



Título del artículo.

Modulación de la apoptosis por la oncoproteína E6 de la variante E-G350 del VPH-16 en células HaCaT en respuesta a quimioterapia y radioterapia.

Título del artículo en idioma Inglés.

Modulation of apoptosis by the oncoprotein E6 variant E-G350 of HPV-16 in HaCaT cells in response to chemotherapy and radiotherapy.

Autores.

Rocío Rodríguez Godínez
Ana Elvira Zacapala Gómez
Elena Arechaga Ocampo
Oscar del Moral Hernández

Referencia bibliográfica:

MLA

Rodríguez Godínez, Rocío, Ana Elvira Zacapala Gómez, Elena Arechaga Ocampo, Oscar del Moral Hernández. "Modulación de la apoptosis por la oncoproteína E6 de la variante E-G350 del VPH-16 en células HaCaT en respuesta a quimioterapia y radioterapia". *Tlamati* 7.3 (2016): 5-10. Print.

APA

Rodríguez Godínez, R., Zacapala Gómez, A. E., Arechaga Ocampo, E., del Moral Hernández, O. (2016). Modulación de la apoptosis por la oncoproteína E6 de la variante E-G350 del VPH-16 en células HaCaT en respuesta a quimioterapia y radioterapia. *Tlamati*, 7(3), 5-10.

ISSN: 2007-2066.

Publicado el 30 de Diciembre del 2016

© 2016 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

TLAMATI, es una publicación trimestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



Modulación de la apoptosis por la oncoproteína E6 de la variante E-G350 del VPH-16 en células HaCaT en respuesta a quimioterapia y radioterapia

Rocío Rodríguez Godínez^{1*}
 Ana Elvira Zacapala Gómez²
 Elena Arechaga Ocampo³
 Oscar del Moral Hernández¹

¹ Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas. Laboratorio de Virología y Epigenética del Cáncer. Av. Lázaro Cárdenas s/n. C. U. Zona Sur. C. P. 39070. Chilpancingo, Guerrero, México. Tel: +52 (747) 472 5503.

² Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas. Laboratorio de Biomedicina Molecular.

³ Instituto Nacional de Cancerología. Unidad de Cáncer, Investigación Biomédica en División de la Investigación Básica

*Autor de correspondencia
 707rocio@gmail.com

Resumen

La oncoproteína E6 del VPH-16 altera la apoptosis, la proliferación celular y la regulación transcripcional de varios genes a través de la unión con proteínas celulares como E6AP, Bax y caspasa 8. Se ha reportado que E6 puede unirse y degradar directamente a estas dos últimas proteínas causando resistencia a la apoptosis. Además, se ha reportado que los cambios estructurales en la oncoproteína E6 de las variantes del VPH-16 son suficientes para regular diferencialmente la apoptosis, por lo tanto, en este trabajo se pretende evaluar la resistencia a la apoptosis en células HaCaT transfectadas con la oncoproteína E6 de la variante E-G350 del VPH-16 en comparación con la variante E-Prototipo bajo el tratamiento con cisplatino y rayos X. Las células HaCaT fueron transfectadas establemente con el vector de expresión pEGFP-N1 que contiene el gen E6 de las variantes E-G350 y E-P, las cuales fueron tratadas con diferentes concentraciones de cisplatino durante 24, 48 y 72hrs para determinar la DL50 de cisplatino, con la radiación se realizaron ensayos clonogénicos y se determinó la viabilidad celular. La resistencia a la apoptosis se determinará por ensayos de Anexina V-FITC, la expresión de caspasas por Western Blot y la actividad de caspasas mediante el uso de sustratos fluorogénicos. La diferencias de las medias entre los grupos se realizara con la prueba de ANOVA y/o Kruskal Wallis dependiendo de la normalidad de los datos, se considerará un valor de $p < 0.05$ como significativo. La DL50 de cisplatino en las células HaCaT Mock, E-6, VPH16, E-P y HaCaT control es 10 μ M, mientras que la DL50 para la radiación se logra con la dosis terapéutica 2Gy. Entre las HacaT Mock y las transfectadas solo con el vector no existe una diferencia en cuanto a la respuesta al cisplatino y la radiación.

Palabras clave: apoptosis, quimioterapia, radioterapia, cáncer cervical, variantes VPH

Abstract

HPV-16 E6 oncoprotein alters apoptosis, cell proliferation and transcriptional regulation of several genes through binding to cellular proteins such as E6AP, Bax and caspase 8. It has been reported that E6 can bind and degrade directly the last two proteins causing resistance to apoptosis. In addition, it has been reported that structural changes in the E6 oncoprotein of the HPV-16 variants are sufficient to differentially regulate apoptosis, therefore, in this study we

Como citar el artículo:

Rodríguez Godínez, R., Zacapala Gómez, A. E., Arechaga Ocampo, E., del Moral Hernández, O. (2016). Modulación de la apoptosis por la oncoproteína E6 de la variante E-G350 del VPH-16 en células HaCaT en respuesta a quimioterapia y radioterapia. *Tlamati*, 7(3), 5-10.

intend to evaluate the resistance to apoptosis in HaCaT cells transfected with the oncoprotein E6 variant of the E-G350 from VPH-16 compared to the E-Prototype variant under treatment with cisplatin and X-rays. HaCaT cells were stably transfected with the expression vector pEGFP-N1 containing the E6 gene of the variants E-G350 and E-P, treated with different concentrations of cisplatin for 24, 48 and 72 hrs, in order to determine the DL50 of cisplatin. Applying radiation, clonogenic assays were developed in order to determine cell viability. Resistance to apoptosis will be determined by Annexin V-FITC assays, caspase expression by Western Blot and caspase activity by the use of fluorogenic substrates. Differences of means between groups will be performed with the ANOVA and / or Kruskal Wallis test, depending on the normality of the data, a value of $p < 0.05$ will be considered significant. The DL50 of cisplatin in HaCaT Mock, E-6, VPH16, E-P and HaCaT control is $10 \mu\text{M}$, while the DL50 for radiation is achieved with the 2Gy therapeutic dose. Among Mock HaCaTs and those transfected only with the vector, there is no difference in response to cisplatin and radiation

Keywords: apoptosis, chemotherapy, radiation therapy, cervical cancer, HPV variants.

Introducción

La función transformante de la oncoproteína E6 del VPH-AR involucra la degradación del supresor de tumor p53 mediante la ubiquitin ligasa E6AP, suprimiendo la transcripción de genes blancos como p21, BAX, PUMA, NOXA; GADD45 y PCNA directamente implicados en la apoptosis (Vaeteewoottacharn, Chamutpong, Ponglikitmongkol y Angeletti, 2005; Joerger y Fersht, 2008). Se ha descrito que E6 del VPH-AR bloquea la apoptosis por degradación de p53 y por un mecanismo independiente que involucra la inhibición de la expresión del gen Bax (Degenhardt, Sundararajan, Lindsten, Thompson y White, 2002). Además, E6 impide la apoptosis a través de la unión a TNFR1 (Filippova, Song, Connolly, Dermody y Duerksen-Hughes, 2002), en adición a esta vía de TNF Filippova Parkhurst y Duerksen-Hughes (2004) mostraron que E6 del VPH-16 es capaz de inhibir la apoptosis por la vía de Fas y TRAIL, este mecanismo es mediado por la unión de E6 a la proteína adaptadora FADD y caspasa 8. Mediante el análisis de la secuencia del gen E6 del VPH-16 se han establecido variantes que difieren en menos del 2% en su secuencia de DNA, agrupándolas en: Europea (E), Asiática (As), Asiática-Americana (AA), Africana-1 (Af-1), Africana-2 (Af-2) y Norte-Americana-1 (NA-1) (Huertas-Salgado, Martín-Gámez, Moreno, Murilo, Bravo, Villa et al., 2011). Zebhe, Richard, DeCarlo, Shai, Lambert, Lichtig, Tommasino y Sherman (2009) reportaron que la variante E-G350 (L83V) la cual se presenta con alta frecuencia en cáncer cervical se comporta de manera diferente que la E-P durante el proceso de apoptosis en queratinocitos humanos inmortalizados (NIKs). El tratamiento establecido para las etapas localmente avanzadas (IB2-IIA2-IVA FIGO) en cáncer cervical es la quimio-radioterapia concomitante (Montalvo, Coronel, Alvarado, Cantú, Flores, Ortega, et al., 2011). El cisplatino es el principal fármaco anticancerígeno usado en la quimioterapia, el cual induce arresto del ciclo celular y apoptosis en las células tumorales, mientras la radioterapia consiste en el uso de radiación ionizante (rayos X) para destruir las células cancerosas y por ende disminuir el tamaño del tumor. En un estudio *in vitro* realizado por Liu, Xing, Han, et al. (2008) en la línea celular HeLa encontraron que el cisplatino induce apoptosis de manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición de la droga, así mismo observaron una disminución de la expresión de la oncoproteína E6 del VPH y la

restauración de la función de p53, p21 y Bax. El tratamiento combinado de quimio-radioterapia o por separado es la modalidad estándar y más efectiva para la terapia en pacientes con cáncer cervical. No obstante se ha reportado que las pacientes con cáncer cervical que presentan un tipo de VPH-16, muestran una resistencia al tratamiento de quimioterapia y radioterapia en comparación con otro tipo viral, por lo tanto suponemos que la resistencia de los tumores pudiera deberse a las distintas variantes de VPH-16. En este trabajo pretendemos evaluar la resistencia a la apoptosis en células HaCaT transfectadas con la E6 VPH-16 de la variante E-G350 bajo el tratamiento con cisplatino y rayos X, lo cual contribuirá a conocer los mecanismos por los cuales esta variante es más oncogénica y sugerir una posible explicación a la resistencia a la quimio-radioterapia en los tumores.

Materiales y métodos

Cultivo celular

La línea celular HaCaT de queratinocitos inmortalizados no tumorigénicos, fueron cultivadas en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomina. Los cultivos se incubaron a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO_2 y 95% de aire. Las células transfectadas con el plásmido p-EGFP-N1 que tiene clonada la secuencia de E6 VPH-16 E-G350 y E-P fueron cultivadas bajo las mismas condiciones más 5mg/ml del antibiótico de selección G418. Como control de transfección se utilizaron células HaCaT solo transfectadas con el plásmido (Mock).

Ensayos de proliferación con MTT

A partir de cultivos confluentes (80%) en frascos de cultivo de 25 cm^2 las células HaCaT Ctrl, las transfectadas solo con el plásmido (Mock), las transfectadas con E6 del VPH-16 de la variante E-P y E-G350 fueron tripsinizadas y se realizó el conteo celular con azul de tripano. Posteriormente fueron sembradas 5000 células por pozo en placas de 96 pozos y se incubaron overnight, al día siguiente se realizó el tratamiento con cisplatino el cual fue diluido en medio DMEM/F12 a una concentración final de 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 y $30 \mu\text{M}$, las placas se incubaron durante 24, 48 y 72hrs a 37°C en un ambiente con 5% de CO_2 y 95% de aire. Posteriormente la proliferación celular fue evaluada

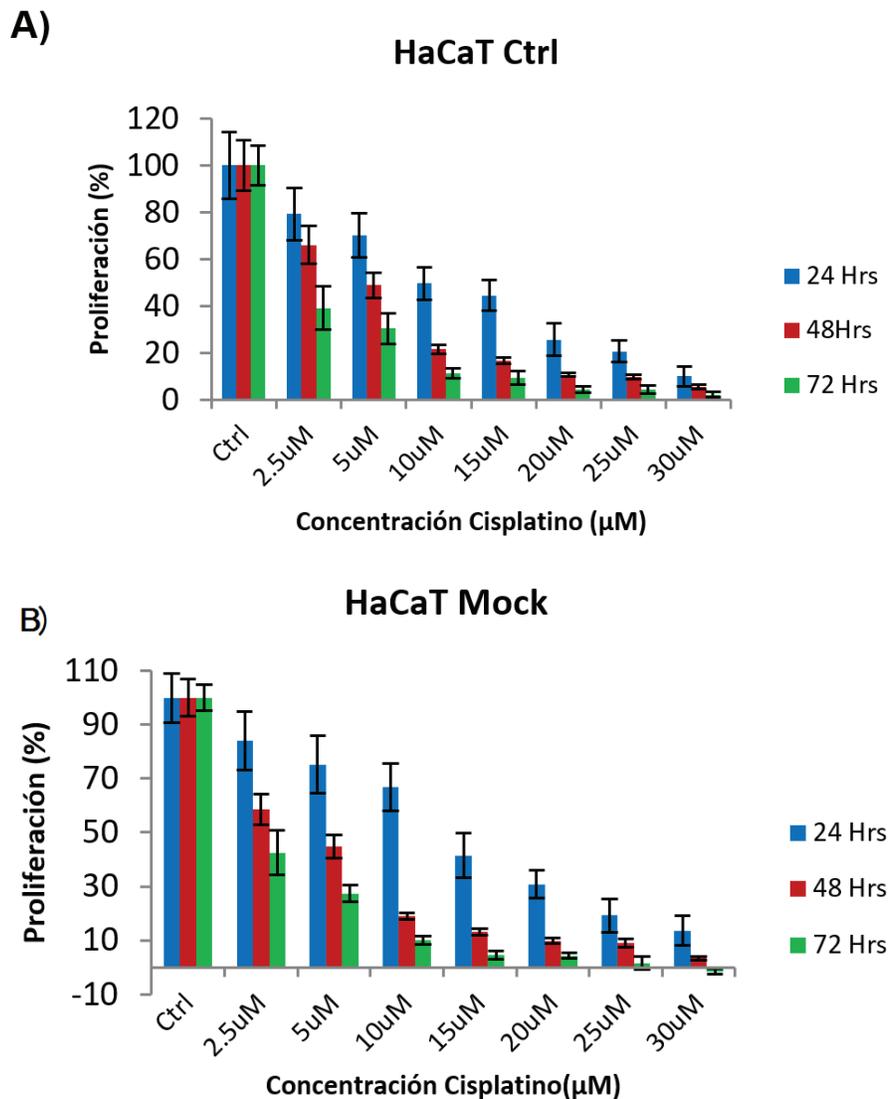


Figura. 1. Citotoxicidad del cisplatino en células HaCaT Ctrl y Mock. A) y B) Crecimiento de células HaCaT Ctrl y Mock expuestas a diferentes concentraciones de cisplatino determinado por ensayo MTT. En las gráficas se representan las medias de tres experimentos independientes realizados por triplicado

por ensayo MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma]. Los cristales de formazán fueron solubilizados con dimetil-sulfoxido (DMSO, Sigma) y finalmente se realizó la lectura de las densidades ópticas (DO) a 570 nm en el lector Epoch.

Viabilidad celular y ensayo clonogénico

Para determinar la DL50 de radiación 1 millón de células fueron sembradas en frascos de cultivo de 25 cm² toda la noche, posteriormente las células se radiaron con 2, 4, 6, 8 y 10 Gy de rayos X, como control se usaron cultivos de células no irradiadas. 24 hrs posteriores a la radiación las células se tripsinizaron y se determinó la viabilidad mediante la tinción con azul tripano. Posteriormente de estas células irradiadas se sembraron 2,000 célula viables por pozo en placas de 6 pozos 24 hrs después del tratamiento con 2, 4, 6, 8 y 10 Gy y de su contraparte sin tratamiento.

Las células se incubaron durante 2 semanas a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂ que para permitir la formación de colonias. Las colonias fueron fijadas con metanol-acido acético 7:1 V/V y teñidas con cristal de violeta al 1%. Las colonias con 50 células o más se consideraron como sobrevivientes clonogénicos. La fracción de supervivencia se calculó con la normalización de la eficiencia de la formación de colonias de las células control (sin radiación). Los experimentos se hicieron por triplicado de forma independiente y se contaron las colonias con más de 50 células de todos los pozos. Los resultados se ajustaron a la fórmula 1:

$$PE = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias formadas}}{\text{N}^\circ \text{ de células sembradas}} \times 100 \quad (1)$$

Donde PE es la relación entre el número de colonias y el número de células sembradas, sin tratamiento.

Para obtener la fracción de supervivencia de las células

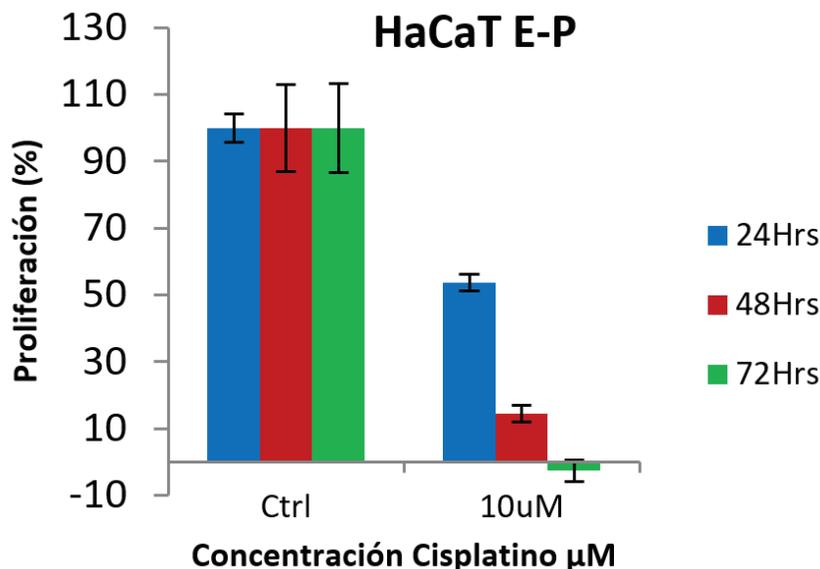


Figura. 2. Citotoxicidad del cisplatino en células HaCaT transfectadas con la variante E-P de E6 VPH-16. Crecimiento de las células HaCaT transfectadas con la variante E-P de E6 VPH-16 expuestas a 10 μM de cisplatino determinado por ensayo MTT. En las gráficas se representan las medias de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

tratadas con radioterapia se utilizó la fórmula 2:

$$SF = \frac{N^\circ \text{ de colonias formadas después del tx}}{N^\circ \text{ de células formadas}} \times PE \quad (2)$$

Donde SF es la fracción superviviente, es decir el número de colonias que surgen después del tratamiento de las células.

Detección de apoptosis

Los 4 grupos de células serán tratados con 10 μM de cisplatino durante 24hrs posteriormente se determinará la apoptosis mediante el kit Annexin V-FLUOS Staining de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante. La anexina V se une específicamente al fosfolípido fosfatidilserina de la membrana plasmática y el núcleo se tiñe al con yoduro de propidio. La apoptosis temprana se definirá como Anexina V+/IP- y la apoptosis tardía se determinará mediante la marca de Anexina +/IP+, los resultados se determinarán mediante citometría de flujo en el equipo BD FACSCanto II.

Western Blot

Las células se dejarán crecer a una confluencia de aproximadamente el 80%, en cajas de Petri con los tratamientos correspondientes de cisplatino y radiación. Posteriormente se realizará la extracción de proteínas totales y la cuantificación se realizó mediante el kit BCA de pierce. 30 μg de proteínas solubles serán separadas por electroforesis de acuerdo a su peso molecular en geles desnaturalizantes de poli-acrilamida (SDS-PAGE) al 12% [4 ml de agua desionizada, 2.5 ml de amortiguador pH 8.8 (Tris 1.5 mM, SDS 0.4%), 100ml de SDS al 10%, 3.3 ml de acrilamida-bis-acrilamida al 30% (29% acrilamida, 1% bis-

acrilamida), 100 ml de persulfato de amonio al 10 %, 10 ml de TEMED], las proteínas serán cargadas con el amortiguador de carga (Tris 62 mM, SDS al 23%, glicerol al 10%, β-mercaptoetanol al 5%, azul de bromofenol al 0.1%) y se utilizará un marcador de peso molecular. La electroforesis se realizará con un amortiguador de corrida (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.05%). Las proteínas serán electrotransferidas a membranas de PVDF en un amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, 20% de metanol). Después de la transferencia las membranas se bloquearán con una solución de TBS 1X-Tween-20 (Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, Tween-20 al 0.01%) con 5% de leche descremada en polvo durante 1 h y se incubarán toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios anti-caspasa 3, 8 y 9 diluidos 1:1000, y como control de carga se usará anti-actina diluido 1:100 en TBS 1X-Tween-20 con 5% de leche descremada. Después de la incubación con los anticuerpos primarios las membranas se lavarán 3 veces durante 5 minutos con TBS 1X-Tween 20% y se incubarán durante 2 h con los anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón (con base en el origen del primer anticuerpo) conjugados con peroxidasa de rábano diluidos 1:5000 en TBS 1X-tween-20 con 5% de leche descremada. Las membranas se lavarán 3 veces durante 5 minutos con TBS 1X-Tween-20 y serán reveladas por quimioluminiscencia.

Actividad de caspasas

La actividad de las caspasas 3, 8 y 9 será medida por la detección del sustrato fluorogénico Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC), N-Acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-7- amido-4-metilcumarina (Ac-IETD-AMC), N-Acetil-Leu-Glu-His-Asp-7-amido-4-trifluorometilcumarina (Ac-LEHD-AFC), respectivamente.

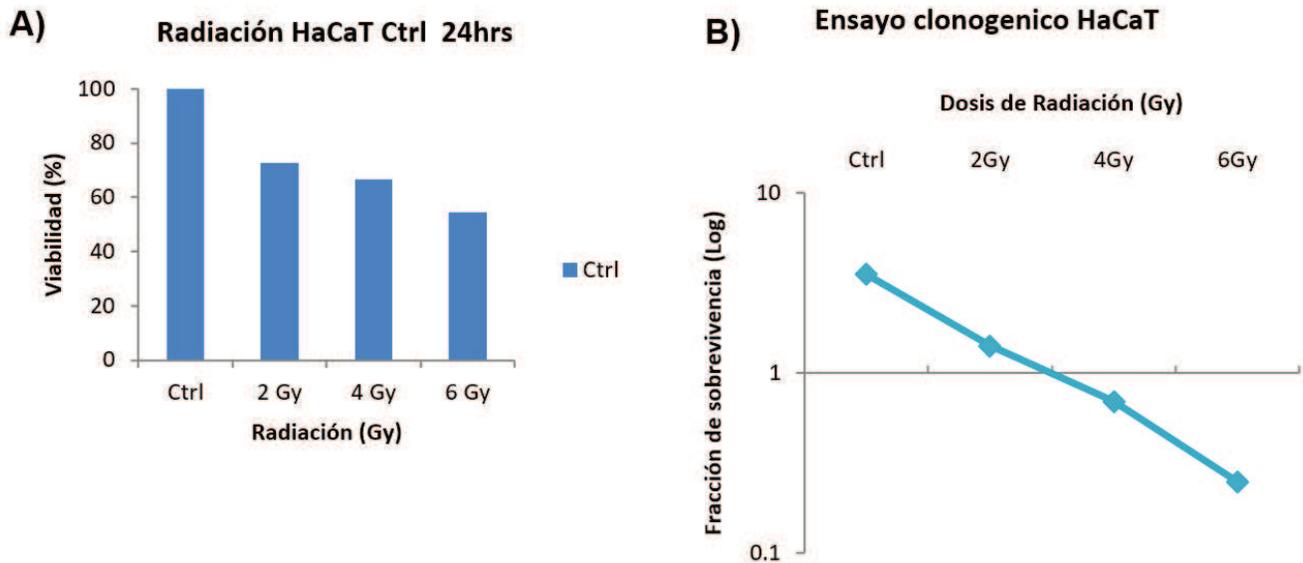


Figura. 3. Citotoxicidad de la radioterapia en células HaCaT Ctrl. A) La viabilidad fue determinada 24hrs después del tratamiento con radiación, el porcentaje de células viables disminuye cuando aumenta la dosis de radiación. B) Ensayo clonogénico en las HaCaT Ctrl.

Las lecturas se realizaron en el luminómetro GloMax Multi-Jr, utilizando el filtro UVGFP.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el paquete estadístico STATA versión 11.0. Los valores de los grupos serán representados en medias y desviaciones estándar o medias geométricas y errores estándar, la comparación de las diferencias entre los grupos se realizó a través de la prueba de ANOVA y/o Kruskal Wallis dependiendo de la normalidad de los datos. Considerando un valor de $p < 0.05$ como significativo.

Resultados

Citotoxicidad del cisplatino en células HaCaT

Para determinar el tiempo y la concentración del tratamiento con cisplatino, las células HaCaT transfectadas solo con el plásmido pEGFP-N1 (Mock) y las control fueron tratadas con las siguientes concentraciones de cisplatino (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 μM) durante 24, 48 y 72hrs. Para determinar el % de proliferación después del tratamiento con cisplatino se realizaron ensayos con MTT. Como se observa en las figuras 1A y 1B, la disminución de la viabilidad en las HaCaT Ctrl después del tratamiento con cisplatino es dependiente de la dosis y el tiempo de exposición del quimioterapéutico. La DL50 es 10 μM .

Así mismo como ya se tenía estandarizado la citotoxicidad del cisplatino con las HaCaT Ctrl y las Mock, en las transfectadas con la variante E-P E6 VPH-16 solo se realizaron ensayos MTT con la DL50 (véase figura 2).

Para evaluar el efecto citotóxico de la radioterapia en las células HaCaT Ctrl estas se expusieron a diferentes dosis de radiación (0, 2, 4, 6 Gy) durante 24hrs. La viabilidad celular se determinó con azul de tripano la sobrevivencia por ensayo clonogénico (véanse figuras 3A y 3B), donde se observa que a medida que aumenta la dosis de radiación el porcentaje de células vivas disminuye.

Así mismos en las células HaCaT transfectadas solo con el plásmido GFP-N1 y con E6 VPH16 de la variante E-P estas se expusieron a diferentes dosis de radiación (0, 2, 4, 6, 8 y 10 Gy) durante 24hrs. la viabilidad celular se determinó con azul de tripano, la sobrevivencia por ensayo clonogénico (solo en se ha hecho en las Mock). En las figuras 4A y 4B se muestra la viabilidad celular de las células HaCaT Mock y E-P después de 24 horas de radiación, notándose que a medida que aumenta la dosis de radiación el porcentaje de células vivas disminuye. En la figura 4C se presenta la curva de sobrevivencia de las HaCaT Mock irradiadas con diferentes dosis de radiación (0, 2, 4, 6 Gy), esto se realizó mediante ensayo clonogénico. Notándose un claro efecto dosis respuesta en las HaCaT Mock, en la cual la fracción de sobrevivencia celular disminuye cuando incrementa la dosis de radiación.

Discusión y conclusiones

El cisplatino es considerado una droga antitumoral, su efecto reside a nivel de daño en el DNA formando principalmente aductos entre las hebras de DNA y finalmente conduce a muerte celular. En nuestros resultados se muestra que el cisplatino inhibe el crecimiento celular de HaCaT sin transfectar y HaCaT Mock de una manera dependiente del tiempo de exposición y la dosis de cisplatino, esto concuerda con lo reportado por Liu et al., en el 2008 utilizando como modelo células HeLa.

Mediante curvas de dosis respuesta con MTT para evaluar la citotoxicidad del cisplatino determinamos que la DL50 a 24 hrs del tratamiento con el cisplatino es de 10 μM , debido a que después del tratamiento, la proliferación celular en las HaCaT Ctrl fue de 49%, mientras que en las

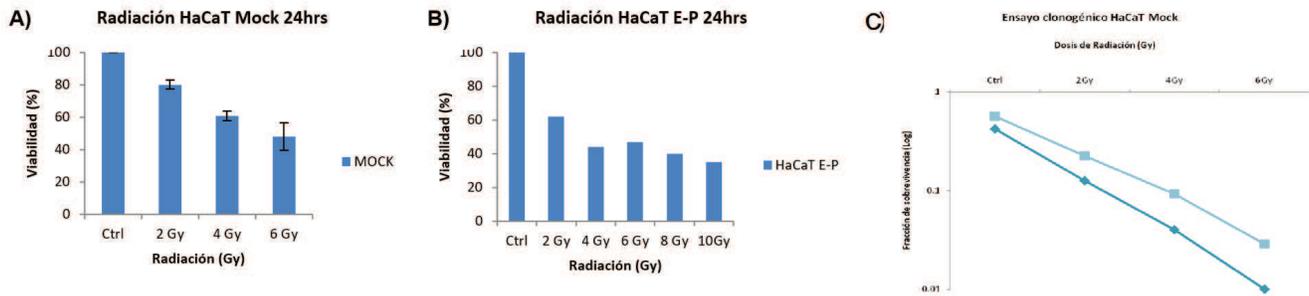


Fig. 4. Determinación de la viabilidad celular en células HaCaT transfectadas y ensayo clonogenico. A) y B) la viabilidad fue determinada 24hrs después del tratamiento con radiación en las Mock y E-P, el porcentaje de células viables disminuye cuando aumenta la dosis de radiación. C) Ensayo clonogenico HaCaT Mock irradiadas. La sobrevivencia celular posterior a la radiación se midió por ensayo clonogenico, la capacidad de las células de formar colonias después de la radiación disminuye a dosis altas de radiación

HaCaT Mock a estas dosis de cisplatino la proliferación fue del 66%. En comparación con las HaCaT transfectadas con E6 del VHP-16 observamos que la proliferación disminuyó a 53% respecto al mock. Por lo tanto se puede concluir que en las HaCaT Ctrl hubo más células muertas (51%) en comparación con las células transfectadas con la variante E-P de E6 (47%), esto pudiera deberse al hecho de la presencia de E6 del VPH16 el cual le confiere características distintas a la célula cuando es expuesta a cisplatino.

Mediante el ensayo clonogenico fue posible determinar la DL50 de radiación debido a no se pudo estandarizar con ensayos MTT, encontramos que con la dosis terapéutica (2Gy) que suelen recibir las pacientes la población celular disminuyó a la mitad y que la capacidad de las células de formar colonias después de la radiación disminuye a dosis altas de radiación.

Con estos datos podemos concluir preliminarmente que la transfección del plásmido p-EGFP-N1 en las células HaCaT no tiene efecto alguno en respuesta al tratamiento con cisplatino, así también tenemos que DL50 de cisplatino en los tres grupos de estudio es de 10 μ M, mientras la DL50 en el caso de la radiación se logra con la dosis terapéutica 2Gy.

Referencias

- Degenhardt, K., Sundararajan, R., Lindsten, T., Thompson, C., y White, E. (2002). Bax and Bak independently promote cytochrome C release from mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 277(141), 27-34.
- Filippova, M., Song, H., Connolly, J.L., Dermody, T.S. y Duerksen-Hughes, P.J. (2002). The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF)

R1 and protects cells from TNF induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 21730–21739.

- Filippova, M., Parkhurst, L., Duerksen-Hughes, P.J. (2004). The Human Papillomavirus 16 E6 Protein Binds to Fas-associated Death Domain and Protects Cells from Fas-triggered Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25729–25744.
- Huertas-Salgado, A., Martín-Gómez, D.C., Moreno, P., Murilo, R., Bravo, M.M., Villa, L. et al., (2011). E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: An updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology*, 410, 201–215
- Joerger, C.A., y Fersht, R.A., (2008). Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. *The Annual Review of Biochemistry*, 77, 557–82.
- Liu Y. Q., Xing H., Han X. B., et al. Apoptosis of HeLa cells induced by cisplatin and its mechanism. *Journal of Huazhong University of Science and Technology—Medical Science*. 2008;28(2):197–199. doi: 10.1007/s11596-008-0221-7.
- Montalvo, E G., Coronel, M J A., Alvarado, Z A., Cantú, L D E., Flores, A D., Ortega, R A., et al., (2011). Oncogénia. *Cancerología*. 6, 61-69.
- Vaeteewoottacharn, K., Chamutpong, S., Ponglikitmongkol, M., y Angeletti, P. (2005). Differential localization of HPV16 E6 splice products with E6-associated protein. *Virology Journal*, 2(50), 1-6.
- Zehbe, I., Richard, C., DeCarlo, C. A., Shai, A., Lambert, P. F., Lichtig, H., Tommasino, M. y Sherman, L. (2009). Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology*, 383:69-77.