factores de transcripción, entre ellos a la familia E2F. E2F1-3 activan la transcripción de genes como ciclina E y A que son esenciales para la progresión celular, estos regulan la salida de la fase S y la entrada a G1. En condiciones normales la fosforilación de pRB por CDK rompe el complejo pRB/E2F y la consecuente activación de E2F. La oncoproteína E7 se une a pRB, esto libera a E2F y desestabiliza a pRB por degradación proteosomal. A parte del motivo LXCXE en CR2, se ha encontrado que secuencias en el carboxilo terminal (CR3) de E7 son necesarias para romper el complejo pRB/E2F y que secuencias en CR1 son necesarias para la degradación de pRB. Es interesante que E7 de VPH de bajo riesgo tiene una afinidad de unión con pRB 10 veces más bajo que E7 de los VPH de alto riesgo, esta diferencia en la unión a pRB parece atribuirse al aminoácido previo al motivo de unión a pRB LXCXE, el ácido aspártico en la posición 21 de E7 VPH 16 y glicina en la posición 22 de E7 VPH 6 (Ghittoni et al., 2010; McLaughlin-Drubin y Münger, 2009; Doorbar et al., 2015).

**Tabla 3. Blancos celulares para la proteína E7 de los VPH de alto y bajo riesgo.**

Interacciones de E7: consecuencias funcionales		
Blancos celulares	VPH de alto riesgo	VPH de bajo riesgo
pRB p107 p130	Degradación mediada por proteosoma De-represión de genes del ciclo celular Supervivencia celular Modulación de diferenciación	No degradación de p107, pRB y p130 mediada por proteosoma
p21 p27	Anula la inhibición del ciclo celular	P21: débil anulación de la inhibición del ciclo celular
Ciclina A Ciclina E	Anula la inhibición del ciclo celular	No anula la inhibición del ciclo celular
TBP	Modulación transcripcional	¿?
p300/CBP	Modulación de acetilación y modificación de histona	Débil modulación de acetilación y modificación de histona
MPP2	Modulación transcripcional	No modulación transcripcional
IGFBP-3	Modulación de la señalización de insulina	¿?
Mi2	Reclutamiento de HDAC1 y 2, modulación de transcripción y acetilación de histona	No reclutamiento de HDAC1 y 2, ni modulación de transcripción y acetilación de histona
NuMA	Disociación del complejo NuMA/Dineina Defectos mitóticos	Disociación del complejo NuMA/Dineina Defectos mitóticos
p600	Transformación, crecimiento independiente de anclaje	¿?

NuMa, proteína 1 del aparato mitótico nuclear. Tomada de Pim D y Banks L., 2010.



Varios estudios han mostrado mutaciones en el gen de la oncoproteína E7 del VPH 16 en muestras cervicales con cambios en la secuencia de aminoácidos. Se han encontrado 23 mutaciones en E7 del VPH 16, 4 en la región CR1, 5 en CR2 y 14 en CR3 (Tabla 4).

**Tabla 4. Mutaciones del gen de la oncoproteína E7 del VPH 16.**

Región conservada	Mutaciones de sentido erróneo	Cambio en el aminoácido	Distribución	Referencias
<b>CR1</b>	C565T	H2Y	Grecia	Wu et al., 2006 Cento et al., 2009 Tsakogiannis et al., 2013
	T596A	M12K	Grecia	
	T604G	L15V	Italia	
	G606T	L15F	China	
<b>CR2</b>	G622A	D21N	Congo	Vaeteewoottacharn et al., 2003 Swan et al., 2005 Wu et al., 2006 Cento et al., 2009 Lee et al., 2011 Shang et al., 2011 Boumba et al., 2015 Zhang et al 2015 Zhang et al., 2016
	A645C	L28F	China, Tailandia	
	A646C	N29H	China	
	A647G	N29S	Congo, Corea, China, Texas, Grecia, Tailandia,	
	C654A	S31R	Italia	
<b>CR3</b>	G666A	E46K	Suecia	Hu et al 2001 Wu et al., 2006 Choi et al., 2007 Ding et al., 2010 Tsakogiannis et al., 2013 Yang et al., 2014
	G685A	A42T	Grecia	
	G724A	V55I	China	
	T730C	F57L	China	
	C749T	S63F	China	
	A770G	Q70R	Corea,	
	G784A	D75N	China	
	C790T	R77C	Corea, China	
	G813A	M84I	Grecia	
	G814A	G85S	Grecia	
	G815A	G85D	Grecia	
	C818T	T86I	Grecia	
	A819G	T86P	China	
	G823A	G88R	China	

Li y colaboradores en el 2004 encontraron una forma trunca de E7 del VPH 16 en 7 de un total de 10 pacientes en la provincia Hubei, China, en donde se han reportado

las tasas de mortalidad por CaCU más altas en ese país, encontraron dos mutaciones, una en el codón 43 y la otra en el codón 76, la primera convertía el codón CAA a TAA, un codón de terminación, la segunda fue una mutación sin sentido, la proteína resultante de la primera mutación tiene 43 aa (Li et al., 2004). Un estudio posterior de esta proteína denominada HBE7.16, reveló que la actividad transformante era mayor en células NIH3T3 transfectadas con HBE7.16 comparadas con las transfectadas con E7.16, además el porcentaje de células en fase S y los niveles de expresión de cdc25A y ciclina A fueron mayores (Gao et al., 2009).

Se han realizado diversos estudios para generar mutantes de E7 y observar su efecto sobre su estabilidad, actividad bioquímica y biológica. En la región CR1 se ha observado que la sustitución de ácido aspártico (D-14) o leucina (L-15) por valina resulta en una proteína inestable la cual no se puede detectar por Western blot o marcaje con  $^{35}\text{S}$  en células COS-7 (Phelps et al., 1992).

En la región CR2 la sustitución de serina 32 (S32) por cisteína reduce la estabilidad de la proteína E7 (Phelps et al., 1992). Deleciones en L22-E26 o cambios de Cisteína 24 por serina o ácido glutámico 26 por glutamina en el motivo LXCXE disminuye la habilidad de E7 de unirse a pRB en células COS-7 transfectadas con E7 VPH 16 (Phelps et al., 1992). La fosforilación de E7 por CKII se reduce cuando se sustituye el ácido glutámico 35 por glutamina, y se elimina completamente en las deleciones de serina 31 y 32 (Phelps et al., 1992). Choo y colaboradores observaron en un sistema de doble híbrido en levadura que la mutante T633G (C24W) de E7 VPH 16 disminuye la afinidad de unión E7-pRB (Choo et al., 2000). Mutaciones en la región CR3 resultan en proteínas inestables al sustituir las cisteínas 58 y 59, 61 o 91 (CC/58-59, C61, C91) por serinas (Phelps et al., 1992).

Un estudio en células NIH 3T3 transfectadas con E7 VPH 6 mutadas, mostró que reemplazando la glicina 22 de E7 por ácido aspártico, el aminoácido correspondiente a esa posición en VPH 16, aumentaba la afinidad de E7 por pRB e incrementaba su actividad transformante (San y Barbosa, 1992). Las funciones de transformación en cultivos primarios de células de riñón de rata (BRK) por E7 VPH16 se eliminaron al sustituir cisteína 24 (C24) por serina o ácido glutámico 26 (E26) por glutamina (Phelps et al., 1992).

La variante génica de E7 A647G (N29S) del VPH 16 se ha encontrado en el 70 % de las muestras de cáncer invasivos en pacientes coreanas (Song et al., 1997). Un estudio más reciente en 141 mujeres coreanas reveló que A647G VPH 16 incrementa el riesgo de progresión de NIC II a NIC III de 3.65 y a carcinoma cervical de 9.07 (Lee et al., 2011). En la variante génica A647G cambia el residuo 29 de asparagina a serina, aminoácido de naturaleza amídica a uno hidroxílico, este se encuentra entre el sitio de unión a pRB y el sitio de fosforilación por CK II en CR2. Es interesante que la sustitución de los residuos 29 y 30 (asparagina y ácido aspártico) en E7 VPH 16 por prolinas, no logre la degradación de pRB, y disminuya el porcentaje de células NIH 3T3 transfectadas en fase S (Giarre et al., 2001)

La sustitución de leucina 67 en la región CR3 (L67) por arginina disminuyó la actividad transformante en células BRK (Phelps et al., 1992).

Actualmente no se conocen las variantes génicas de E7 del VPH 16 en muestras cervicales de mujeres guerrerenses ni el impacto que estas mutaciones puedan tener en la aparición y desarrollo de lesiones precursoras y cáncer cervical. Por esta razón y debido al papel importante que tiene la oncoproteína E7 del VPH 16 en la patogénesis viral, nos propusimos investigar las variantes génicas de E7 en muestras cervicales de mujeres guerrerenses que se cuentan en el Biobanco del Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Universidad autónoma de Guerrero.

---

## CAPÍTULO 1



*pathogens*

an Open Access Journal by MDPI



# CERTIFICATE OF PUBLICATION



Certificate of publication for the article titled:

E6/E7 Variants of Human Papillomavirus 16 Associated with Cervical Carcinoma in Women in Southern Mexico

Authored by:

Ramón Antaño-Arias; Oscar Del Moral-Hernández; Julio Ortiz-Ortiz; Luz Del Carmen Alarcón-Romero; Jorge Adán Navor-Hernández; Marco Antonio Leyva-Vázquez; Marco Antonio Jiménez-López; Jorge Organista-Nava; Berenice Illades-Aguilar

Published in:

*Pathogens* 2021, Volume 10, Issue 6, 773



Academic Open Access Publishing  
since 1996

Basel, June 2021



*pathogens*



an Open Access Journal by MDPI

## E6/E7 Variants of Human Papillomavirus 16 Associated with Cervical Carcinoma in Women in Southern Mexico

Ramón Antaño-Arias; Oscar Del Moral-Hernández; Julio Ortiz-Ortiz; Luz Del Carmen Alarcón-Romero; Jorge Adán Navor-Hernández; Marco Antonio Leyva-Vázquez; Marco Antonio Jiménez-López; Jorge Organista-Nava; Berenice Illades-Aguiar

*Pathogens* 2021, Volume 10, Issue 6, 773

## Article

# E6/E7 Variants of Human Papillomavirus 16 Associated with Cervical Carcinoma in Women in Southern Mexico

Ramón Antaño-Arias <sup>1</sup>, Oscar Del Moral-Hernández <sup>2</sup>, Julio Ortiz-Ortiz <sup>1</sup>, Luz Del Carmen Alarcón-Romero <sup>3</sup>, Jorge Adán Navor-Hernández <sup>1</sup>, Marco Antonio Leyva-Vázquez <sup>1</sup>, Marco Antonio Jiménez-López <sup>4</sup>, Jorge Organista-Nava <sup>1</sup> and Berenice Illades-Aguilar <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero CP 39090, Mexico; ramon.a@uagro.mx (R.A.-A.); julioortiz@uagro.mx (J.O.-O.); anavor@uagro.mx (J.A.N.-H.); 02313@uagro.mx (M.A.L.-V.); jorgeorganista@uagro.mx (J.O.-N.); billades@uagro.mx (B.I.-A.)
- <sup>2</sup> Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero CP 39090, Mexico; odelmoral@uagro.mx (O. D.M.-H)
- <sup>3</sup> Laboratorio de Citopatología e Histoquímica de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero CP 39090, Mexico; lcalarcon@uagro.mx (L.D.C. A.-R)
- <sup>4</sup> Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” Acapulco, Guerrero CP 39570, Mexico; director@cancerologiagro.gob.mx (M.A. J.-L.)

\* Correspondence: billades@uagro.mx

**Citation:** Antaño-Arias, R.; Del Moral-Hernández, O.; Ortiz-Ortiz, J.; Alarcón-Romero, L.D.C.; Navor-Hernández, J.A.; Leyva-Vázquez, M.A.; Jiménez-López, M.A.; Organista-Nava, J.; Illades-Aguilar, B. E6/E7 Variants of Human Papillomavirus 16 Associated with Cervical Carcinoma in Women in Southern Mexico. *Pathogens* **2021**, *10*, 773. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060773>

Academic Editors: Anna Rosa Garbuglia and Maria Gabriella Donà

Received: 26 May 2021  
Accepted: 18 June 2021  
Published: 20 June 2021

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Persistent infection with the human papillomavirus 16 (HPV 16) is the cause of half of all cervical carcinomas (CC) cases. Moreover, mutations in the oncoproteins E6 and E7 are associated with CC development. In this study, E6/E7 variants circulating in southern Mexico and their association with CC and its precursor lesions were evaluated. In total, 190 DNA samples were obtained from scrapes and cervical biopsies of women with HPV 16 out of which 61 are from patients with CC, 6 from patients with high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL), 68 from patients with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), and 55 from patients without intraepithelial lesions. For all E7 variants found, the E7-C732/C789/G795 variant (with three silent mutations) was associated with the highest risk of CC (odds ratio (OR) = 3.79, 95% confidence interval (CI) = 1.46–9.85). The analysis of E6/E7 bicistron conferred to AA-a\*E7-C732/C789/G795 variants revealed the greatest increased risk of CC (OR = 110, 95% CI = 6.04–2001.3), followed by AA-c\*E7-C732/C789/G795 and A176/G350\*E7-p. These results highlight the importance of analyzing the combinations of E6/E7 variants in HPV 16 infection and suggest that AA-a\*E7-C732/C789/G795, AA-c\*E7-C732/C789/G795, and A176/G350\*E7-p can be useful markers for predicting CC development.

**Keywords:** human papillomavirus 16; E6; E7; cervical cancer; squamous intraepithelial lesion; E7 non-synonymous mutation

## 1. Introduction

Persistent infection with high-risk human papillomavirus (HR-HPV) is the main cause of cervical carcinoma (CC) and its precursor lesions [1]. Among the HR-HPV types, HPV 16 causes more than half of CC cases worldwide [2,3].

The oncogenicity of HPV 16 is because of the oncoproteins E6 and E7, which promotes cell transformation and immortalization; increase cell proliferation; invasion and migration; and supports immune evasion. E6 induces p53 degradation and prevents cell growth arrest and apoptosis. E7 binds to retinoblastoma proteins p107 and p130 and

causes immortalization and deregulation of cell proliferation and differentiation. Hence, these oncoproteins act together to promote cervical carcinogenesis [4–6].

E6 and E7 genes are located in tandem at the beginning of the HPV 16 genome at nucleotides 104–559 and 562–858, respectively [7], and are initially transcribed as a single bicistronic HPV 16 E6/E7 pre-mRNA. Mature mRNA from the unspliced HPV 16 E6/E7 bicistron encodes both oncoproteins, spliced transcripts, and E6\**I*/E7 and E6\**II*/E7, which are short forms of E6 with intact E7 [8,9].

HPV 16 belongs to the genus *Alphapapillomavirus*, species group A9 [10]. It has intratypic variants associated with premalignant lesion progression and CC development [11–14]. HPV 16 variants have been classified into four lineages: A (European-Asian, EAS), B (African 1, AF1), C (African 2, AF2), and D (North-American/Asian-American, NA/AA). Furthermore, nine sublineages have been described: A1, A2, A3 (European, E), A4 (Asian, As), B1 (Afr1a), B2 (Afr1b), D1 (North-American, NA), D2 (Asian-American, AA1), and D3 (Asian-American, AA2) [12,15]. Most infections worldwide are caused by sublineages A1, A2, and A3 [15,16]. However, sublineage D2 is closely associated with the risk of CC [14].

In Mexico, several E6 variants of HPV 16 have been characterized. In Mexico City, the variants E-G131 (A1) E-G350, E-C188, E-A176 (A2), NA1 (D1), AA-a, and AA-c (D2) were reported and among them the AA variants are more oncogenic than the E variants [17]. In other studies, only the E-G350 (A2) variant was reported [18,19]. In southeastern Mexico, E-Prototype (A1), E-G350 (A2), Af2 (C), and AA (D2) were reported in samples from women with CC [20]. Moreover, in southern Mexico, we previously detected 27 E6 variants of HPV 16 and among them the most frequent and most closely associated with the development of CC were E-G350, E-C188/G350, E-176/G350 (A2), and AA-a and AA-c (D2) [21]. These HPV 16 E6 variants alter the expression of genes involved in proliferation, differentiation, apoptosis, cell cycle, adhesion, angiogenesis, transcription, and protein translation in C33-A cells and are consistent with the oncogenic potential of HPV 16 variants [22].

To date, few studies have focused on the intratypical variants of E7 as compared with those on E6 variants. Nevertheless, several studies demonstrated that non-synonymous mutations in E7 gene can cause amino acid changes. In particular, the variants A647G (NS29) and C749T (S63F) are associated with the progression of premalignant lesions into CC [23–25]. However, in a large study, E7 conservation was found to be significantly associated with CC, whereas E7 mutations were associated with reduced carcinogenicity of HPV 16 [13].

Taken together, a deeper understanding of the regional variants of HPV 16 is needed owing to their important epidemiological, preventive, and therapeutic implications for CC. Hence, the present study had aimed to perform the following: (1) to characterize the E7 genetic variations (since E6 variants circulating in southern Mexico have already been reported); (2) to determine the combinations of E6 and E7 variants in the HPV 16 E6/E7 bicistron in women from southern Mexico; and (3) evaluate the associations between the observed variants alone and in combination with the development of CC and precursor lesions.

## 2. Results

A total of 190 HPV 16 positive women (aged between 17 and 97 years) were included in the study. All participants were residents from the seven regions of the Guerrero state in southern Mexico. The average age of women with CC, high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL), low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), and without intraepithelial lesions was 50.5, 36.3, 30.2, and 35.9 years, respectively. The clinical and demographic characteristics of the patients are presented in Table 1.



**Table 1.** Clinical and demographic characteristics of patients included in the study.

	Non IL		LSIL		HSIL		CC		Total		<i>p</i>
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
<b>Mean age</b>	35.9		30.2		36.3		50.5		38.6		<0.005
											<0.005
				<b>Age</b>							
<31	25	45.45	40	58.82	3	50.00	3	4.92	71	37.37	
31–40	12	21.82	19	27.94	1	16.67	13	21.31	45	23.68	
41–51	9	16.36	7	10.29	2	33.33	19	31.15	37	19.47	
>51	9	16.36	2	2.94	0	0	26	42.62	37	19.47	
				<b>Age at menarche</b>							0.363
<14	32	58.18	43	63.23	3	50	31	50.82	109	57.37	
14–16	23	41.82	21	30.88	3	50	23	37.70	70	36.84	
>16	0	0	3	4.41	0	0	4	6.56	7	3.68	
Did not answer	0	0	1	1.47	0	0	3	4.92	4	2.11	
				<b>Age at menopause</b>							<0.005
<45	3	5.45	1	1.47	1	16.67	11	18.03	16	8.42	
45–49	7	12.73	2	2.94	0	0	13	21.31	22	11.58	
>49	4	7.27	0	0	1	16.67	4	6.56	9	4.74	
No menopause	39	70.91	63	92.65	4	66.67	20	32.79	126	66.32	
Did not answer	2	3.64	2	2.94	0	0	13	21.31	17	8.95	
				<b>Age at first sexual intercourse</b>							<0.005
<16	5	9.09	6	8.82	0	0	18	29.51	29	15.26	
16–20	36	65.45	37	54.41	5	83.33	32	52.46	110	57.89	
>20	14	24.45	24	35.29	1	16.67	8	13.11	47	24.74	
Did not answer	0	0	1	1.47	0	0	3	4.92	4	2.11	
				<b>Geographical region of Guerrero</b>							<0.005
Costa Chica	0	0	1	1.47	0	0	7	11.48	8	4.21	
Costa Grande	0	0	0	0	0	0	9	14.75	9	4.74	
La Montaña	3	5.45	6	8.82	0	0	5	8.20	14	7.37	
Tierra Caliente	1	1.82	0	0	0	0	2	3.28	3	1.58	
Acapulco	5	9.09	6	8.82	0	0	11	18.03	22	11.58	
Zona Centro	41	74.55	51	75.00	6	100	10	16.39	108	56.84	
Zona Norte	2	3.64	3	4.41	0	0	9	14.75	14	7.37	
Did not answer	3	5.45	1	1.47	0	0	8	13.11	12	6.32	
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>100</b>	<b>68</b>	<b>100</b>	<b>6</b>	<b>100</b>	<b>61</b>	<b>100</b>	<b>190</b>	<b>100</b>	

Abbreviations: Non IL, non intraepithelial lesions; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesions; HSIL, high-grade squamous intraepithelial lesions; CC, cervical carcinoma.

### 2.1. E7 Variants of HPV 16

E7 variants in HPV 16 identified in women in southern Mexico with CC, HSIL, LSIL, and non-intraepithelial lesions were analyzed. Eight E7 mutations were found and comprises two missense mutations (A647G and C712A) and six synonymous mutations (G666A, T678C, T732C, C765T, T789C, and T795G). The E7 prototype was detected most frequently (74.74%), followed by the E7-C732/C789/G795 variant (20.53%) with three silent mutations and a genotype that was associated with the highest risk of CC (odd ratio (OR) = 3.79, 95% confidence interval (CI) = 1.46–9.85). Other variants with synonymous mutations were detected, including E7-A666 (2.11%), E7-C678 (0.53%), and E7-T765 (0.53%). Variants with non-synonymous mutations were found in 2.11% (A712) and 0.53% (G647) of the samples (Table 2).

**Table 2.** Frequency of HPV 16 E7 genetic variants and their association with cervical carcinoma and precursor lesions in women from southern Mexico.

Variants	E7 region									Frequency															
	647	666	678	712	732	765	789	795	Aa change in E7 <sup>a</sup>	Non IL		LSIL		HSIL		CC		Total							
	A	G	T	C	T	C	T	T	n	%	n	%	OR (95% CI)	<i>p</i>	n	%	OR (95% CI)	<i>p</i>	n	%	OR (95% CI)	<i>p</i>	n	%	
E7-prototype	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48	87.27	53	77.94	1 <sup>b</sup>	-	3	50.0	1 <sup>b</sup>	-	38	62.29	1 <sup>b</sup>	-	142	74.74
E7-C732/C789/G795	-	-	-	-	c	-	c	g	-	7	12.72	8	11.76	1.03 (0.35–3.07)	0.950	3	50.0	6.86 (1.15–40.9)	0.35	21	34.42	3.79 (1.46–9.85)	0.006	39	20.53
E7-A666	-	a	-	-	-	-	-	-	-	0	0.00	2	2.94	-	-	0	0.00	-	-	2	3.28	-	-	4	2.11
E7-A712	-	-	-	A	-	-	-	-	H51N	0	0.00	2	2.94	-	-	0	0.00	-	-	0	0.00	-	-	2	1.05
E7-C678	-	-	c	-	-	-	-	-	-	0	0.00	1	1.47	-	-	0	0.00	-	-	0	0.00	-	-	1	0.53
E7-T765	-	-	-	-	-	t	-	-	-	0	0.00	1	1.47	-	-	0	0.00	-	-	0	0.00	-	-	1	0.53
E7-G647/C789/G795	G	-	-	-	-	-	c	g	N29S	0	0.00	1	1.47	-	-	0	0.00	-	-	0	0.00	-	-	1	0.53
Total	1	4	1	2	39	1	40	40		55	100	68	100		6	100			61	100			190	100	

Note: Capital letters indicate the mutations that generate amino acid change and lowercase letters indicate mutation without amino acid change. Abbreviations: Non IL, non intraepithelial lesions; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesions; HSIL, high-grade squamous intraepithelial lesions; CC, cervical carcinoma; CI, confidence interval; OR, odd ratio. <sup>a</sup>, the amino acid change prediction was made on HPV 16 reference, sequence NC 1526.3. <sup>b</sup>, indicates reference category (E7-Prototype).

## 2.2. E6/E7 HPV 16 Bicistronic Variants of HPV 16

E6 and E7 variant combinations in the HPV E6/E7 bicistron were analyzed and grouped by sublineage. Four of the nine HPV 16 sublineages were present in the studied population: A1 (12.63%), A2 (66.84%), C1 (0.53%), and D2 (20%).

Mutations in the E6 and E7 genes of HPV 16 were identified in the same patient, and 34 bicistron combinations were detected. The most frequent combination of E6/E7 variants in HPV 16 was the E-G350\*E7-prototype (36.8%), which belongs to the A2 sublineage, and the second most frequent combination was AA-a\*E7-C732/C789/G795 (10%), which belongs to the D2 sublineage. Only 9.5% of the samples had a combination of E6 and E7 prototypes (Table 3).

In order to determine the effect of the combination of E6 and E7 variants in women infected with HPV 16, the risk of CC and its precursor lesions was analyzed. The risk of CC was highest in individuals harboring AA-a\*E7-C732/C789/G795 (OR = 110, 95% CI = 6.04–2001.3), AA-c\*E7-C732/C789/G795 (OR = 35, 95% CI = 2.63–465.37), and E-A176/G350\*E7-prototype (OR = 23.33, 95% CI = 1.99–273.3). The oncogenic risk of the most common bicistronic variant, the E-G350\*E7-prototype, was not statistically significant. The risk of developing CC precursor lesions was not significant for any of the E6/E7 combinations. The E-prototype\*E7-prototype bicistron was used as a reference (Table 3).

## 3. Discussion

The aim of this study was to improve our understanding of HPV 16 variants circulating in southern Mexico owing to its epidemiological, preventive, and therapeutic implications for CC. We have previously reported that the most frequent E6 variants of HPV 16 and those associated with a high risk of developing CC were the European A1 and A2 sublineages (E-G350, E-prototype, E-A176/G350, and E-C188/G350) and Asian-American D2 (AA-a and AA-c) lineages [21]. This is the first study of E7 variants in HPV 16 in Mexico involving the analyses of variant combinations in the HPV E6/E7 bicistron in cervical samples as well as their association with the development of CC and its precursor lesions.

Herein, fewer variants were detected in E7 than in E6 of HPV 16, which in agreement with a previous report [21]. In addition to the numerical difference, only two variants identified—A712 (H51N) and G647 (N29S)—altered the E7 amino acid sequence and were detected at a very low frequency in southern Mexico. However, all the E6 variants showed amino acid changes [21].

Mutations in E7 herein identified were mostly synonymous (G666A, T678C, T732C, C765T, T789C, and T795G). Although these mutations do not change the amino acid residues of the oncoprotein, they are present at a high frequency in CC as is the case with the E7-C732/C789/G795 variant, which is associated with a 3.79 times higher risk of developing this pathology than compared with the E7-prototype. Moreover, E7-C732/C789/G795 was the second most frequent variant after the E7-prototype. What is noteworthy is that these three silent mutations were previously reported in Panama, United States, Suriname, Thailand, and India where they were found in patients with CC [26–30]. However, these reports did not evaluate the potential associations between the C732/C789/G795 variants in E7 of HPV 16 and the development of CC. The E7 variant that was previously reported to be associated with CC was E7-G647 [24,31], while in this study it was E7-C732/C789/G795. Although synonymous mutations do not modify the amino acid sequence of the oncoprotein, they may affect the structure, splicing, or stability of the RNA [32,33], thus contributing to oncogenicity; however, further studies are required to evaluate the precise effects. Taken together, these data emphasize the importance of analyzing local E7 variants and their association with the development of CC.

The distribution of HPV 16 E7 variants differs worldwide. In the American continent, the most reported variant is E7-C732/C789/G795; in Africa, it is E7-C789/G795; in Asia, they are E7-G647/C846, E7-G647, E7-C646, E7-A666, and E7-C732/C789/G795; and in Europe they are E7-C732/T749/G795, E7-G822, and E7-C789/G795 (Table 4). In this study, the most frequent E7 variant was E7-C732/C789/G795, which concurs with what has been reported in other countries in the American continent.

**Table 3.** Frequency of combinations of E6 and E7 variants in the HPV 16 E6/E7 bicistron and its associations with cervical carcinoma and precursor lesions.

Sublineage	E6 variants	E7 variants	Non IL				LSIL			HSIL			CC			Total		
			n	%	n	%	OR (95% IC)	p	n	%	OR (95% IC)	p	n	%	OR (95% IC)	p	n	%
A1			13	23.6	7	10.3			1	16.7		3	4.9			24	12.6	
	E-prototype	E7-prototype	10	18.2	7	10.3	1a	-	0	0	-	-	1	1.6	1a	-	18	9.5
	E-prototype	E7-732/C789/G795	1	1.8	0	0	-	-	1	16.7	-	-	0	0	-	-	2	1.1
	E-G131	E7-prototype	1	1.8	0	0	-	-	0	0	-	-	2	3.3	20 (0.85–471.57)	0.063	3	1.6
	E-G131	E7-732/C789/G795	1	1.8	0	0	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	1	0.5
A2			38	69.1	51	75			2	33.3		36	59			127	66.8	
	E-G350	E7-prototype	23	41.8	29	42.6	1.8 (0.59–5.47)	0.29	2	33.3	-	-	16	26.2	6.95 (0.8–59.9)	0.08	70	36.8
	E-G350	E7-A666	0	0	2	2.9	-	-	0	0	-	-	2	3.3	-	-	4	2.1
	E-G350	E7-A712	0	0	1	1.5	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	1	0.5
	E-G350	E7-T765	0	0	1	1.5	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	1	0.5
	E-G350	E7-732/C789/G795	2	3.6	0	0	-	-	0	0	-	-	1	1.6	5 (0.21–117.89)	0.32	3	1.6
	E-C109/G350	E7-prototype	0	0	1	1.5	-	-	0	0	-	-	2	3.3	-	-	3	1.6
	E-G110/G350	E7-prototype	1	1.8	1	1.5	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	2	1.1
	E-G131/G350	E7-prototype	0	0	0	0	-	-	0	0	-	-	1	1.6	-	-	1	0.5
	E-131/C188/G350	E7-prototype	1	1.8	1	1.5	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	2	1.1
	E-A176/G350	E7-prototype	3	5.5	2	2.9	0.95 (0.12–7.28)	0.96	0	0	-	-	7	11.5	23.33 (1.99–273.3)	0.012	12	6.3
	E-A176/G350	E7-732/C789/G795	0	0	0	0	-	-	0	0	-	-	1	1.6	-	-	1	0.5
	E-C182/G350	E7-prototype	1	1.8	1	1.5	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	2	1.1
	E-T182/G350	E7-prototype	0	0	0	0	-	-	0	0	-	-	1	1.6	-	-	1	0.5
	E-C183/G350	E7-prototype	3	5.5	1	1.5	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	4	2.1
	E-G185/G350	E7-prototype	0	0	0	0	-	-	0	0	-	-	1	1.6	-	-	1	0.5
	E-A188/G350	E7-prototype	0	0	0	0	-	-	0	0	-	-	1	1.6	-	-	1	0.5
	E-C188/G350	E7-prototype	2	3.6	5	7.4	-	-	0	0	-	-	3	4.9	-	-	10	5.3
	E-C188/G350	E7-C678	0	0	1	1.5	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	1	0.5
	E-C188/G350	E7-A712	0	0	1	1.5	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	1	0.5
	E-C188/G310/G350	E7-prototype	1	1.8	1	1.5	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	2	1.1
	E-G189/T256/G350	E7-prototype	0	0	1	1.5	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	1	0.5
	E-G257/G350	E7-prototype	0	0	1	1.5	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	1	0.5
	E-C442/G350	E7-prototype	1	1.8	0	0	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	1	0.5
	E-G535/G350	E7-prototype	0	0	1	1.5	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	1	0.5
	C1			0	0	1	1.5			0	0		0	0			1	0.5
		Af2-a/C109/G403	E7-647/C789/G795	0	0	1	1.5	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	1
D2			4	7.3	9	13.2			3	50		22	36.1			38	20.0	
	AA-a	E7-prototype	1	1.8	1	1.5	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	2	1.1
	AA-a	E7-732/C789/G795	1	1.8	5	7.4	7.14 (0.68–75.22)	0.10	2	33.3	-	-	11	18	110 (6.04–2001.3)	0.001	19	10.0
	AA-c	E7-prototype	0	0	0	0	-	-	1	16.7	-	-	3	4.9	-	-	4	2.1
	AA-c	E7-732/C789/G795	2	3.6	3	4.4	2.14 (0.28–16.37)	0.46	0	0	-	-	7	11.5	35 (2.63–465.37)	0.007	12	6.3
AA-c/G185	E7-732/C789/G795	0	0	0	0	-	-	0	0	-	-	1	1.6	-	-	1	0.5	
Total			55	100	68	100			6	100		61	100			190	100	

Abbreviations: Non IL, non intraepithelial lesions; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesions; HSIL, high-grade squamous intraepithelial lesions; CC, cervical carcinoma; CI, confidence interval; OR, odd ratio. <sup>a</sup>Indicates reference category (E-prototype\*E7-Prototype).

Table 4. Most frequent HPV 16 E7 variants reported around the world.

Variant	E7 HPV16 Variant								E7-prototype				Country	Reference
	Total		CC	Non-IL/SIL		Total		CC	Total		CC			
	N	N		N	N	%	N		%	N		%		
<b>Africa</b>														
E7-C789/G795	21	21	0	9	43	9	43	3	14	3	14	Tanzania	Eschle et al., 1992 [34]	
E7-C789/G795	5	3	2	5	100	3	100	0	0	0	0	Uganda	Buonaguro et al., 2000 [35]	
E7-C789/G795	13	13	0	13	100	13	100	0	0	0	0	Congo	Boumba et al., 2015 [36]	
<b>America</b>														
E7-C732/C789/G795	190	61	129	39	21	21	34	142	75	38	62	Mexico	This study	
E7-C732/C789/G795	100	0	100	16	16	0	0	72	72	0	0	EU(Texas)	Swan et al., 2005 [28]	
E7-C732/C789/G795	25	25	0	3	12	3	12	15	60	15	60	Suriname	De Boer et al., 2004 [27]	
E7-C732/C789/G795	15	ND	ND	3	20	ND	ND	8	53	ND	ND	Panama, EU	Icenogle et al., 1991 [26]	
E7-A712	12	0	12	2	17	0	0	6	50	0	0	Uruguay	Ramas et al., 2018 [37]	
E7-C789/G795	11	11	0	6	55	6	55	3	27	3	27	Barbados	Smits et al., 1994 [38]	
E7-C732	52	ND	ND	7	13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Costa Rica	Safaenian et al., 2010 [39]	
E7-C789	52	ND	ND	8	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Costa Rica	Safaenian et al., 2010 [39]	
E7-G795	52	ND	ND	8	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Costa Rica	Safaenian et al., 2010 [39]	
<b>Asia</b>														
E7-G647/C846	292	0	292	125	43	0	0	125	43	0	0	China	Zhang et al., 2015 [40]	
E7-G647/C846	167	53	114	126	75	37	70	7	4	2	4	China	Ding et al., 2010 [41]	
E7-G647/C846	98	0	98	63	64	0	0	14	14	0	0	China	Zhao et al., 2020 [42]	
E7-G647/C846	97	0	97	62	64	0	0	13	13	0	0	China	Cao et al., 2016 [43]	
E7-G647/C846	76	76	0	26	34	26	34	15	20	15	20	China	Sun et al., 2012 [44]	
E7-G647/C846	47	47	0	29	62	29	62	0	0	0	0	China	Wu et al., 2006 [23]	
E7-G647/C846	58	38	20	36	62	26	68	ND	ND	1	3	China	Yang et al., 2014 [45]	
E7-G647/C846	157	43	114	128	82	41	95	4	3	ND	ND	Taiwan	Chang et al., 2013 [31]	
E7-G647/C846	15	9	6	6	40	5	56	3	20	2	22	Japan	Fujinaga et al., 1994 [46]	
E7-G647/C846	31	0	31	18	58	0	0	2	10	0	0	Japan	Ishizaki et al., 2013 [47]	
E7-G647/C846	24	0	24	5	21	0	0	18	75	0	0	Philippines	Ishizaki et al., 2013 [47]	
E7-G647/C846	24	0	24	20	83	0	0	0	0	0	0	Vietnam	Ishizaki et al., 2013 [47]	
E7-G647/C846	9	9	0	3	33	3	33	3	33	3	33	Thailand	Chansaenroj et al., 2012 [29]	
E7-C732/C789/G795	9	9	0	3	33	3	33	3	33	3	33	Thailand	Chansaenroj et al., 2012 [29]	

Table 4. Cont

Variant	E7 HPV16 Variant						E7-prototype				Country	Reference	
	Total	CC	Non-IL/SIL	Total	CC	Total	CC	Total	CC				
	N	N	N	N	%	N	%	N	%	N	%		
<b>Asia</b>													
E7-G647	141	25	116	63	45	18	72	55	39	5	20	Korea	Lee et al., 2011 [24]
E7-G647	133	31	102	118	89	55	41	15	11	2	7	Korea	Park et al., 2016 [48]
E7-G647	56	0	56	36	64	0	0	7	13	0	0	Korea	Choi et al., 2007 [49]
E7-G647	42	27	15	25	60	19	70	8	19	3	11	Korea	Song et al., 1997 [50]
E7-G647	143	81	62	54	38	29	36	ND	ND	ND	ND	India	Radhakrishna Pillai et al., 2002 [51]
E7-G647	43	43	0	1	2	1	2	42	98	42	98	China	He et al., 2016 [52]
E7-G647	31	0	31	24	77	0	0	ND	ND	0	0	China	Zhao et al., 2019 [53]
E7-G647	31	31	0	19	61	19	61	9	29	9	29	Thailand	Vaeteewoottacharn et al., 2003 [54]
E7-C646	100	0	100	21	21	0	0	ND	ND	0	0	China	Zhang et al., 2016 [55]
E7-A666	52	52	0	20	39	20	39	8	15	8	15	China	Shang et al., 2011 [56]
E7-A666	22	22	0	15	68	15	68	2	9	2	9	Indonesia	De Boer et al., 2004 [27]
E7-C789/G795	60	60	0	3	5	3	5	52	87	52	87	India (North)	Pande et al., 2008 [57]
E7-C732/C789/G795	110	94	16	12	11	11	12	95	86	80	85	India	Mazumder Indra et al., 2011 [30]
<b>Europe</b>													
E7-C732/T749/G795	124	28	96	8	7	4	14	103	83	19	68	Romania	Plesa et al., 2014 [58]
E7-G822	112	37	75	15	13	4	11	89	80	32	87	Germany	Nindl et al., 1999 [59]
E7-G822	61	31	30	4	7	2	7	55	90	27	87	Sweden	Hu et al., 2001 [60]
E7-G822	40	40	0	2	5	2	5	35	88	35	88	Slovenia	Vrtačnik Bokal et al., 2010 [61]
E7-C789/G795	90	36	54	10	11	4	11	71	79	24	67	Italy	Tornesello et al., 2004 [62]
E7-C789/G795	14	0	14	1	7	0	0	13	93	0	0	Italy	Garbuglia et al., 2007 [63]
E7-C789/G795	27	27	0	3	11	3	11	21	78	21	78	Netherlands	De Boer et al., 2004 [27]
E7-C732/C789/G795	29	0	29	1	3	0	0	27	93	0	0	Italy	Cento et al., 2009 [64]
E7-T616	8	3	5	1	13	1	33	7	88	2	67	Netherlands	Smits et al., 1994 [38]
-	6	6	0	0	0	0	0	6	100	6	100	Germany	Eschle et al., 1992 [34]

The complementary and synergistic effects of the HPV 16 oncoproteins E6 and E7 play a critical role in malignant transformation and cell immortalization [1]. There is extensive evidence that HPV 16 E6 and E7 mutations influence persistence, progression to precursor lesions, and the development of CC [12]. The differential oncogenic risk among variants of each oncoprotein has been studied; however, it is also necessary to analyze the oncogenic risk of combinations of E6/E7 variants.

One of the few studies on the oncogenic risk of the E6/E7 variant combination in HPV 16 focused on Korean women, in which the E6 T178G and E7 A647G (As\*E7-G647) combination was the most prevalent and showed a significant association with the severity of cervical neoplasia [24]. In the present study, we found that individuals carrying the AA-a\*E7-C732/C789/G795 combination possess the highest risk of CC (OR = 110), further suggesting that there may be a synergistic effect between the loci, as is evidenced by the lower risk for each locus individually (OR = 69.01 for AA-a of E6 [21] and 3.79 for E7-C732/C789/G795 in this study). The combinations of AA-c\*E7-C732/C789/G795 and E-A176/G350\*E7-prototype were also related to the risk of progression of precursor lesions to CC.

In conclusion, this is the first study of E7 variants of HPV 16 in Mexican women. Notably, E7-C732/C789/G795, a variant with three silent mutations, was associated with the risk of developing CC. These results highlight the importance of analyzing combinations of E6 and E7 variants in HPV 16 and suggest that AA-a\*E7-C732/C789/G795, AA-c\*E7-C732/C789/G795, and E-A176/G350\*E7-prototype can be useful markers for predicting the progression of premalignant lesions and CC development.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Clinical Specimens and Diagnosis

The study enrolled 190 women, aged between 17 and 97 years old, who had all been identified as HPV 16 positive and were all residents of the Guerrero state in southern Mexico. Overall, 61 samples were from patients with CC, 6 samples were from patients with HSIL, 68 samples were from patients with LSIL, and 55 samples were from patients with no intraepithelial lesions. Cervical samples were obtained between 1997 and 2015 from cervical biopsies with histological diagnosis according to the FIGO classification system [65] or from cervical scrapes, with cytological diagnosis according to the Bethesda system [66]. Cervical scrapes (LSIL and no intraepithelial lesions) were collected using cytobrushes in a lysis buffer (10 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0 and 0.5% sodium dodecyl sulfate) and the biopsies of women with HSIL or CC were immediately eluted in phosphate-buffered saline and stored at  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  until DNA extraction. DNA extraction was performed as previously described [67]. Briefly, the SDS-proteinase K-phenol-chloroform method [68] was used for DNA extraction from cervical scrapes and biopsies and the DNA was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. The DNA integrity was evaluated by the amplification of the beta-globin gene [69]. All women without HPV 16 infection or from whom amplification of E6 and E7 genes was not obtained were excluded from the analysis. This study was approved by the Bioethical Committee of the Autonomous University of Guerrero and informed consent was obtained from all participants when the samples were collected.

##### 4.2. Identification of HPV 16 E6/E7 Bicistronic Variants

E6 variants were identified as previously described [21]. HPV 16 E7 gene was amplified using the primers E7-F509 (5'-TGTATGTCTTGTTCAGCA-3') and E7-R917 (5'-CATCCATTACATCCCGTA-3'), which amplify a 409 bp region. Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a final volume of 25  $\mu\text{L}$  containing the DNA template, 2.5  $\mu\text{L}$  of 10 $\times$  PCR buffer, 0.3 mM dNTPs, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.36  $\mu\text{M}$  of each primer, and 0.7 U Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (EP0602; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For positive and

negative controls, reactions with 300 ng of DNA from SiHa or CaSki cells and H<sub>2</sub>O, respectively, were performed. PCR was performed using a Mastercycler EP Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) as follows: initial denaturation at 95 °C for 4 min, followed by 40 cycles of 60 s at 95 °C for denaturation, 30 s at 57 °C for E6 and 51 °C for E7 for annealing, and 30 s at 72 °C for extension, with a final extension at 72 °C for 5 min. Correct amplification products were verified using DNA electrophoresis in an agarose gel.

Sequencing was performed using Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) and the PCR products were purified using 75% isopropanol and loaded onto an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. All sequences were analyzed and aligned using Finch TV v. 1.4.0 (Geospiza Inc., Denver, CO, USA) and William Pearson's LALIGN ([https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN\\_form.html](https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html)) (accessed on 19 June 2021), respectively. The FASTA sequence of the reference HPV 16 NC 1526.3 was used for the alignment and for the identification of E7 variants. Sequence data are publicly available in the GenBank database (accession numbers: MW452666-MW452855).

#### 4.3. Statistical Analysis

Data was analyzed using the STATA v.11 software (StataCorp, College Station, TX, USA). Chi-square test was performed for analyzing E7 and E6/E7 genetic variants and lesions. The age-adjusted ORs and 95% CI were calculated for the E7 variant and E6/E7 bicistronic variants. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

**Author Contributions:** Conceptualization, B.I.-A. and R.A.-A.; methodology, R.A.-A., O.D.M.-H., and M.A.L.-V.; validation, J.O.-O.; experimental assays, R.A.-A., J.A.N.-H., and L. de C.A.-R.; formal analysis, R.A.-A. and O.D.M.-H.; resources, M.A.J.-L.; writing—original draft preparation, R.A.-A.; writing—review and editing, B.I.-A. and J.O.-N.; project administration, B.I.-A.; funding acquisition, B.I.-A.

**Funding:** This study was supported by a grant from CONACYT, Mexico (Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT, grant number 288612).

**Institutional Review Board Statement:** This study was conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the Bioethical Committee of the Universidad Autónoma de Guerrero.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all participants.

**Data Availability Statement:** Data generated and analyzed in this study are available upon request from the authors. The sequence data are available in GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (accessed on 19 June 2021) with the accession numbers MW452666-MW452855.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to Natividad Sales Linares for her expert technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that there are no conflicts of interests.

## References

1. Zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2002, 2, 342–350, doi:10.1038/nrc798.
2. De Sanjose, S.; Quint, W.G.; Alemany, L.; Geraets, D.T.; Klaustermeier, J.E.; Lloveras, B.; Tous, S.; Felix, A.; Bravo, L.E.; Shin, H.R.; et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010, 11, 1048–1056, doi:10.1016/s1470-2045(10)70230-8.
3. Guan, P.; Howell-Jones, R.; Li, N.; Bruni, L.; de Sanjosé, S.; Franceschi, S.; Clifford, G.M. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int. J. Cancer* 2012, 131, 2349–2359, doi:10.1002/ijc.27485.
4. Ghittoni, R.; Accardi, R.; Hasan, U.; Gheit, T.; Sylla, B.; Tommasino, M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 2010, 40, 1–13, doi:10.1007/s11262-009-0412-8.
5. Boulouvar, S.; Weyn, C.; Van Noppen, M.; Moussa, A.M.; Favre, M.; Delvenne, P.O.; Bex, F.; Noël, A.; Englert, Y.; Fontaine, V. Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. *Carcinogenesis* 2010, 31, 473–480, doi:10.1093/carcin/bgp281.



6. Hu, D.; Zhou, J.; Wang, F.; Shi, H.; Li, Y.; Li, B. HPV-16 E6/E7 promotes cell migration and invasion in cervical cancer via regulating cadherin switch in vitro and in vivo. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2015, 292, 1345–1354, doi:10.1007/s00404-015-3787-x.
7. Zheng, Y.; Zhang, J.; Rao, Z. Ribozyme targeting HPV16 E6/E7 transcripts in cervical cancer cells suppresses cell growth and sensitizes cells to chemotherapy and radiotherapy. *Cancer Biol. Ther.* 2004, 3, 1129–1134; discussion 1135–1126, doi:10.4161/cbt.3.11.1215.
8. Stacey, S.N.; Jordan, D.; Snijders, P.J.; Mackett, M.; Walboomers, J.M.; Arrand, J.R. Translation of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from bicistronic mRNA is independent of splicing events within the E6 open reading frame. *J. Virol.* 1995, 69, 7023–7031, doi:10.1128/jvi.69.11.7023-7031.1995.
9. Del Moral-Hernández, O.; López-Urrutia, E.; Bonilla-Moreno, R.; Martínez-Salazar, M.; Arechaga-Ocampo, E.; Berumen, J.; Villegas-Sepúlveda, N. The HPV-16 E7 oncoprotein is expressed mainly from the unspliced E6/E7 transcript in cervical carcinoma C33-A cells. *Arch. Virol.* 2010, 155, 1959–1970, doi:10.1007/s00705-010-0787-9.
10. De Villiers, E.M.; Fauquet, C.; Broker, T.R.; Bernard, H.U.; zur Hausen, H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004, 324, 17–27, doi:10.1016/j.virol.2004.03.033.
11. Xi, L.F.; Koutsky, L.A.; Hildesheim, A.; Galloway, D.A.; Wheeler, C.M.; Winer, R.L.; Ho, J.; Kiviat, N.B. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2007, 16, 4–10, doi:10.1158/1055-9965.epi-06-0670.
12. Burk, R.D.; Harari, A.; Chen, Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology* 2013, 445, 232–243, doi:10.1016/j.virol.2013.07.018.
13. Mirabello, L.; Yeager, M.; Yu, K.; Clifford, G.M.; Xiao, Y.; Zhu, B.; Cullen, M.; Boland, J.F.; Wentzensen, N.; Nelson, C.W.; et al. HPV16 E7 Genetic Conservation Is Critical to Carcinogenesis. *Cell* 2017, 170, 1164–1174.e1166, doi:10.1016/j.cell.2017.08.001.
14. Mirabello, L.; Yeager, M.; Cullen, M.; Boland, J.F.; Chen, Z.; Wentzensen, N.; Zhang, X.; Yu, K.; Yang, Q.; Mitchell, J.; et al. HPV16 Sublineage Associations With Histology-Specific Cancer Risk Using HPV Whole-Genome Sequences in 3200 Women. *J. Natl. Cancer Inst.* 2016, 108, doi:10.1093/jnci/djw100.
15. Cornet, I.; Gheit, T.; Franceschi, S.; Vignat, J.; Burk, R.D.; Sylla, B.S.; Tommasino, M.; Clifford, G.M. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J. Virol.* 2012, 86, 6855–6861, doi:10.1128/jvi.00483-12.
16. Cornet, I.; Gheit, T.; Clifford, G.M.; Combes, J.D.; Dalstein, V.; Franceschi, S.; Tommasino, M.; Clavel, C. Human papillomavirus type 16 E6 variants in France and risk of viral persistence. *Infect. Agents Cancer* 2013, 8, 4, doi:10.1186/1750-9378-8-4.
17. Berumen, J.; Ordoñez, R.M.; Lazcano, E.; Salmeron, J.; Galvan, S.C.; Estrada, R.A.; Yunes, E.; Garcia-Carranca, A.; Gonzalez-Lira, G.; Madrigal-de la Campa, A. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001, 93, 1325–1330, doi:10.1093/jnci/93.17.1325.
18. Pérez-Quintanilla, M.; Méndez-Martínez, R.; Vázquez-Vega, S.; Espinosa-Romero, R.; Sotelo-Regil, R.; Pérez-Montiel, M.D.; Ramos-Alamillo, U.; Cabrera-López, T.J.; Barquet-Muñoz, S.A.; Pérez-Plascencia, C.; et al. High prevalence of human papillomavirus and European variants of HPV 16 infecting concomitantly to cervix and oral cavity in HIV positive women. *PLoS ONE* 2020, 15, e0227900, doi:10.1371/journal.pone.0227900.
19. Escobar-Escamilla, N.; González-Martínez, B.E.; Araiza-Rodríguez, A.; Fragoso-Fonseca, D.E.; Pedroza-Torres, A.; Landa-Flores, M.G.; Garcés-Ayala, F.; Mendieta-Condado, E.; Díaz-Quirón, J.A.; Castro-Escarpulli, G.; et al. Mutational landscape and intra-host diversity of human papillomavirus type 16 long control region and E6 variants in cervical samples. *Arch. Virol.* 2019, 164, 2953–2961, doi:10.1007/s00705-019-04407-6.
20. González-Losa M. del R.; Rosado-Lopez, I.; Valdez-González, N.; Puerto-Solís, M. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients. *J. Clin. Virol.* 2004, 29, 202–205, doi:10.1016/s1386-6532(03)00138-0.
21. Ortiz-Ortiz, J.; Alarcón-Romero L. del C.; Jiménez-López, M.A.; Garzón-Barrientos, V.H.; Calleja-Macías, I.; Barrera-Saldaña, H.A.; Leyva-Vázquez, M.A.; Illades-Aguiar, B. Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virol. J.* 2015, 12, 29, doi:10.1186/s12985-015-0242-3.
22. Zacapala-Gómez, A.E.; Del Moral-Hernández, O.; Villegas-Sepúlveda, N.; Hidalgo-Miranda, A.; Romero-Córdoba, S.L.; Beltrán-Anaya, F.O.; Leyva-Vázquez, M.A.; Alarcón-Romero L. del C.; Illades-Aguiar, B. Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. *Virology* 2016, 488, 187–195, doi:10.1016/j.virol.2015.11.017.
23. Wu, Y.; Chen, Y.; Li, L.; Yu, G.; He, Y.; Zhang, Y. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J. Gen. Virol.* 2006, 87, 1181–1188, doi:10.1099/vir.0.81649-0.
24. Lee, C.W.; Bae, J.H.; Lee, S.J.; Ho, E.M.; Lee, I.H.; Park, Y.G.; Park, J.S. Distribution of human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variants in the progression of cervical dysplasia in Korean women. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2011, 37, 1320–1326, doi:10.1111/j.1447-0756.2010.01520.x.
25. Zine El Abidine A.; Tomaić, V.; Bel Haj Rhouma R.; Massimi, P.; Guizani, I.; Boubaker, S.; Ennaifer, E.; Banks, L. A naturally occurring variant of HPV-16 E7 exerts increased transforming activity through acquisition of an additional phospho-acceptor site. *Virology* 2017, 500, 218–225, doi:10.1016/j.virol.2016.10.023.
26. Icenogle, J.P.; Sathya, P.; Miller, D.L.; Tucker, R.A.; Rawls, W.E. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16. *Virology* 1991, 184, 101–107, doi:10.1016/0042-6822(91)90826-w.
27. De Boer, M.A.; Peters, L.A.; Aziz, M.F.; Siregar, B.; Cornain, S.; Vrede, M.A.; Jordanova, E.S.; Kolkman-Uljee, S.; Fleuren, G.J. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol. Oncol.* 2004, 94, 488–494, doi:10.1016/j.ygyno.2004.05.037.
28. Swan, D.C.; Rajeevan, M.; Tortolero-Luna, G.; Follen, M.; Tucker, R.A.; Unger, E.R. Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. *Gynecol. Oncol.* 2005, 96, 695–700, doi:10.1016/j.ygyno.2004.11.045.

29. Chansaenroj, J.; Theamboonlers, A.; Junyangdikul, P.; Swangvaree, S.; Karalak, A.; Poovorawan, Y. Whole genome analysis of human papillomavirus type 16 multiple infection in cervical cancer patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012, *13*, 599–606, doi:10.7314/apjcp.2012.13.2.599.
30. Mazumder Indra D.; Singh, R.K.; Mitra, S.; Dutta, S.; Chakraborty, C.; Basu, P.S.; Mondal, R.K.; Roychoudhury, S.; Panda, C.K. Genetic and epigenetic changes of HPV16 in cervical cancer differentially regulate E6/E7 expression and associate with disease progression. *Gynecol. Oncol.* 2011, *123*, 597–604, doi:10.1016/j.ygyno.2011.08.004.
31. Chang, Y.J.; Chen, H.C.; Pan, M.H.; Lee, B.H.; You, S.L.; Lin, C.Y.; Chou, Y.C.; Hsieh, C.Y.; Cheng, Y.J.; Liaw, K.L.; et al. Intratypic variants of human papillomavirus type 16 and risk of cervical neoplasia in Taiwan. *J. Med. Virol.* 2013, *85*, 1567–1576, doi:10.1002/jmv.23651
32. Bali, V.; Bebok, Z. Decoding mechanisms by which silent codon changes influence protein biogenesis and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015, *64*, 58–74, doi:10.1016/j.biocel.2015.03.011.
33. Hunt, R.; Sauna, Z.E.; Ambudkar, S.V.; Gottesman, M.M.; Kimchi-Sarfaty, C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol. Biol.* 2009, *578*, 23–39, doi:10.1007/978-1-60327-411-1\_2.
34. Eschle, D.; Dürst, M.; ter Meulen, J.; Luande, J.; Eberhardt, H.C.; Pawlita, M.; Gissmann, L. Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* 1992, *73* Pt 7, 1829–1832, doi:10.1099/0022-1317-73-7-1829.
35. Buonaguro, F.M.; Tornesello, M.L.; Salatiello, I.; Okong, P.; Buonaguro, L.; Beth-Giraldo, E.; Biryahwaho, B.; Sempala, S.D.; Giraldo, G. The uganda study on HPV variants and genital cancers. *J. Clin. Virol.* 2000, *19*, 31–41, doi:10.1016/s1386-6532(00)00131-1.
36. Boumba, L.M.; Assoumou, S.Z.; Hilali, L.; Mambou, J.V.; Moukassa, D.; Ennaji, M.M. Genetic variability in E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus Type 16 from Congolese cervical cancer isolates. *Infect. Agents Cancer* 2015, *10*, 15, doi:10.1186/s13027-015-0010-4.
37. Ramas, V.; Mirazo, S.; Bonilla, S.; Ruchansky, D.; Arbiza, J. Analysis of human papillomavirus 16 E6, E7 genes and Long Control Region in cervical samples from Uruguayan women. *Gene* 2018, *654*, 103–109, doi:10.1016/j.gene.2018.02.023.
38. Smits, H.L.; Traanberg, K.F.; Krul, M.R.; Prussia, P.R.; Kuiken, C.L.; Jebbink, M.F.; Kleyne, J.A.; van den Berg, R.H.; Capone, B.; de Bruyn, A.; et al. Identification of a unique group of human papillomavirus type 16 sequence variants among clinical isolates from Barbados. *J. Gen. Virol.* 1994, *75* Pt 9, 2457–2462, doi:10.1099/0022-1317-75-9-2457.
39. Safaeian, M.; van Doorslaer, K.; Schiffman, M.; Chen, Z.; Rodriguez, A.C.; Herrero, R.; Hildesheim, A.; Burk, R.D. Lack of heterogeneity of HPV16 E7 sequence compared with HPV31 and HPV73 may be related to its unique carcinogenic properties. *Arch. Virol.* 2010, *155*, 367–370, doi:10.1007/s00705-009-0579-2.
40. Zhang, L.; Liao, H.; Yang, B.; Geffre, C.P.; Zhang, A.; Zhou, A.; Cao, H.; Wang, J.; Zhang, Z.; Zheng, W. Variants of human papillomavirus type 16 predispose toward persistent infection. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015, *8*, 8453–8459.
41. Ding, T.; Wang, X.; Ye, F.; Cheng, X.; Lu, W.; Xie, X. Distribution of human papillomavirus 16 E6/E7 variants in cervical cancer and intraepithelial neoplasia in Chinese women. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2010, *20*, 1391–1398, doi:10.1111/IGC.0b013e3181eced04.
42. Zhao, J.; Zhu, J.; Guo, J.; Zhu, T.; Zhong, J.; Liu, M.; Ruan, Y.; Liao, S.; Li, F. Genetic variability and functional implication of HPV16 from cervical intraepithelial neoplasia in Shanghai women. *J. Med. Virol.* 2020, *92*, 372–381, doi:10.1002/jmv.25618.
43. Cao, M.; Chenzhang, Y.; Ding, X.; Zhang, Y.; Jing, Y.; Chen, Z. Genetic variability and lineage phylogeny of human papillomavirus type-16 and -53 based on the E6, E7, and L1 genes in Southwest China. *Gene* 2016, *592*, 49–59, doi:10.1016/j.gene.2016.07.039.
44. Sun, M.; Gao, L.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Wang, X.; Pan, Y.; Ning, T.; Cai, H.; Yang, H.; Zhai, W.; et al. Whole genome sequencing and evolutionary analysis of human papillomavirus type 16 in central China. *PLoS ONE* 2012, *7*, e36577, doi:10.1371/journal.pone.0036577.
45. Yang, L.; Yang, H.; Wu, K.; Shi, X.; Ma, S.; Sun, Q. Prevalence of HPV and variation of HPV 16/HPV 18 E6/E7 genes in cervical cancer in women in South West China. *J. Med. Virol.* 2014, *86*, 1926–1936, doi:10.1002/jmv.24043.
46. Fujinaga, Y.; Okazawa, K.; Nishikawa, A.; Yamakawa, Y.; Fukushima, M.; Kato, I.; Fujinaga, K. Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. *Virus Genes* 1994, *9*, 85–92, doi:10.1007/bf01703438.
47. Ishizaki, A.; Matsushita, K.; Hoang, H.T.; Agdamag, D.M.; Nguyen, C.H.; Tran, V.T.; Sasagawa, T.; Saikawa, K.; Lihana, R.; Pham, H.V.; et al. E6 and E7 variants of human papillomavirus-16 and -52 in Japan, the Philippines, and Vietnam. *J. Med. Virol.* 2013, *85*, 1069–1076, doi:10.1002/jmv.23566.
48. Park, J.S.; Shin, S.; Kim, E.C.; Kim, J.E.; Kim, Y.B.; Oh, S.; Roh, E.Y.; Yoon, J.H. Association of human papillomavirus type 16 and its genetic variants with cervical lesion in Korea. *APMIS* 2016, *124*, 950–957, doi:10.1111/apm.12592.
49. Choi, B.S.; Kim, S.S.; Yun, H.; Jang, D.H.; Lee, J.S. Distinctive distribution of HPV16 E6 D25E and E7 N29S intratypic Asian variants in Korean commercial sex workers. *J. Med. Virol.* 2007, *79*, 426–430, doi:10.1002/jmv.20826.
50. Song, Y.S.; Kee, S.H.; Kim, J.W.; Park, N.H.; Kang, S.B.; Chang, W.H.; Lee, H.P. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol. Oncol.* 1997, *66*, 275–281, doi:10.1006/gyno.1997.4756.
51. Radhakrishna Pillai M.; Sreevidya, S.; Pollock, B.H.; Jayaprakash, P.G.; Herman, B. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2002, *87*, 268–273, doi:10.1006/gyno.2002.6835.
52. He, H.; Li, H.; Fan, P.; Zhu, J.; Pan, Z.; Pan, H.; Wu, D.; Ren, X.; Guo, X.; Li, D.; et al. Variants of human papillomaviruses 16 (HPV16) in Uigur women in Xinjiang, China. *Infect. Agent Cancer.* 2016, *11*, 44, doi:10.1186/s13027-016-0089-2.
53. Zhao, J.; Zhan, Q.; Guo, J.; Liu, M.; Ruan, Y.; Zhu, T.; Han, L.; Li, F. Phylogeny and polymorphism in the E6 and E7 of human papillomavirus: alpha-9 (HPV16, 31, 33, 52, 58), alpha-5 (HPV51), alpha-6 (HPV53, 66), alpha-7 (HPV18, 39, 59, 68) and alpha-10 (HPV6, 44) in women from Shanghai. *Infect. Agents Cancer* 2019, *14*, 38, doi:10.1186/s13027-019-0250-9.
54. Vaeteewoottacharn, K.; Jearanaikoon, P.; Ponglikitmongkol, M. Co-mutation of HPV16 E6 and E7 genes in Thai squamous cervical carcinomas. *Anticancer Res.* 2003, *23*, 1927–1931.

55. Zhang, L.; Yang, B.; Zhang, A.; Zhou, A.; Yuan, J.; Wang, Y.; Sun, L.; Cao, H.; Wang, J.; Zheng, W. Association between human papillomavirus type 16 E6 and E7 variants with subsequent persistent infection and recurrence of cervical high-grade squamous intraepithelial lesion after conization. *J. Med. Virol.* 2016, *88*, 1982–1988, doi:10.1002/jmv.24541.
56. Shang, Q.; Wang, Y.; Fang, Y.; Wei, L.; Chen, S.; Sun, Y.; Li, B.; Zhang, F.; Gu, H. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 [corrected] genes and long control region in [corrected] cervical carcinomas in patients in northeast China. *J. Clin. Microbiol.* 2011, *49*, 2656–2663, doi:10.1128/jcm.02203-10.
57. Pande, S.; Jain, N.; Prusty, B.K.; Bhambhani, S.; Gupta, S.; Sharma, R.; Batra, S.; Das, B.C. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J. Clin. Microbiol.* 2008, *46*, 1060–1066, doi:10.1128/jcm.02202-07.
58. Plesa, A.; Anton, G.; Iancu, I.V.; Diaconu, C.C.; Huica, I.; Stanescu, A.D.; Socolov, D.; Nistor, E.; Popa, E.; Stoian, M.; et al. Molecular variants of human papilloma virus 16 E2, E4, E5, E6 and E7 genes associated with cervical neoplasia in Romanian patients. *Arch. Virol.* 2014, *159*, 3305–3320, doi:10.1007/s00705-014-2199-8.
59. Nindl, I.; Rindfleisch, K.; Lotz, B.; Schneider, A.; Dürst, M. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 1999, *82*, 203–207, doi:10.1002/(sici)1097-0215(19990719)82:2<203::aid-ijc9>3.0.co;2-9.
60. Hu, X.; Pang, T.; Guo, Z.; Pontén, J.; Nistér, M.; Bernard Afink G. Oncogene lineages of human papillomavirus type 16 E6, E7 and E5 in preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinoma. *J. Pathol.* 2001, *195*, 307–311, doi:10.1002/path.944.
61. Vrtačnik Bokal E.; Kocjan, B.J.; Poljak, M.; Bogovac, Z.; Jančar, N. Genomic variants of human papillomavirus genotypes 16, 18, and 33 in women with cervical cancer in Slovenia. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2010, *36*, 1204–1213, doi:10.1111/j.1447-0756.2010.01316.x.
62. Tornesello, M.L.; Duraturo, M.L.; Salatiello, I.; Buonaguro, L.; Losito, S.; Botti, G.; Stellato, G.; Greggi, S.; Piccoli, R.; Pilotti, S.; et al. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J. Med. Virol.* 2004, *74*, 117–126, doi:10.1002/jmv.20154.
63. Garbuglia, A.R.; Carletti, F.; Minosse, C.; Piselli, P.; Zaniratti, M.S.; Serraino, D.; Capobianchi, M.R. Genetic variability in E6 and E7 genes of human papillomavirus -16, -18, -31 and -33 from HIV-1-positive women in Italy. *New Microbiol.* 2007, *30*, 377–382.
64. Cento, V.; Ciccozzi, M.; Ronga, L.; Perno, C.F.; Ciotti, M. Genetic diversity of human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 genes in Italian women with different grades of cervical lesions. *J. Med. Virol.* 2009, *81*, 1627–1634, doi:10.1002/jmv.21552.
65. Benedet, J.L.; Bender, H.; Jones, H., 3rd; Ngan, H.Y.; Pecorelli, S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2000, *70*, 209–262, doi:https://doi.org/10.1016/S0020-7292(00)90001-8.
66. Solomon, D.; Davey, D.; Kurman, R.; Moriarty, A.; O'Connor, D.; Prey, M.; Raab, S.; Sherman, M.; Wilbur, D.; Wright, T., Jr.; et al. The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002, *287*, 2114–2119, doi:10.1001/jama.287.16.2114.
67. Illades-Aguiar, B.; Del Carmen Alarcón-Romero, L.; Antonio-Véjar, V.; Zamudio-López, N.; Sales-Linares, N.; Flores-Alfaro, E.; Fernández-Tilapa, G.; Vences-Velázquez, A.; Muñoz-Valle, J.F.; Leyva-Vázquez, M.-A. Prevalence and Distribution of Human Papillomavirus Types in Cervical Cancer, Squamous Intraepithelial Lesions, and with No Intraepithelial Lesions in Women from Southern Mexico. *Gynecol. Oncol.* 2010, *117*, 291–296, doi:10.1016/j.ygyno.2010.01.036.
68. Davis, L. *Basic Methods in Molecular Biology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012; ISBN 978-0-444-60149-0.
69. Vossler, J.L.; Forbes, B.A.; Adelson, M.D. Evaluation of the Polymerase Chain Reaction for the Detection of Human Papillomavirus from Urine. *J. Med. Virol.* 1995, *45*, 354–360, doi:10.1002/jmv.1890450321.

## **CAPÍTULO 2**

**Efecto de las variantes E6 E7 del VPH 16 sobre la migración celular de células C33-a**

---

## INTRODUCCIÓN

El virus del papilloma humano (VPH) es un virus sin envoltura perteneciente a la familia Papillomaviridae (Doorbar et al., 2015). La clasificación de los VPHs está basada principalmente en su región L, así, una diferencia mayor al 40% en la región L1 de su genoma indica un género distinto, mientras que una especie distinta tiene de un 30 –40% de diferencia en L1 y un tipo viral se presenta cuando hay menos del 10 % de diferencia (Harari et al., 2014). Actualmente se han identificado más de 200 tipos virales de VPH (HPV Reference Center) y estos se han clasificados en variantes basándose en las diferencias de secuencia de su genoma completo, los linajes tienen del 1 al 10% de diferencia para el mismo tipo viral mientras que los sublinajes son aquellos que difieren en el 0.5 al 1 % de su genoma (Burk et al., 2013, Harari et al., 2014).

El VPH presenta tropismo por los epitelios debido a la falta de barreras, tales como el cérvix (Egawa et al., 2015). En el caso del cérvix la infección se da por contacto directo y es favorecida por las microabrasiones del epitelio durante el acto sexual (Christensen, 2016). Una vez establecida la infección por VPH, el desarrollo de lesiones precursoras y cáncer dependerá no solo del VPH sino de otros factores como infecciones asociadas, hábitos, factores ambientales, socioeconómicos, genéticos y epigenéticos (Chatterjee et al., 2016). Se estima que los VPH están presentes en el 90-100 % de los casos con NIC3 y cáncer cervical (Doorbar et al., 2015).

Se ha encontrado que el riesgo oncogénico difiere entre tipos virales del VPH (Schiffman et al., 2010). Los tipos virales denominados de alto riesgo son los frecuentemente más relacionados a neoplasias y de estos el VPH 16 es el tipo viral con mayor prevalencia a nivel mundial (Bruni et al., 2010). También, basándose en las diferencias del gen E6 del VPH 16, se ha observado que entre las variantes de

E6 hay distinto riesgo oncogénico (Schiffman et al., 2010, Ortiz-Ortiz et al., 2015). Las variantes no europeas están más asociadas a lesiones de alto grado (Freitas et al., 2014).

Comparado con E6, la oncoproteína E7 tiene una variabilidad genética baja (Mirabello et al 2017). La poca variabilidad de E7 puede deberse a que las mutaciones generadas no dan una ventaja suficiente para que se fijen en la población o que generan una desventaja en la multiplicación viral o infección al huésped. Se han reportado, sin embargo, variantes de E7 del VPH 16 asociadas al cáncer, siendo algunas de ellas específicas de una región geográfica (Lee et al., 2011, Li et al., 2004)

El estudio que realizamos en muestras cervicales de población guerrerense mostró una asociación de la variante E7-C732/C789/G795 con el CaCU, OR de 3.79 (1.46-9.85, 95% CI), esto a pesar de que esta variante no presenta cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína E7, por su parte el Dr Julio Ortiz Ortiz encontró un OR de 69.01 (7.57-628.96, 95% IC) para variante de E6 AA-a en CaCU. Es interesante que la presencia de ambas variantes aumenta considerablemente el riesgo para desarrollar CaCU, OR de 110 (6.04-2001.3, 95% CI)

---

## Materiales y métodos

### Clonación de variantes E6 y E7 VPH 16 en vector pEGFP NI

Las secuencias de las variantes de E6/E7 y de referencia del VPH 16 se amplificaron a partir de muestras cervicales de mujeres guerrerenses y se les agregó un sitio de restricción usando los primers E7-beginHindIII 5'-aagcttCCACCATGCACCAAAGAGAACTGCAA-3' (nt 83–104) y E7-endBamHI 5'-ggatccAATGGTTTCTGAGAACAGATGGG-3' (nt 855–835) (Del Moral Hernández et al., 2010). Estas construcciones se clonaron en el vector pEGFP NI y se verificaron por secuenciación usando el Kit Big Dye Terminator Chemistry v3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems) en un secuenciador de ADN automatizado ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las oncoproteínas E7 estarán unidas por su carboxilo terminal a la proteína verde fluorescente (GFP) por un péptido de 7 aminoácidos.

### Secuenciación, alineamiento e identificación de variantes génicas de E6 y E7

Los productos de la PCR se purificaron con isopropanol al 75% y el Kit TM ZR DNA Sequencing clean-up (ZYMO RESEARCH). Estos se secuenciaron usando el Kit Big Dye Terminator Chemistry v3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems) en un secuenciador de ADN automatizado ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) usando los primers descritos (Yang et al., 2014). Las secuencias se analizaron con el software Finch TV 1.4.0 y LALIGN server ([http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html)). Las secuencias se alinearon con la secuencia de referencia del VPH 16 (NC\_001526.3 [83-858]). Usando las secuencias de E6 E7 de referencia se identificaron las mutaciones.

### **Cultivo de células y generación de transfectantes estables**

Las células se cultivaron en medio MEM (SIGMA), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), con penicilina a 100 U/mL y estreptomycinina 100 µL/mL (GIBCO, Invitrogen). Las células se mantuvieron a 37 °C en un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para realizar la transfección las células se cultivaron en placas de 12 pozos hasta alcanzar una confluencia del 70 – 90 %, y se transfectaron agregando en cada pozo el complejo lípido-DNA. El complejo para cada pozo se preparó mezclando 500 ng de DNA, 100 µL de medio MEM basal y 1.5 µL de FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega Corporation), el complejo se incubó por 15 min a temperatura ambiente y se agregó a cada pozo según las recomendaciones técnicas del proveedor. Las células transfectadas se incubaron por 48 horas y se mantuvieron en selección con geneticina (G418) por 4 semanas. El medio en los cultivos se cambió cada 5 días o antes si se observaba variación en el indicador de pH.

Después del tiempo de selección, al llegar al 80 % de confluencia, las células transfectadas se colectaron por sorting y se sembraron en medio MEM. Las células se volvieron a seleccionar con G418 durante 4 semanas y se repitió la obtención de células transfectadas por sorting. La selección con G418 y recolección por sorting se repitió una vez más.

### **Citometría de flujo**

Para colectar las células, se incubaron con verseno-tripsina durante 1-3 minutos y se pasaron a un microtubo de 1.5 mL, se centrifugaron a 2500 rpm durante 3 minutos y se retiró el sobrenadante, para lavar las células se agregó 1 mL de Verseno y se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se resuspendió con verseno y se verificó la ausencia de grumos. Las células se cuantificaron y diluyeron con



verseno para alcanzar una concentración máxima de 1.5 millones de células por mL. Los parámetros forward scatter (FS), side scatter (SS) y la intensidad de señal de pEGFP fueron analizados en un citómetro de flujo BD FACS Canto II (Becton, Dickinson). Se identificó la población celular que emitía señal de la proteína pEGFP usando como controles células C33a sin transfectar y células transfectadas con el vector pEGFP. Las células que presentaron emisión de la proteína verde fluorescente se recolectaron por sorting en un tubo de citometría con medio MEM. Inmediatamente después de colectarlas, las células se sembraron en placas p60.

### **Ensayo de migración por cierre de herida**

Las células se sembraron en placas de 12 pozos en medio MEM suplementado con 10% de SFB y 1 % de A/A hasta alcanzar una confluencia del 80 %. Posteriormente se sincronizaron durante 22 h con medio MEM sin SFB y se realizó una herida con ayuda de una punta de 10  $\mu$ L. Se realizó un lavado con PBS para eliminar las células que se desprendieron y se adicionó medio MEM suplementado con 10  $\mu$ M de AraC y 1 % de SFB, se incubó por dos horas, se realizó un lavado y se agregó medio MEM suplementado con 1 % de SFB y 1 % de A/A. Para cada transfección se tomaron fotos en tres sitios de la herida y se monitorearon a las 0, 24 y 48 hrs. Se realizaron tres ensayos independientes. El área de migración se determinó con el macro MRI Wound Healing Tool para ImageJ (área células(T0) - área células (Tn)).

### **Ensayo de migración por Transwell**

Las células se sembraron hasta alcanzar una confluencia del 80 % y se sincronizaron como se describió en el ensayo por cierre de herida. Las células se despegaron con verseno -tripsina, se lavaron con PBS y se cuantificaron. Se sembraron 150 000 por inserto en 300  $\mu$ L de medio MEM suplementado con 1 % de SFB. Se añadió 500  $\mu$ L de medio MEM suplementado con 10 % e SFB en la parte inferior del inserto y se incubó por 48 horas. Para determinar las células que

migraron a la parte inferior del inserto, el inserto se colocó por 20 minutos en un pozo limpio que tenía 200  $\mu$ L de cristal violeta. Posteriormente el inserto se enjuagó con agua y con la ayuda de un hisopo de algodón se retiraron las células de la parte superior del inserto. El inserto se colocó dentro de un pozo que contenía 200  $\mu$ L de ácido acético al 10 %, se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. La solución se pasó a una cubeta para medir la D.O a 560 nm.

### **Análisis estadístico.**

Para los ensayos de migración se realizaron gráficas de barras con la media y desviación estándar. Los resultados se analizaron con ANOVA y con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los resultados se consideraron significativos cuando  $p \leq 0.05$ . Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron con el software GraphPad Prism versión 5.0.

## **RESULTADOS**

### *Clonación de las variantes E6/E7*

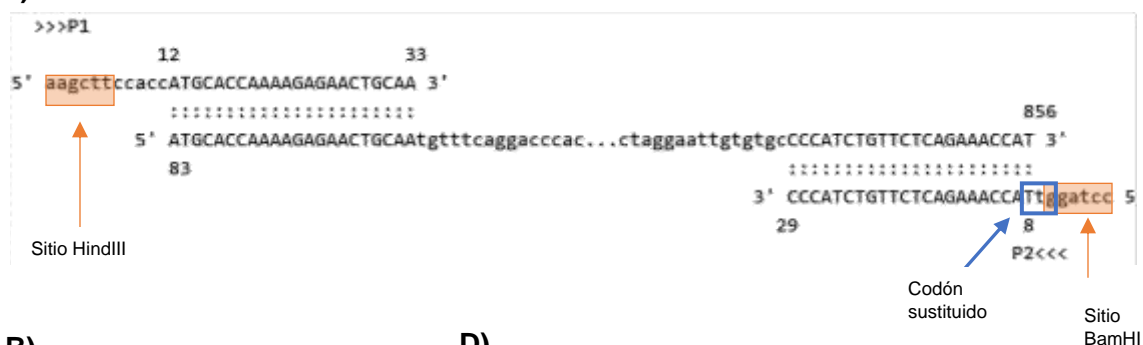
Para determinar si las variantes E6/E7 modifican la migración de células que expresan estas oncoproteínas se procedió a transfectar células C33a con 3 variantes de E6/E7 obtenidas de muestras cervicales de mujeres guerrerenses: 1) el bicistrón de referencia que tiene la secuencia del gen E6 Europea prototipo y de E7 prototipo del VPH 16; 2) el bicistrón más frecuente en nuestra población (36.8%), E-G350 para E6 y E7-prototipo y; 3) el bicistrón con el OR más alto para CaCU (OR=110).

Para poder clonar los bicistrones en el vector pEGFP N1 se emplearon los primers reportados por Del Moral y colaboradores para generar sitios de corte para HindIII y BamHI, río arriba y río abajo del gen E6 y E7 respectivamente, el primer antisentido

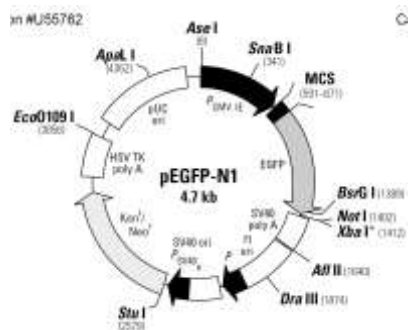
cambió el codón de paro de E7 TAA por TTG (Figura 1A), esto permitirá marcar al gen E7 con la proteína pEGFP.

Después de obtener los bicistrones por PCR, estos se clonaron en el vector intermedio pJET 1.2/Blunt y posteriormente en el vector de expresión pEGFP N1 (Figura 1B). Previo a continuar con las clonaciones en el vector final, se verificó por PCR y secuenciación que las clonas tuvieran los bicistrones de interés (Figura 1C). Las transfecciones se realizaron con FuGene HD ® en células C33a (Figura 1)

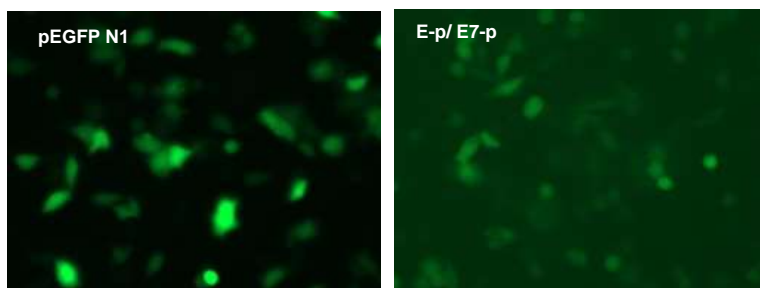
A)



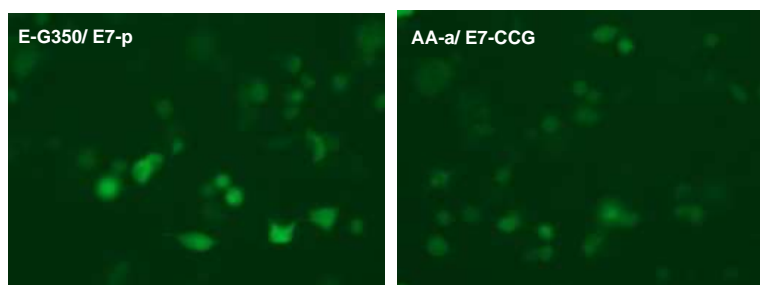
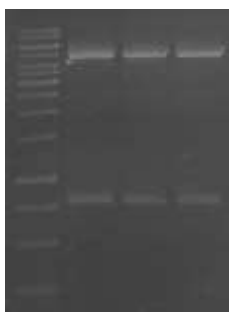
B)



D)

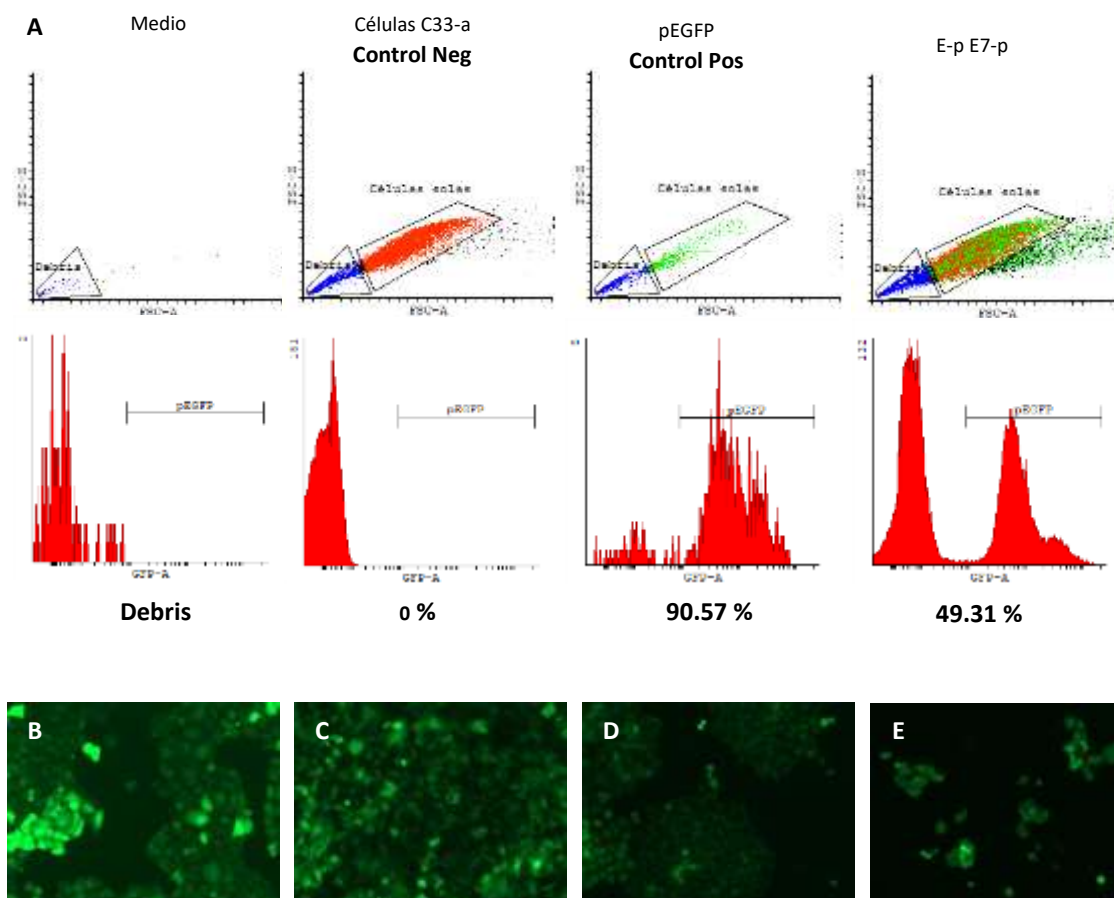


C)

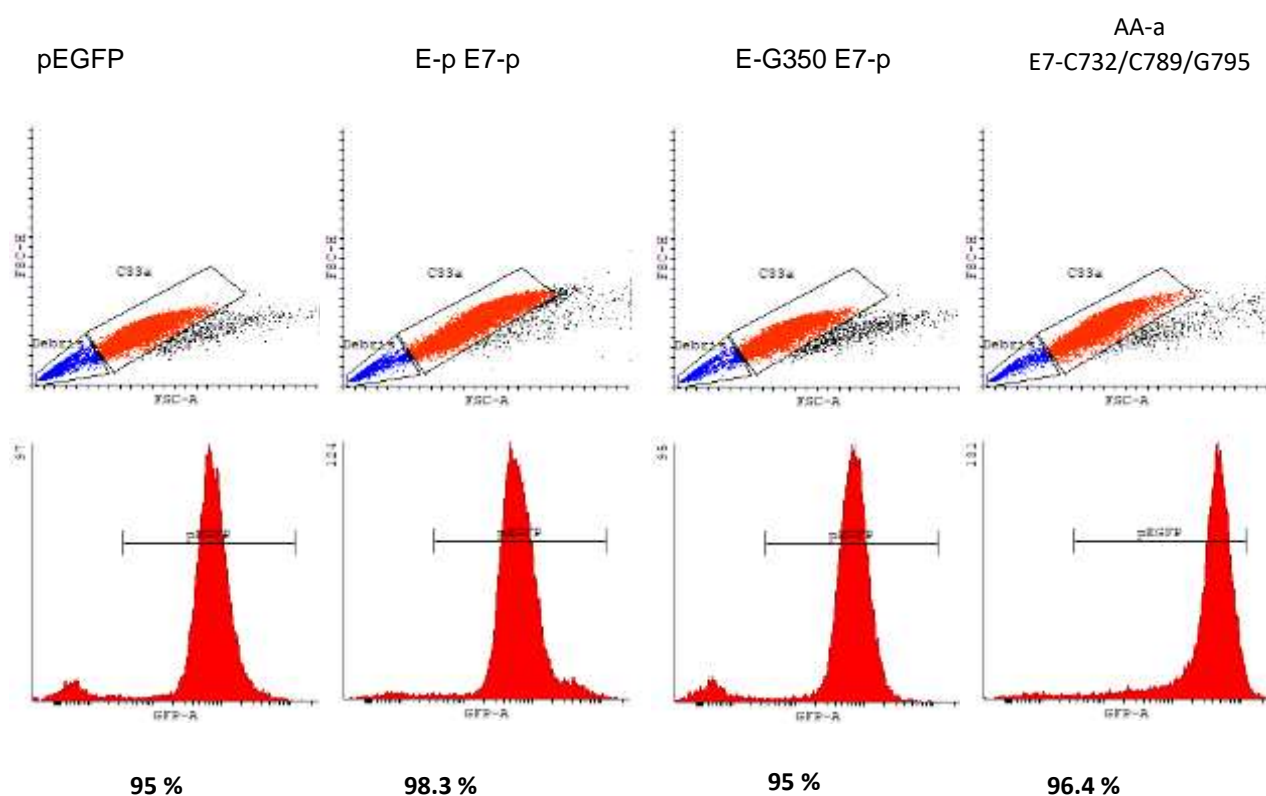


**Figura 1. Expresión de las variantes de E6/E7 en células C33a.** La transfección se realizó en el vector pEGFPN1. **A)** Para amplificar al bicistrón de E6-E7 se usaron los primers E6-beginHindIII y E7-endBamHI reportados por Del Moral et al., 2010. Al amplificar e bicistrón se generaron sitios para HindIII y BamHI recuadros rojos), además se sustituyó al codón de paro en E7 (recuadro azul). **B)** mapa del vector pEGFP N1. C) células transfectadas con las variantes de E6/E7, observadas en microscopio invertido con luz ultravioleta tras 24 post transfección.

Para generar transfecciones estables, las células se mantuvieron en selección con G418 durante cuatro semanas hasta que alcanzaron un 80% de confluencia, y posteriormente se realizó sorting de las células que expresaron la pEGFP (Figura 2). las células recolectadas se volvieron a incubar en selección durante otras 4 semanas y se realizó otro sorting, esto se repitió una vez más. Al finalizar el tercer sorting, la población con emisión de fluorescencia de la proteína pEGFP fue igual o mayor al 95% (Figura 3).



**Figura 2. Sorting de células transfectadas.** A) En los paneles superiores se muestran la selección de células individuales para sorting. En los paneles inferiores se muestran los histogramas de las células positivas a pEGFP. También se indica el porcentaje de eficiencia del sorting para cada caso. **Células obtenidas por sorting:** B) pEGFP; C) E-p E7-p; D) E-G350 E7-p; E) AA-a E7-C732/C789/G795. Objetivo 20X, luz UV.



**Figura 3. Sorting de células transfectadas estables.** En los paneles superiores se muestran la selección de células individuales para sorting. En los paneles inferiores se muestran los histogramas de las células positivas a pEGFP. También se indica el porcentaje de eficiencia del sorting para cada caso.

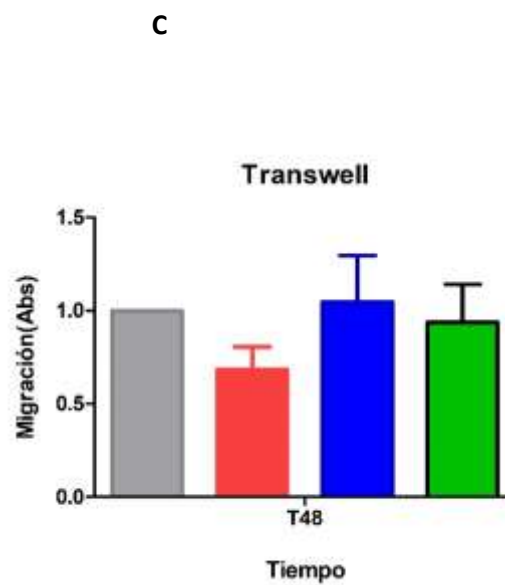
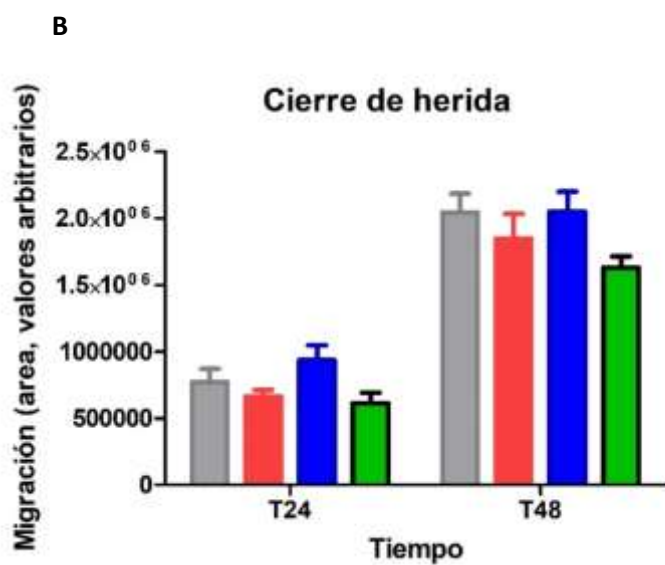
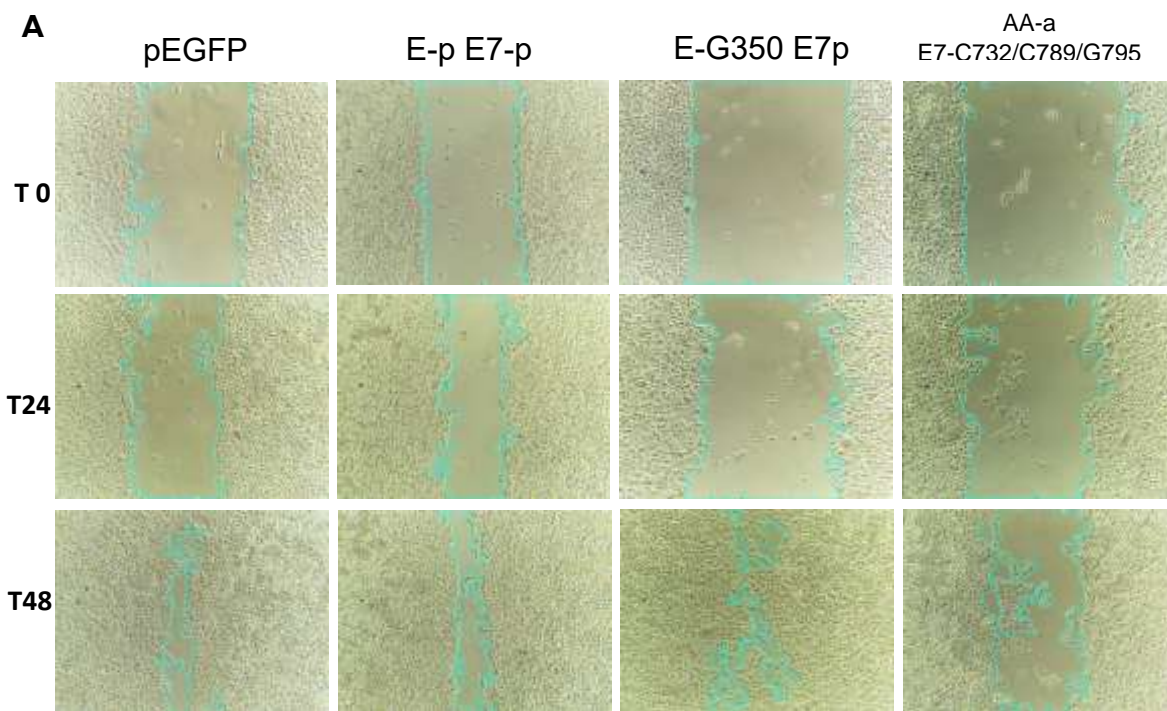
---

*Efecto de las variantes E6/E7 sobre la migración de células C33a*

Se realizaron ensayos de migración por cierre de herida con células C33a que expresaban las siguientes variantes E-p\*E7-p, E-G350\*E7-p y AA-a\*E7-C732/C789/G795. Después de realizar la herida, para cada variante E6/E7 se tomaron como referencia 3 sitios distintos de la herida y se tomaron fotografías del mismo sitio de la herida al momento de iniciar el ensayo y a las 24 y 48 horas.

La evaluación del cierre de herida en tres experimentos independientes no mostró diferencias significativas en la migración de las variantes E6/E7 cuando se comparó con E-p\*E7-p, sin embargo, se observó una tendencia a mayor migración en la variante E-G350\*E7-p a las 24 y 48 horas. En la variante AA-a\*E7-C732/C789/G795 se observó una disminución de la migración respecto a E-p\*E7-p, E-G350\*E7-p a las 24 y 48 horas, pero no fue estadísticamente significativa (Figura 3 B).

Para verificar este ensayo, se realizaron ensayos de migración con el sistema traswell. El ensayo se realizó en tres experimentos independientes para cada variante. La migración celular se evaluó a las 48 horas. Con este método se observó una tendencia a mayor migración de las variantes E-G350\*E7-p y AA-a\*E7-C732/C789/G795 respecto a las variantes de referencia (Figura 3 C) pero no fue estadísticamente significativo.



■ pEGFP  
 ■ Ep E7p  
 ■ EG350 E7p  
 ■ AAa E7C732/C789/G795

■ pEGFP  
 ■ Ep E7p  
 ■ EG350 E7p  
 ■ AAa E7C732/C789/G795

**Figura 3. Migración de células C33a que expresan variantes de E6 E7.** **A)** Ensayos de migración por cierre de herida. Las células se sincronizaron por 20 horas y se trataron 2 horas con AraC 10  $\mu$ M. Se tomaron fotos del mismo sitio de la herida al inicio (T0), a las 24 horas (T24) y a las 48 horas (T48), y se calculó la migración con el macro MRI Wound Healing Tool para ImageJ (área células(T0) - área células (Tn)). **B)** Gráfico de los ensayos de migración por cierre de herida, triplicados en tres ensayos independientes,  $p>0.5$ . **B)** Gráfico de los ensayos de migración por transwell, tres ensayos independientes,  $p>0.5$ .

### Discusión

En pacientes infectadas con VPH el desarrollo de las lesiones precursoras y el cáncer cervicouterino está asociado a la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 (Boulenouar et al., 2010). La expresión de ambas proteínas del VPH 16 pueden promover proliferación, migración e invasión celular (Ghittoni et al., 2010). Se ha encontrado que ambas proteínas pueden presentar mutaciones en sus genes, algunas de estas mutaciones se han asociado a un mayor riesgo para el desarrollo de cáncer cervicouterino

En este estudio nosotros quisimos evaluar si las mutaciones en el gen E6 y E7 encontradas en mujeres guerrerenses, modifican el potencial oncogénico del VPH 16 promoviendo la migración celular. Para esto generamos células C33-a que expresaran tanto a E6 como a E7 del VPH 16, seleccionamos tres combinaciones E6 E7, la primera fue el bicistrón E-prototipo E7 prototipo (bicistrón de referencia), la segunda fue E-G350 E7-prototipo (bicistrón más frecuente en la población guerrerense), y el tercer bicistrón fue AA-a E7-C732/C789/G795, este último asociado a un mayor riesgo para CaCU en la población estudiada.

Los ensayos de cierre de herida con células C33-a que expresaban establemente las proteínas E6 y E7 del VPH 16, mostraron que a las 24 y 48 horas el bicistrón E-G350 E7-prototipo tenía una tendencia a migrar más respecto al bicistrón de



---

referencia (E-prototipo E7-prototipo), sin embargo, esta diferencia no fue significativa. Es interesante que el bicistrón que está asociado a un mayor riesgo al desarrollo de CaCU en población guerrerense, AA-a E7-C732/C789/G795, aunque no mostró una diferencia significativa en la migración celular, si se observó una tendencia a migrar menos respecto al bicistrón de referencia y al bicistrón E-G350 E7-prototipo.

Para verificar el ensayo por cierre de herida se realizaron ensayos en Transwell a 48 horas donde no se encontraron diferencias significativas, pero se observó la misma tendencia de bicistrón E-G350 E7-prototipo a migrar más respecto al bicistrón de referencia. Debido a que se vio una tendencia no significativa de las células C33-a que expresaban el bicistrón E-G350 E7-prototipo, se sugiere ensayos de migración a tiempos más largos y ensayos de invasión.

Actualmente no hay estudios experimentales donde se evalúe el efecto de las variantes E6 E7 sobre el potencial oncogénico del VPH 16. Con este estudio, quisimos abordar un enfoque in vitro donde combináramos las dos oncoproteínas del VPH 16 para evaluar el sinergismo de E6 y E. Es común que durante la integración del VPH 16 al genoma del huésped, los genes E6 y E7 se sobreexpresen y sus proteínas sean las que coordinen la inmortalización y transformación celular (Jeon et al., 1995, Ghittoni et al., 2010, Lu et al., 2014, Liu et al., 2016).

Para la proteína E7 solo hay un estudio en el 2017 donde se evaluó el efecto de la variante E7-G647 sobre la degradación de sus proteínas blanco (Zine et al., 2017). La variante E7-G647 se ha encontrado en una alta proporción en las pacientes con CaCU en algunos países asiáticos, sin embargo, a pesar de esto no hay interés en estudiar los mecanismos y funciones celulares que pudiera tener esta variante (Park et al., 2016, Yang et al., 2014, Chang et al., 2013, Ding et al., 2010)

### **Conclusiones**

Este es el primer estudio donde se evalúa el efecto de variantes de E6 E7 del VPH 16 sobre la migración celular.

Aunque se observa una tendencia a mayor migración celular del bicistron E6 E7 más frecuente encontrado en población guerrerense (E-G350 E7-prototipo), las diferencias no fueron significativas respecto al bicistrón de referencia.

Contrario a lo que se esperaba, el bicistrón E6 E7 asociado a mayor riesgo oncogénico en la población guerrerense (AA-a E7-C732/C789/G795) no mostró diferencias significativas en la migración celular respecto al bicistrón de referencia.

Se sugiere realizar ensayos de migración a tiempos más prolongados.

---

## Referencias

Boulenouar S, Weyn C, Van Noppen M, Moussa Ali M, Favre M, Delvenne PO, Bex F, Noël A, Englert Y, Fontaine V. Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. *Carcinogenesis*. 2010 Mar;31(3):473-80.

Burk R D, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):232-43

Chang YJ, Chen HC, Pan MH, Lee BH, You SL, Lin CY, Chou YC, Hsieh CY, Cheng YJ, Liaw KL, Hsing AW, Schiffman M, Chen CJ; CBCSP-HPV Study Group. Intratypic variants of human papillomavirus type 16 and risk of cervical neoplasia in Taiwan. *J Med Virol*. 2013 Sep;85(9):1567-76.

Chatterjee S, Gupta D, Caputo TA and Holcomb K. Disparities in gynecological malignancies. *Front Oncol*. 2016 Feb 22;6:36

Christensen ND. HPV disease transmission protection and control. *Microb Cell*. 2016 Sep 5;3(9):476-490.

Del Moral Hernández O, López-Urrutia E, Bonilla-Moreno R, Martínez-Salazar M, Arechaga-Ocampo E, Berumen J, Villegas-Sepúlveda N. The HPV-16 E7 oncoprotein is expressed mainly from the unspliced E6/E7 transcript in cervical carcinoma C33-A cells. *Arch Virol*. 2010 155(12):1959-70

Ding T, Wang X, Ye F, Cheng X, Lu W, Xie X. Distribution of human papillomavirus 16 E6/E7 variants in cervical cancer and intraepithelial neoplasia in Chinese women. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 Nov;20(8):1391-8.

Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C and Murakami I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol.* 25 Suppl 1:2-23

Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses.* 2015 Jul 16;7(7):3863-90.

Freitas LB, Chen Z, Mugui EF, Boldrini NA, Miranda AE, Spano LC and Burk RD. Human papillomavirus 16 non-european variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. *PLoS One.* 2014 Jul 1;9(7):e100746

Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes.* 2010;40(1):1-13.

Harari A, Chen Z, Burk RD. Human papillomavirus genomics: past, present and future. *Curr Probl Dermatol .* 2014;45:1-18.

Jeon S, Allen-Hoffmann BL and Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol.* 1995;69(5):2989-97.

Lee CW, Bae JH, Lee SJ, Ho EM, Lee IH, Park YG, Park JS. Distribution of human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variants in the progression of cervical dysplasia in Korean women. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011 ;37(10):1320-6

Li H, Zhao M, Qiu X, Ding X, Tan Y and Wu X. Characterization of a new type hpv16 e7 variant isolated from cervical cancer highest incidence area in Hubei province of China. *Eksp Onkol.* 2004. 26(1):48-54.

---

Liu Y, Zhang C, Gao W, Wang L, Pan Y, Gao Y, Lu Z, Ke Y. Genome-wide profiling of the human papillomavirus DNA integration in cervical intraepithelial neoplasia and normal cervical epithelium by HPV capture technology. *Sci Rep.* 2016 Oct 19;6:35427.

Lu X, Lin Q, Lin M, Duan P, Ye L, Chen J, Chen X, Zhang L, Xue X. Multiple-integrations of HPV16 genome and altered transcription of viral oncogenes and cellular genes are associated with the development of cervical cancer. *PLoS One.* 2014 Jul 3;9(7):e97588.

Mirabello L, Yeager M, Yu K, Clifford GM, Xiao Y, Zhu B, Cullen M, Boland JF, Wentzensen N, Nelson CW, Raine-Bennett T, Chen Z, Bass S, Song L, Yang Q, Steinberg M, Burdett L, Dean M, Roberson D, Mitchell J, Lorey T, Franceschi S, Castle PE, Walker J, Zuna R, Kreimer AR, Beachler DC, Hildesheim A, Gonzalez P, Porras C, Burk RD and Schiffman M. HPV16 E7 genetic conservation is critical to carcinogenesis. *Cell.* 2017 Sep 7; 170(6):1164-1174.e6

Ortiz-Ortiz J, Alarcón-Romero L del C, Jiménez-López MA, Garzón-Barrientos VH, Calleja-Macías I, Barrera-Saldaña HA, Leyva-Vázquez MA, Illades-Aguiar B. Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virology.* 2015 Feb 22;12:29.

Park JS, Shin S, Kim EC, Kim JE, Kim YB, Oh S, Roh EY, Yoon JH. Association of human papillomavirus type 16 and its genetic variants with cervical lesion in Korea. *APMIS.* 2016 Nov;124(11):950-957.

Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, Hildesheim A, Desalle R, Befano B, Yu K, Safaeian M, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Solomon D, Castle PE and Burk RD. A population-based

prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res.* 2010 Apr 15;70(8):3159-69.

Yang L, Yang H, Wu K, Shi X, Ma S and Sun Q. Prevalence of HPV and Variation of HPV 16/HPV 18 E6/E7 Genes in Cervical Cancer in Women in South West China. *J Med Virol.* 2014. 86(11):1926-36

Zine El Abidine A, Tomaić V, Bel Haj Rhouma R, Massimi P, Guizani I, Boubaker S, Ennaifer E, Banks L. A naturally occurring variant of HPV-16 E7 exerts increased transforming activity through acquisition of an additional phospho-acceptor site. *Virology.* 2017 Jan;500:218-225.

## DISCUSIÓN GENERAL

Las oncoproteínas E6 y E7 son las principales responsables de la transformación e inmortalización de las células infectadas con HPV 16 y para ambas proteínas se han reportado mutaciones lo que nos llevó a pensar que estas variantes podían modificar el potencial oncogénico del VPH 16. En otras poblaciones ya se habían reportado variantes asociadas a casos de CaCU, en nuestro grupo de trabajo se reportaron variantes de E6 asociadas a CaCU en población guerrerense y con el presente trabajo ahora variantes de E7.

Ya se han reportado variantes de E7 del VPH 16 con alta prevalencia en la población. Lee y colaboradores asociaron una variante de E7 (E7-G647) al desarrollo de CaCU (Lee et al., 2011) posteriormente se encontró que esta variante tenía sitios de fosforilación adicionales y que la interacción con sus proteínas blanco como pRB podrían verse alteradas lo que originaría un VPH 16 más agresivo (Zine et al., 2017). Otras variantes de E7 se han encontrado en casos de CaCU, pero debido a que presentan mutaciones silenciosas no se ha considerado que modifiquen la función de la oncoproteína E7.

En este estudio se encontró una variante con mutaciones silenciosas (E7-C732/C78/G795) y su alta prevalencia en casos de CaCU en la población estudiada sugiere que estas mutaciones pueden afectar la función de E7, el mecanismo puede ser a nivel del RNAm ya que en otras proteínas se ha observado que algunas mutaciones silenciosas pueden afectar la estructura del RNAm, el uso del codón y en consecuencia la función de la proteína (Bartoszewski et al., 2010) o directamente afectar la estructura de la proteína (Sander et al., 2014). Las predicciones para las estructuras secundarias de RNAm de la variante E7-C732/C789/G795 sugieren la formación de nuevos pares de bases a lo largo de la estructura del RNAm y la pérdida de pares de bases en la porción 5' del mensajero. La variante E7-

C732/C789/G795 ya había sido previamente reportada en América, cuatro estudios encontraron esta variante entre el 8 y 18 % de las pacientes con y sin lesión (Icenogle et al., 1991, Smits et al., 1994, De Boer et al., 2004, Ramas et al., 2018 y Swan et al., 2005).

Por el contrario, en Asia diversos estudios han reportado una variante no silenciosa (E7-G647) en más del 50 % de las pacientes con VPH 16 en cérvix (Song et al., 1997, Wu et al., 2006, Lee et al., 2011), mientras que en nuestro estudio se encontró en <1% (asociado con otras dos mutaciones). Estos datos revelan la importancia de analizar las variantes de E7, ya que además de la diferente prevalencia geográfica, algunas de estas variantes pueden estar más asociadas con el desarrollo de cáncer como lo sugiere el análisis OR para E7-C732/C789/G795.

El que se asocien pocas variantes de E7 del VPH16 a un mayor potencial carcinogénico puede deberse a que hay pocos estudios enfocados en este tema. El presente estudio es el primero que se reporta en México y el de mayor número de casos analizados en el continente americano, mientras que, en Europa, Italia suma hasta 143 casos (Tornesello et al., 2004, Garbuglia et al., 2007 y Cento et al., 2009) y en Tanzania del continente africano se analizaron 22 pacientes (Eschle et al., 1992). Por el contrario, en Asia, China a sumado 993 casos, Corea 372 e India 298 (ver Anexo 1 para referencias) este esfuerzo en el continente asiático ha llevado a asociar la variante G647 a un mayor riesgo oncogénico por el VPH 16 y a elucidar posteriormente algunos de los mecanismos de esta variante de E7 que se ven afectados. Es claro que la poca cantidad de estudios no ha permitido que identifiquemos en diferentes poblaciones las variantes de E7 que puedan aumentar el potencial oncogénico del VPH 16.



## CONCLUSIONES GENERALES

Este es el primer estudio en nuestro país que busca las variantes génicas de E7 del VPH 16 en muestras cervicales y el primero en asociar la combinación de variantes E6 y E7 del VPH 16 con el riesgo a desarrollar lesiones cervicales y CaCU.

Este estudio sugiere que la variante E7-C732/C789/G795 del VPH 16 está asociada a un mayor riesgo a desarrollar CaCU y que esta variante presenta una prevalencia importante en las mujeres guerrerenses infectadas con el VPH16.

La presencia de la variante de E6 AA-a y de E7-C732/C789/G795 presentan un riesgo sinérgico para el desarrollo de CaCU en mujeres guerrerenses infectadas con el VPH 16.

La combinación de AA-a E7-C732/C789/G795 del VPH 16 mostró no modificar el potencial de migración celular.

-----Este estudio sugiere la importancia de realizar estudios futuros con la combinación de las variantes de las dos oncoproteínas de VPH 16.

**REFERENCIAS GENERALES**

Barbosa, MS., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller J., Lowy, D. and Vousden H. (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 11 phosphorylation. *EMBO J.* (1):153-60.

Bartoszewski RA, Jablonsky M, Bartoszezwska S, Stevenson L, Dai Q, Kappes J, Collawn JF, Bebok Z. (2010). A synonymous single nucleotide polymorphism in DeltaF508 CFTR alters the secondary structure of the mRNA and the expression of the mutant protein. *J Biol Chem.* 10;285(37):28741-8.

Bhattacharjee B, Mandal NR, Roy S, Sengupta S. (2008). Characterization of sequence variations within HPV16 isolates among Indian women: prediction of causal role of rare non-synonymous variations within intact isolates in cervical cancer pathogenesis. *Virology.* 20;377(1):143-50.

Boumba LM, Assoumou SZ, Hilali L, Mambou JV, Moukassa D and Ennaji MM. (2015). Genetic variability in E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus Type 16 from Congolese cervical cancer isolates *Infect Agent Cancer.* 10:15

Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX and de Sanjosé . (2010). Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *J Infect Dis.* 202(12):1789-99

Buonaguro FM, Tornesello ML, Salatiello I, Okong P, Buonaguro L, Beth-Giraldo E, Biryahwaho B, Sempala SD, Giraldo G. (2000). The uganda study on HPV variants and genital cancers. *J Clin Virol.* 19(1-2):31-41.

Cao M, Chenzhang Y, Ding X, Zhang Y, Jing Y, Chen Z. (2016). Genetic variability and lineage phylogeny of human papillomavirus type-16 and -53 based on the E6, E7, and L1 genes in Southwest China. *Gene*. 30;592(1):49-59.

Cento V, Ciccozzi M, Ronga L, Perno CF and Ciotti M. (2009). Genetic Diversity of Human Papillomavirus Type 16 E6, E7, and L1 Genes in Italian Women With Different Grades of Cervical Lesions. *J Med Virol*. 81(9):1627-34

Chang YJ, Chen HC, Pan MH, Lee BH, You SL, Lin CY, Chou YC, Hsieh CY, Cheng YJ, Liaw KL, Hsing AW, Schiffman M, Chen CJ; CBCSP-HPV Study Group. (2013). Intratypic variants of human papillomavirus type 16 and risk of cervical neoplasia in Taiwan. *J Med Virol*. 85(9):1567-76.

Chansaenroj J, Theamboonlers A, Junyangdikul P, Swangvaree S, Karalak A, Poovorawan Y. (2012). Whole genome analysis of human papillomavirus type 16 multiple infection in cervical cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 13(2):599-606.

Chatterjee S, Gupta D, Caputo TA and Holcomb K. (2016) Disparities in Gynecological Malignancies. *Front Oncol*. 6:36

Chen AA, Heideman DA, Boon D, Chen Z, Burk RD, De Vuyst H, Gheit T, Snijders PJ, Tommasino M, Franceschi S and Clifford GM. (2014) Human papillomavirus 33 worldwide genetic variation and associated risk of cervical cancer. *Virology*. 448:356-62.

Choi BS, Kim SS, Yun H, Jang DH and Lee JS. (2007). Distinctive Distribution of HPV16 E6 D25E and E7 N29S Intratypic Asian Variants in Korean Commercial Sex Workers. *J Med Virol*. 79(4):426-30.

Choo KB, Wang TS and Huang CJ. (2000) Analysis of Relative Binding Affinity of E7-pRB of Human Papillomavirus 16 Clinical Variants Using the Yeast Two-Hybrid System. *J Med Virol* 61: 298-302.

de Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, Jordanova ES, Kolkman-Uljee S, Fleuren GJ. (2004). Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol.* 94(2):488-94.

Del Moral Hernández O, López-Urrutia E, Bonilla-Moreno R, Martínez-Salazar M, Arechaga-Ocampo E, Berumen J, Villegas-Sepúlveda N. (2010) The HPV-16 E7 oncoprotein is expressed mainly from the unspliced E6/E7 transcript in cervical carcinoma C33-A cells. *Arch Virol.* 155(12):1959-70

Denny L, Herrero R, Levin C and Kim JJ. (2015). Cáncer cervical. En: Gelband H, Jha P, Sankaranarayanan R, Horton S. *Cancer: Disease Control Priorities, Tercera Edición (Volumen 3)*. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2015 Nov 01. Capítulo 4.

Ding T, Wang X, Ye F, Cheng X, Lu W and Xie X. (2010). Distribution of Human Papillomavirus 16 E6/E7 Variants in Cervical Cancer and Intraepithelial Neoplasia in Chinese Women. *Int J Gynecol Cancer.* 20(8):1391-8

Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C and Murakami I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol.* 25 Suppl 1:2-23

Eschle D, Dürst M, ter Meulen J, Luande J, Eberhardt HC, Pawlita M, Gissmann L. (1992). Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol.* 73 ( Pt 7):1829-32.

Firzlaff JM, Lüscher B and Eisenman RN. (1989) Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;88(12):5187-91

Fujinaga Y, Okazawa K, Nishikawa A, Yamakawa Y, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. (1994). Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. *Virus Genes.* 9(1):85-92.

Gao G, Peng M, Zhu L, Wei Y and Wu X. (2009) Human Papillomavirus16 Variant E7 Gene Induces Transformation of NIH 3T3 Cells Via Up-Regulation of cdc25A and Cyclin A. *Int J Gynecol Cancer.* 19(4):494-9.

Garbuglia AR, Carletti F, Minosse C, Piselli P, Zaniratti MS, Serraino D, Capobianchi MR. (2007). Genetic variability in E6 and E7 genes of human papillomavirus -16, -18, -31 and -33 from HIV-1-positive women in Italy. *New Microbiol.* 30(4):377-82.

Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. (2010). The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes.* 40(1):1-13.

Globocan, 2012. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)

Accesado el 15/05/16.

Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjosé S, Franceschi S, Clifford GM. (2012) Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cáncer. *Int J Cancer.* 131(10):2349-59

Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. (1991) 20. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. 19. J Virol. 65(1):473-8.

Hamada M, Ono Y, Kiryu H, Sato K, Kato Y, Fukunaga T, Mori R, Asai K. (2016) Rtools: a web server for various secondary structural analyses on single RNA sequences. Nucleic Acids Res. 8;44(W1):W302-7.

He H, Li H, Fan P, Zhu J, Pan Z, Pan H, Wu D, Ren X, Guo X, Li D, Pan Z, Shao R. (2016). Variants of human papillomaviruses 16 (HPV16) in Uigur women in Xinjiang, China. Infect Agent Cancer. 18;11:44.

Hu X, Pang T, Guo Z, Pontén J, Nistér M and Bernard Afink G. (2001) Oncogene lineages of human papillomavirus type 16 E6, E7 and E5 in preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinoma. J Pathol. 195(3):307-11.

Icenogle JP, SathyaP, Miller DL, Tucker RA, Rawls WE. (1991). Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of humanpapillomavirus type 6 and type 16. Virology.184(1):101-107

Illades-Aguiar, B., Alarcon-Romero L del, C., Antonio-Vejar, V., Zamudio-Lopez, N., Sales- Linares, N., Flores-Alfaro, E., Fernandez-Tilapa, G., Vences-Velazquez, A., Munoz-Valle, J. F. & Leyva-Vazquez, M. A. (2010) Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecol Oncol*, 117, 291-6.

Ishizaki A, Matsushita K, Hoang HT, Agdamag DM, Nguyen CH, Tran VT, Sasagawa T, Saikawa K, Lihana R, Pham HV, Bi X, Ta VT, Van Pham T, Ichimura H. (2013). E6 and E7 variants of human papillomavirus-16 and -52 in Japan, the Philippines, and Vietnam. J Med Virol. 85(6):1069-76.

Islam S, Mazumder Indra D, Basu M, Roychowdhury A, Das P, Dasgupta H, Roy A, Alam N, Mondal RK, Roychoudhury S, Panda CK. (2018). Phylogenetic analysis of Human papillomavirus 16 variants isolated from Indian Breast cancer patients showed difference in genetic diversity with that of cervical cancer isolates. *Virus Res.* 2;243:1-9.

Jenkins D. (2007). Histopathology and cytopathology of cervical cancer. *Dis Markers.* 23(4):199-212

Jeon S, Allen-Hoffmann BL and Lambert PF. (1995) Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol.* 69(5):2989-97.

Kerpedjiev P, Hammer S, Hofacker IL (2015). Forna (force-directed RNA): Simple and effective online RNA secondary structure diagrams. *Bioinformatics* 31(20):3377-9

Klingelutz AJ and Roman A. (2012) Cellular transformation by human papillomaviruses: Lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology.* 424(2):77-98

Knapp AA, McManus PM, Bockstall K, Moroianu J. (2009) Identification of the nuclear localization and export signals of high risk HPV16 E7 oncoprotein. *Virology.* 383(1):60-8

Kumar S, Jena L, Sahoo M, Kakde M, Daf S and Varma AK. (2011) Distribution of human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variants in the progression of cervical dysplasia in Korean women. *Genomics Inform.* 13(2):60-7.

Lee CW, Bae JH, Lee SJ, Ho EM, Lee IH, Park YG, Park JS. (2011) Distribution of human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variants in the progression of cervical dysplasia in Korean women. *J Obstet Gynaecol Res.* 37(10):1320-6.

Li H, Zhao M, Qiu X, Ding X, Tan Y and Wu X. (2004) Characterization of a new type hpv16 e7 variant isolated from cervical cancer highest incidence area in Hubei province of China. *Eksp Onkol.* 26(1):48-54.

Liang YJ, Chang HS, Wang CY and Yu WC. (2008) DYRK1A stabilizes HPV16E7 oncoprotein through phosphorylation of the threonine 5 and threonine 7 residues. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(11):2431-41.

Lin CH, Chang HS and Yu WC. (2008) USP11 stabilizes HPV-16E7 and further modulates the E7 biological activity. *J Biol Chem.* 283(23):15681-8.

Liu X, Clements A, Zhao K, Marmorstein R. (2006) Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem.* 281(1):578-86.

McLaughlin-Drubin ME and Münger K. (2009) The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology.* 384(2):335-44.

Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, Schneider A, Dürst M. (1999). Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer.* 19;82(2):203-7.

Oh KJ, Kalinina A, Wang J, Nakayama K, Nakayama KI and Bagchi S. (2004) The Papillomavirus E7 Oncoprotein Is Ubiquitinated by Ubch7 and Cullin 1- and Skp2-Containing E3 Ligase. *J Virol.* 78(10):5338-46.



Ohlenschläger O, Seiboth T, Zengerling H, Briese L, Marchanka A, Ramachandran R, Baum M, Korbas M, Meyer-Klaucke W, Dürst M, Görlach M. (2006) Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7. *Oncogene*. 25(44):5953-9.

Ortiz-Ortiz J, Alarcón-Romero L del C, Jiménez-López MA, Garzón-Barrientos VH, Calleja-Macías I, Barrera-Saldaña HA, Leyva-Vázquez MA, Illades-Aguiar B. (2015) Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virology*. 22;12:29.

Pande S, Jain N, Prusty BK, Bhambhani S, Gupta S, Sharma R, Batra S, Das BC. (2008). Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J Clin Microbiol*. 46(3):1060-6.

Park JS, Shin S, Kim EC, Kim JE, Kim YB, Oh S, Roh EY, Yoon JH. (2016) Association of human papillomavirus type 16 and its genetic variants with cervical lesion in Korea. *APMIS*. 124(11):950-957.

Pham TTT, Bi X, Hoang HTT, Ishizaki A, Nguyen MTP, Nguyen CH, Nguyen HP, Pham TV, Ichimura H. (2018). Human Papillomavirus Genotypes and HPV16 E6/E7 Variants among Patients with Genital Cancers in Vietnam. *Jpn J Infect Dis*. 22;71(6):419-426.

Phelps WC, Münger K, Yee CL, Barnes J and Howley PM. (1992) Structure-Function Analysis of the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein. *J Virol*. 66(4):2418-27.

Pim D and Banks L. (2010) Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS*.118(6-7):471-93

Plesa A, Anton G, Iancu IV, Diaconu CC, Huica I, Stanescu AD, Socolov D, Nistor E, Popa E, Stoian M, Botezatu A. (2014). Molecular variants of human papilloma virus 16 E2, E4, E5, E6 and E7 genes associated with cervical neoplasia in Romanian patients. *Arch Virol.* 159(12):3305-20.

Radhakrishna Pillai M, Sreevidya S, Pollock BH, Jayaprakash PG, Herman B. (2002). Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 87(3):268-73.

Ramakrishnan S, Patricia S and Mathan G. (2015) Overview of high-risk HPV's 16 and 18 infected cervical cancer: Pathogenesis to prevention. *Biomed Pharmacother.* 70:103-10.

Ramas V, Mirazo S, Bonilla S, Ruchansky D, Arbiza J. (2018). Analysis of human papillomavirus 16 E6, E7 genes and Long Control Region in cervical samples from Uruguayan women. *Gene.* 15;654:103-109.

Roman A and Munger K. (2013) The papillomavirus E7 proteins. *Virology.* 445(1-2):138-68.

Safaeian M, van Doorslaer K, Schiffman M, Chen Z, Rodriguez AC, Herrero R, Hildesheim A, Burk RD. (2010). Lack of heterogeneity of HPV16 E7 sequence compared with HPV31 and HPV73 may be related to its unique carcinogenic properties. *Arch Virol.* 155(3):367-70.

Sander IM, Chaney JL, Clark PL. (2014). Expanding Anfinsen's principle: contributions of synonymous codon selection to rational protein design. *J Am Chem Soc.* 22;136(3):858-61.

Sang BC and Barbosa MS. (1992) Single amino acid substitutions in “low-risk” human papillomavirus (HPV) type 6 E7 protein enhance features characteristic of the “high-risk” HPV E7 oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8063-8067

Sato, K., Akiyama, M., Sakakibara, Y. (2021). RNA secondary structure prediction using deep learning with thermodynamic integration, *Nat Commun* 12, 941

Secretaria de salud. (2015) Defunciones de mujeres de 25 años y más por tumor maligno del cuello del útero (C53), 2000-2013 <http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/12951/MortalidadCaCu2000a2013.pdf> Accesado el 15/05/16.

Shang Q, Wang Y, Fang Y, Wei L, Chen S, Sun Y, Li B, Zhang F and Gu H. (2011) Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in cervical carcinomas in patients in northeast China. *J Clin Microbiol.* 49(7):2656-63

Smits HL, Traanberg KF, Krul MR, Prussia PR, Kuiken CL, Jebbink MF, Kleyne JA, van den Berg RH, Capone B, de Bruyn A, et al. (1994). Identification of a unique group of human papillomavirus type 16 sequence variants among clinical isolates from Barbados. *J Gen Virol.* 75 ( Pt 9):2457-62.

Smotkin D and Wettstein FO. (1987) The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J Virol.* 61(5):1686-9

Song YS, Kee SH, Kim JW, Park NH, Kang SB and Chang WH. (1997) Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol Oncol* 66: 275-281.

Sun M, Gao L, Liu Y, Zhao Y, Wang X, Pan Y, Ning T, Cai H, Yang H, Zhai W, Ke Y. (2012). Whole genome sequencing and evolutionary analysis of human papillomavirus type 16 in central China. *PLoS One*. 7(5):e36577.

Swan DC, Rajeevan M, Tortolero-Luna G, Follen M, Tucker RA and Unger ER. (2005) Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. *Gynecol Oncol*. 96(3):695-700

Tornesello ML, Duraturo ML, Salatiello I, Buonaguro L, Losito S, Botti G, Stellato G, Greggi S, Piccoli R, Pilotti S, Stefanon B, De Palo G, Franceschi S, Buonaguro FM. (2004). Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol*. 74(1):117-26.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 65(2):87-108.

Tsakogiannis D, Kyriakopoulou Z, Amoutzias G, Ruether IG, Dimitriou TG, Panotopoulou E and Markoulatos P. (2013) Identification of novel E6-E7 sequence variants of human papillomavirus 16. *Arch Virol*. 158(4):821-8

Tugizov S, Berline J, Herrera R, Penaranda ME, Nakagawa M, Palefsky J. (2005) Inhibition of Human Papillomavirus Type 16 E7 Phosphorylation by the S100 MRP-8/14 Protein Complex. *J Virol*. 79(2):1099-112.

Vaeteewoottacharn K, Jearanaikoon P and Ponglikitmongkol M. (2003) Co-mutation of HPV16 E6 and E7 genes in Thai squamous cervical carcinomas. *Anticancer Res*. 23(2C):1927-31.

Vrtačnik Bokal E, Kocjan BJ, Poljak M, Bogovac Z, Jančar N. (2010). Genomic variants of human papillomavirus genotypes 16, 18, and 33 in women with cervical cancer in Slovenia. *J Obstet Gynaecol Res.* 36(6):1204-13.

Wilson VG. (2014) The Role of Ubiquitin and Ubiquitin-Like Modification Systems in Papillomavirus Biology. *Viruses.* 6(9):3584-611

Woodman CB, Collins SI and Young LS. (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.* 7(1):11-22

Wu Y, Chen Y, Li L, Yu G, He Y and Zhang Y. (2006) Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J Gen Virol.* 87(Pt 5):1181-8

Yang L, Yang H, Wu K, Shi X, Ma S and Sun Q. (2014) Prevalence of HPV and Variation of HPV 16/HPV 18 E6/E7 Genes in Cervical Cancer in Women in South West China. *J Med Virol.* 86(11):1926-36

Yang Y, Ren J, Zhang Q. (2016). Distribution of human papilloma virus type 16 E6/E7 gene mutation in cervical precancer or cancer: A case control study in Guizhou Province, China. *J Med Virol.* 88(2):345-50.

Zacapala-Gómez AE, Del Moral-Hernández O, Villegas-Sepúlveda N, Hidalgo-Miranda A, Romero-Córdoba SL, Beltrán-Anaya FO, Leyva-Vázquez MA, Alarcón-Romero Ldel C, Illades-Aguiar B. (2016) Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. *Virology.* 15;488:187-95.

Zhang L, Liao H, Yang B, Geffre CP, Zhang A, Zhou A, Cao H, Wang J, Zhang Z and Zheng W. (2015) Variants of human papillomavirus type 16 predispose toward persistent infection. *Int J Clin Exp Pathol.* 1;8(7):8453-9

Zhang L, Yang B, Zhang A, Zhou A, Yuan J, Wang Y, Sun L, Cao H, Wang J, Zheng W. (2016) Association between human papillomavirus type 16 E6 and E7 variants with subsequent persistent infection and recurrence of cervical high-grade squamous intraepithelial lesion after conization. *J Med Virol.* 88(11):1982-8.

Zheng ZM and Baker CC. (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 1;11:2286-302

Zine El Abidine A, Tomaić V, Bel Haj Rhouma R, Massimi P, Guizani I, Boubaker S, Ennaifer E, Banks L. (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.

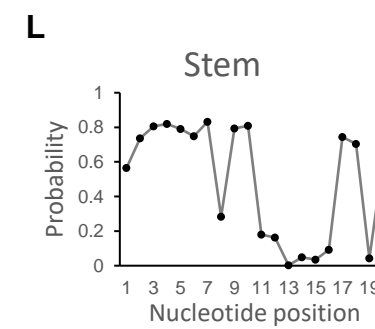
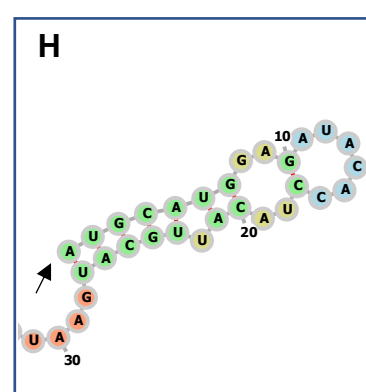
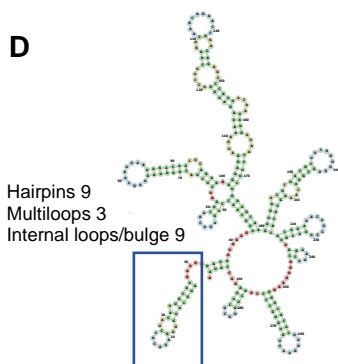
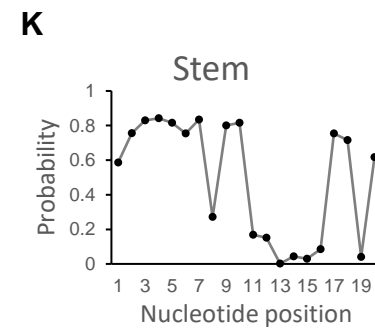
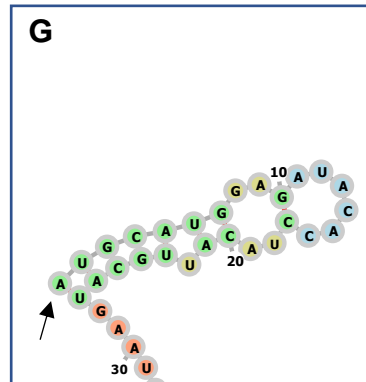
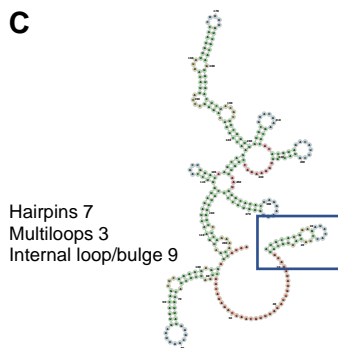
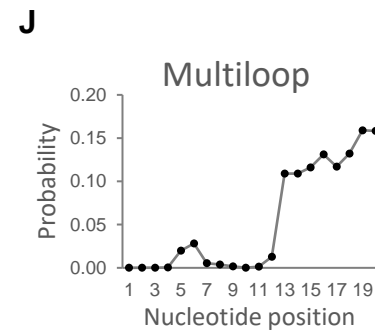
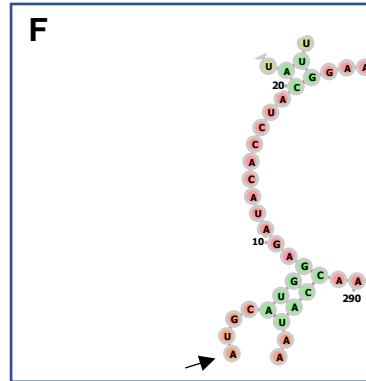
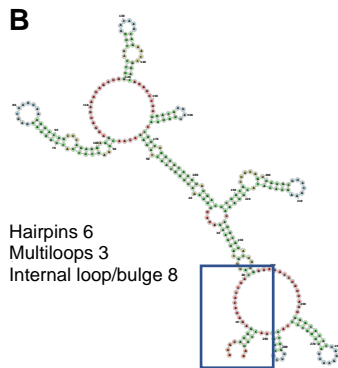
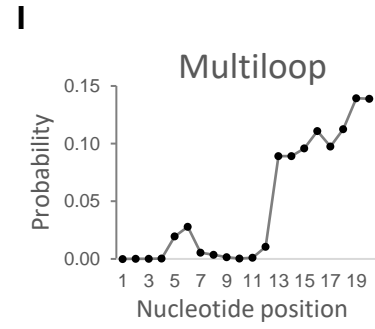
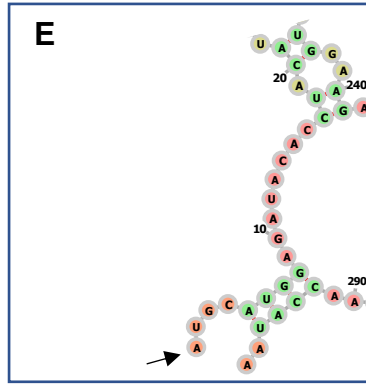
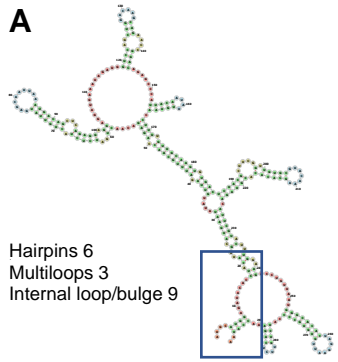
Anexos

## Anexo 1

### *Análisis in silico de las estructuras secundarias de los RNAm de las variantes E7*

A partir de las secuencias nucleotídicas de las variantes E7 se generaron las predicciones de las estructuras secundarias del RNA mensajero con el servidor en línea MXfold2 <http://www.dna.bio.keio.ac.jp/mxfold2/> (Sato et al., 2021). Se utilizó la interfase que predice las estructuras secundarias de RNA con las conformaciones de energía libre más bajas posibles (Reuter and Mathews, 2010). Todas las secuencias de DNA de E7 de referencia y las variantes se ingresaron en formato FASTA. Las variantes se compararon con la variante E7 prototipo del VPH 16 (E7-p). El bistrón con mayor número de cambios en su estructura secundaria corresponde al formado por la variante triple mutante de E7 (E7-C732/C789/G795), figura s1-D. Las estructuras secundarias se visualizaron usando Forna (Kerpedjiev et al., 2015). para validar las estructuras predecidas, la probabilidad de cada base en la estructura secundaria fue calculada con CapR (Hamada et al., 2016).





**Figura Predicción de la estructura secundaria de E7-p, E7-A712, y E7-C732/C789/G795**

**A-D)** Se muestran los modelos teóricos predichos para el mRNA de las variantes de E7 HPV 16 y se resalta el sitio de inicio de la traducción. Código de color: stem-verde; loop terminal-azul; multiloop-rojo; y loop interno/bulge-amarillo. **(E-H)** Se muestran los primeros nucleótidos que incluyen el sitio de inicio de la traducción de cada variante. I-L) Muestra la probabilidad de que los primeros 20 RNA estén localizados