

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**ROL DE EGFR EN LA ACTIVACIÓN DEL PROMOTOR
P97 DE HPV-16 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER
DE CUELLO UTERINO EXPUESTAS A CONDENSADO
DE HUMO DE CIGARRILLO**

JUAN PABLO MUÑOZ BARRERA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Director de Tesis: Prof. Dr. Francisco Aguayo González

2018

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

JUAN PABLO MUÑOZ BARRERA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 12 de Julio de 2018.

Prof. Dr. Francisco Aguayo González
Director de Tesis
Departamento de Oncología Básico-Clínico
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

PROF. DRA. CARMEN ROMERO

PROF. DR. OSCAR LEÓN

PROF. DR. JUAN CARLOS ROA

PROF. DR. JULIO TAPIA
Presidente Comisión de Examen

FINANCIAMIENTO

La presente tesis fue financiada por proyecto FONDECYT regular 1161219 otorgado a Dr. Francisco Aguayo González. Beca CONICYT Doctorado nacional 2014 y beca Gastos operacionales 21141112 otorgadas a Juan Pablo Muñoz Barrera.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados de esta tesis son fruto del trabajo colaborativo de muchas personas, donde el autor fue sólo el catalizador que aglutinó los conocimientos y habilidades de todas ellas.

El principal agradecimiento es dirigido al Profesor Dr. Francisco Aguayo González, por su sabiduría, su compromiso y por lograr transmitir su pasión por la ciencia a sus estudiantes. Personalmente estaré eternamente agradecido por la formación que recibí de él.

Agradezco también a las personas que estuvieron y están en el laboratorio. De todos ellos me llevo aprendizajes que trascienden al ámbito del trabajo. Quisiera nombrarlos a todos, mas, los llevaré siempre en mi memoria.

Agradezco al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por permitirme ser parte de su alumnado. Fue un verdadero privilegio compartir las aulas con las personas que conocí en estos cuatro años. Dentro del programa de doctorado agradezco especialmente a Cecilia Carter por ser el faro que me dirigió en todo este proceso.

Agradezco finalmente a la comisión nacional de investigación científica y tecnológica por su apoyo permanente. Espero estar a la altura, retribuir y ser un verdadero aporte al desarrollo del país.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a la persona que me educó, quien guío mis pasos y se sacrificó para que pudiera convertirme en lo que ahora soy. A quién hizo que mi vida fuera más fácil: Mi madre

TABLA DE CONTENIDOS

<i>Sección</i>	<i>Página</i>
I- Abreviaciones	6
II- Resumen.....	9
III- Abstract	10
IV- Introducción	11
4.1 Cáncer Cérvico uterino.....	11
4.2 Cáncer Cérvico uterino: Factores etiológicos.....	11
4.3 Virus Papiloma Humano.	12
4.4 Regulación de la expresión génica de HPV.....	17
4.5 Humo de cigarrillo.....	20
4.6 Hábito tabáquico y HPV.....	21
4.7 AP-1 como mediador de CSC y HPV.....	23
V- Hipótesis.....	26
VI- Objetivos.....	26
VII- Materiales y Métodos.....	27
VIII- Resultados.....	33
IX- Discusión.....	54
X- Bibliografía.....	64

I- ABREVIACIONES

Akt: Proteína quinasa B

AP-1: Proteína activadora 1

BSA: Albumina de suero bovino

CDK1: quinasa dependiente de ciclina-1

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

CREB: Elemento de respuesta a adenosín monofosfato-3',5' cíclico

ChIP: Inmunoprecipitación de Cromatina

CHX: Cicloheximida

CSC: Condensado de humo de Cigarrillo

CYP1B1: Citocromo P450 1B1

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidermal

EGFR: Receptor de factor de crecimiento epidermal

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GADPH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

HPV16: Papilomavirus Humano tipo 16

HR-HPV: Papilomavirus de alto riesgo

HSP-27: Proteína de choque térmico

IARC: Agencia Internacional para la investigación del cáncer

IgG: Inmunoglobulina G

JNK1: Quinasa c-Jun N-terminal

KDa: Kilo Dalton

LCR: Región Larga de Control

Luc2: Luciferasa 2

MEK: Quinasa regulada por mitógenos
MMLV: Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney
mRNA: Ácido ribonucleico mensajero
MTORC1: Complejo 1 blanco de Rapamicina
MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio)
NAChR: Receptores nicotínicos de acetilcolina
NIE: Neoplasia intraepitelial
NNK: 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona
ns: No significativo
ORF: Marco de lectura abierto
PAH: Hidrocarburos aromáticos policíclicos
Pb: Pares de bases
PBS: Tampón fosfato Salino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K: Quinasa de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PRB: Proteína del retinoblastoma
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNA: Ácido ribonucleico
RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR: Transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa
S73: Serina 73
SDS: Dodecilsulfato sódico
SFB: Suero Fetal bovino
T202: Treonina 202
TBS-T: Tampón salino de Tris con Tween-20
TEMED: Tetrametiletildiamina
TOR: Blanco de rapamicina
TPA: Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
TRE: Elemento de respuesta a Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
WB: Western Blot

II- RESUMEN

La infección por el virus papiloma humano de alto riesgo (HR-HPV) ha sido reconocido como un factor etiológico para el desarrollo del cáncer cérvico uterino, aunque, en la mayoría de los casos la infección es benigna y no se traduce en enfermedad. Se ha sugerido que se requieren condiciones adicionales para la carcinogénesis. Estudios epidemiológicos han revelado que el tabaquismo es un cofactor para el inicio y la progresión del cáncer cérvico uterino, además, estudios *in vitro* han demostrado que algunos componentes del tabaco como Benzo[a]pireno, aumentan el título viral y la expresión de genes virales. No obstante, los mecanismos por los cuales el humo del tabaco coopera con HPV en el cáncer de cuello uterino son aún poco conocidos. Las líneas celulares derivadas del cáncer de cuello uterino CaSki y SiHa, se expusieron agudamente a condensado de humo de cigarrillo (CSC) en diversas concentraciones no tóxicas. Los resultados mostraron que la expresión de E6 y E7 se regula de forma dependiente de la dosis de CSC. Posteriormente, utilizando un vector reportero que contiene el exón de luciferasa bajo el control de la región larga de control (LCR) de HPV16, se confirmó la dependencia de la actividad del promotor p97 con el CSC. Además, mutaciones puntuales en los elementos de respuesta a TPA residentes en la LCR (sitios TRE) disminuyeron significativamente la activación del promotor p97. Ensayos fosfoproteómicos y el uso de inhibidores específicos revelaron que la sobreexpresión de E6 / E7 mediada por CSC es, al menos en parte, dependiente de la fosforilación de EGFR. Además, se demostró que la vía PI3K/Akt es crucial para la sobreexpresión de E6/E7 inducida por CSC. Finalmente, se observó que la sobreexpresión de E6/E7 de HPV16 está mediada por la sobreexpresión de *c-jun*, la fosforilación de c-Jun y el reclutamiento de este factor de transcripción para los sitios TRE en la LCR de HPV16. Los resultados expuestos permiten concluir que la exposición aguda a condensado de humo de cigarrillo activa la transcripción de los oncogenes E6 y E7 de HPV16 a través de la activación del promotor p97, lo cual implica activación de la vía de señalización EGFR / PI3K / AKT / C-jun en células de cáncer de cuello uterino.

III- ABSTRACT

High-risk human papillomavirus (HR-HPV) infection is not a sufficient condition for cancer development because most infections are benign and naturally cleared. Previous reports suggest that tobacco smoke stimulates viral genes transcription in cervical cancer cells and epidemiological studies have revealed that tobacco smoking is a cofactor with HR-HPV for cervical cancer initiation and progression. On the other hand, previously we demonstrated that cigarette smoke condensate (CSC) can activate the HPV16 p97 promoter activity. However, the mechanisms by which tobacco smoke cooperates with HR-HPV in cervical cancer are poorly understood. Therefore, the aim in this thesis is to characterize the role of some signaling pathways involved in the CSC-mediated HPV-16 p97 promoter activation. Cervical cancer-derived cell lines, CaSki (HPV16; 500 copies per cell) and SiHa (HPV16; 2 copies per cell), were acutely exposed to cigarette smoke condensate (CSC) at various non-toxic concentrations. Consistent with many previous reports, E6 and E7 expression was significantly upregulated in a dose-dependent manner in the presence of CSC. Using a reporter construct containing the luciferase gene under the control of the full HPV16 long control region (LCR), we confirmed the CSC-dependence of p97 promoter activity. Mutations in the LCR-resident TPA-response elements (TRE sites) significantly decreased p97 promoter activation. Using phosphoproteomic arrays and specific inhibitors it was revealed that CSC-mediated E6/E7 overexpression is at least in part reliant on EGFR phosphorylation. On the other hand, EGFR phosphorylation was necessary for CSC-mediated E6/E7 overexpression. In addition, we showed that the PI3K/AKT pathway is crucial for CSC-induced E6/E7 overexpression. Finally, we demonstrated that HPV16 E6/E7 overexpression is mediated by *c-jun* overexpression, c-Jun phosphorylation and recruitment of this transcription factor to TRE sites in the HPV16 LCR. We conclude that acute exposure to tobacco smoke activates the transcription of HPV16 E6 and E7 oncogenes through p97 promoter activation, which involves the EGFR/PI3K/AKT/C-jun signaling pathway activation in cervical cancer cells lines.

IV- INTRODUCCIÓN.

4.1 Cáncer cérvico uterino

El cáncer cérvico uterino corresponde a un conjunto heterogéneo de neoplasias malignas que se desarrollan en la porción fibromuscular inferior del útero que se proyecta dentro de la vagina [1]. La enfermedad se manifiesta inicialmente a través del desarrollo de una lesión epitelial precursora de lenta y progresiva evolución en el tiempo, denominada neoplasia intraepitelial (NIE-I, II y III) o carcinoma *in situ* cuando la zona afectada compromete sólo a la superficie epitelial. En su etapa final la enfermedad puede progresar a cáncer invasor cuando la lesión logra traspasar la membrana basal y expandirse hacia otros tejidos [2].

Este tipo de cáncer representa un importante problema de salud pública, pues se estima que produce alrededor de 231.000 muertes por año, 80% de las cuales ocurren en países en vías de desarrollo. Las zonas de alto riesgo incluyen Sudamérica, sur de África y la India. En los Estados Unidos existen más de 10.000 nuevos casos al año con más de 3.700 muertes. La población femenina originaria de Latinoamérica es considerada como de alto riesgo, donde cada año se reportan 68.000 nuevos casos. Estudios comparativos de las tasas de mortalidad por esta patología, señalan que las tasas más altas corresponden a Chile y México, mientras que las más bajas ocurren en Cuba, Puerto Rico y Argentina. En Chile se estima una incidencia de 30 por cada 100.000 mujeres; anualmente se diagnostican 1.500 casos y fallecen alrededor de 900, siendo la tasa de mortalidad de 9,6 por cada 100.000 mujeres [3].

4.2 Cáncer cérvico uterino: Factores etiológicos

En la década de 1970, Harald zur Hausen detectó la presencia del virus papiloma humano (HPV) en verrugas y biopsias procedentes de pacientes con cáncer de cuello uterino [4]. Posteriormente, su investigación reveló que existe una asociación causal entre el virus y este tipo de cáncer. Sin embargo, Harald zur

Hausen y otros han demostrado que la mera infección con HPV no es suficiente para inducir la transformación celular y que es probable una etiología multifactorial, donde otros factores pueden contribuir al desarrollo de este tipo de cáncer [5].

4.3 Virus Papiloma Humano

El HPV es un pequeño virus DNA perteneciente a la familia *papillomaviridae*. La partícula viral está formada por una cápside icosaédrica sin envoltura, de 55 nm de diámetro, compuesta por 72 capsómeros pentaméricos (**Figura 1**). Posee un genoma circular bicatenario, conteniendo aproximadamente 8.000 pares de bases (pb) organizado en tres regiones: 1) La región temprana (Región E), que codifica las proteínas no estructurales (E1-E7) relacionadas con la replicación y propiedades de transformación de HPV; 2) la región tardía que contiene los marcos de lectura abierto para los genes L1 y L2, los cuales codifican para dos proteínas estructurales del mismo nombre que forman la cápside viral; y 3) la región reguladora no codificante, denominada región larga de control (Long Control Region ó LCR) (**Figura 2**).

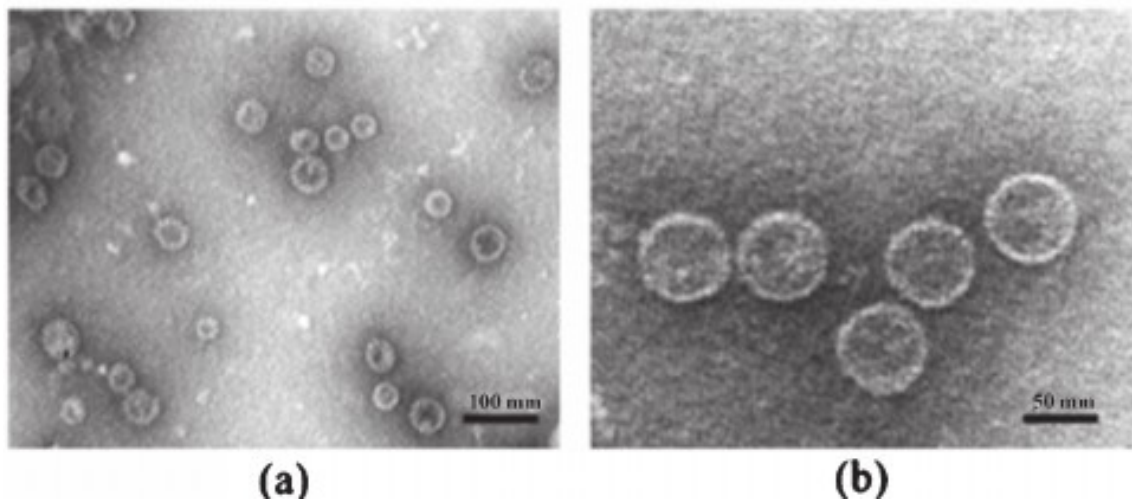


Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión de partículas virales de HPV-16. (a) Campo que muestra partículas virales que varían en tamaños de 35-50 nm; (b) grupo de viriones de tamaño uniforme.

Esta última, con una longitud aproximada de 1.000 pb (12% del genoma viral) se divide en tres segmentos: El segmento 5' o distal contiene señales de terminación de la transcripción y una región de unión a la matriz nuclear; el segmento central, que contiene un potenciador específico de la célula epitelial, con sitios de unión para factores de transcripción celulares o virales que controlan la transcripción y replicación del genoma viral; y el segmento 3' que contiene el origen de replicación y el promotor para los oncogenes tempranos E6 y E7 [6] (**Figura 3**).

Hasta la fecha, alrededor de 210 genotipos de HPV han sido caracterizados, los cuales se han clasificado en cinco géneros (α , β , γ , μ , ν) basado en análisis de secuencia de sus genomas, tropismo y asociación con distintas enfermedades. De estos, los α -papilomavirus, con tropismo a células epiteliales (cutáneas y mucosas), han sido el grupo mejor caracterizado por su implicancia en los procesos de tumorigénesis de células de cuello uterino [7]. De acuerdo con su potencial oncogénico, los α -papilomavirus han sido divididos en bajo y alto riesgo: Los genotipos de bajo riesgo, HPV6 y 11 principalmente, están asociados con la mayoría de las lesiones mucosas benignas y verrugas de piel, además, estos genotipos están implicados en el desarrollo de enfermedades del tracto aerodigestivo superior, como la papilomatosis respiratoria, que de no recibir el tratamiento adecuado, puede progresar a cáncer. Por otro lado, 12 genotipos de HPV de alto riesgo (AR-HPV), 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59 han sido descritos como carcinógenos en humanos según la Agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC), siendo los genotipos HPV16 y HPV18 los más prevalentes, asociados a cerca del 70% de los casos de cáncer de cuello uterino y de un subgrupo de tumores de cabeza y cuello [8].

El mecanismo oncogénico de AR-HPV ha sido caracterizado en el modelo de queratinocitos, donde el virus infecta ingresando a través de microlesiones a células de la lámina basal del epitelio escamoso estratificado (**Figura 4**). Allí, las partículas virales se unen inicialmente a proteoglicanos heparán sulfato, que inducen un cambio conformacional en la cápside viral permitiendo su unión a receptores celulares que median su entrada a través de endocitosis. Una vez en el citoplasma, la partícula viral se aloja en endosomas tardíos, donde se

desensambla permitiendo que el genoma viral sea traslocado al núcleo mediado por la proteína L2. En el núcleo, el genoma viral se mantiene inicialmente como un episoma, donde se replica utilizando la maquinaria celular, resultando entonces en la producción de 20 a 100 copias extracromosomales [9].

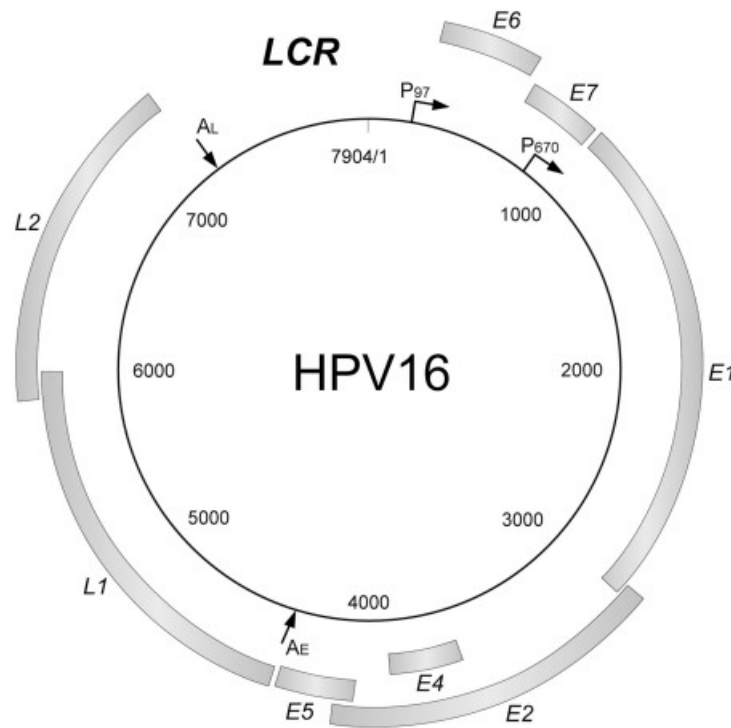


Figura 2. Genoma del virus papiloma humano tipo 16

Se ha descrito que los genotipos de alto riesgo pueden integrar su genoma como simple o múltiples copias en el genoma de la célula infectada. En el primer caso, también llamado integración de tipo I, la pérdida de la región 3' lleva a la supresión del ORF para el gen E2 con pérdida del sitio de poliadenilación, así, la polimerasa II adopta el sitio de poliadenilación más cercano del genoma de la célula hospedera, generando transcritos provenientes de regiones virales y celulares los cuales son más estables. El segundo tipo de integración, llamado Tipo II implica la formación de concatameros con secuencias intercaladas del genoma de la célula

hospedera en el cual la actividad transcripcional parece estar restringida a secuencias río abajo [10].

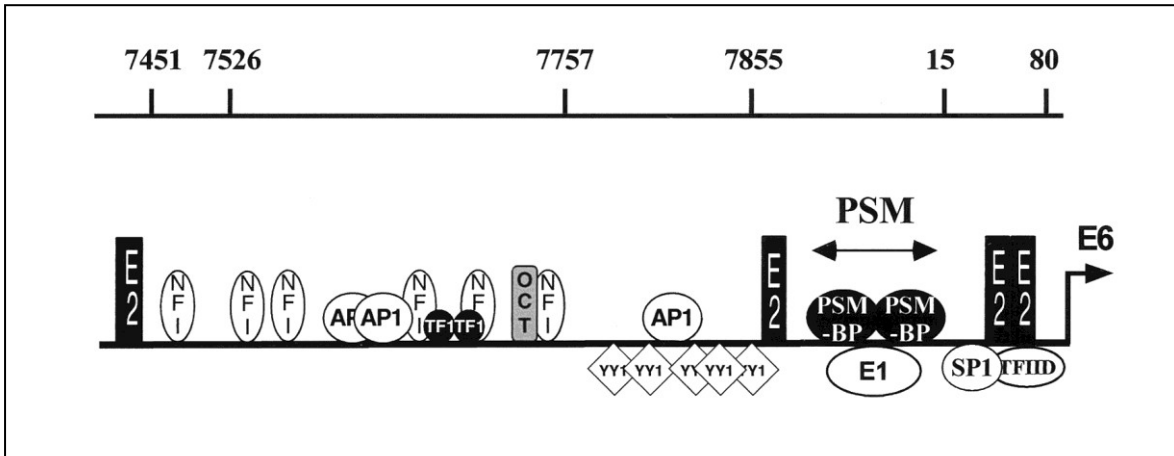


Figura 3. Región LCR del genoma de HPV16, se señalan los sitios de unión para factores celulares y virales que regulan la expresión del genoma viral.

El proceso de transcripción del genoma viral se inicia con la unión de factores de transcripción celulares al promotor temprano p97 localizado en la LCR, lo cual genera los mRNA policistrónicos codificantes para las proteínas E1 y E2 que participan en la replicación y transcripción del genoma viral. Se ha descrito que la proteína E2 funciona como un factor de transcripción a través de sus sitios de unión a la LCR, modulando la expresión de transcritos virales tempranos. Se ha demostrado también que E2 a concentraciones altas, impide la unión de factores de transcripción celulares reprimiendo la expresión de las proteínas virales, mientras que a bajas concentraciones se comporta como activador transcripcional, promoviendo la expresión de las proteínas virales tempranas, entre ellas E6 y E7. Estas últimas, son dos oncoproteínas con dominios de unión a adaptadores intracelulares que les permiten dirigir la degradación proteosomal ubiquitina-dependiente de p53 y pRB respectivamente, con la consiguiente pérdida de la capacidad apoptótica y control del ciclo celular [11]. La regulación de la actividad del promotor p97 cumple por lo tanto un rol central en la expresión de E6 y E7 y en el potencial oncogénico de este virus [11].

Aunque las funciones de E6 y E7 han sido bien caracterizadas, el rol de la proteína E5 es aún enigmático. E5 se localiza en la membrana de la célula infectada, donde se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) induciendo su dimerización. Esto resulta en la transmisión de señales mitogénicas al núcleo, estimulando así el crecimiento celular. Además, hay evidencia que las proteínas E5, E6 y E7 mantienen un entorno intracelular que promueve la replicación eficiente del genoma viral con la ayuda de E1 y E2 [12].

El ciclo replicativo del virus culmina con la activación del promotor tardío p670 que controla la expresión de los genes virales L1 y L2, cuyas proteínas del mismo nombre, forman la cápside viral necesaria para el ensamblaje del genoma en los nuevos viriones. El ensamblaje y maduración del virión se lleva a cabo en las capas superiores del epitelio estratificado, donde es liberado producto de la descamación celular (**Figura 4**).

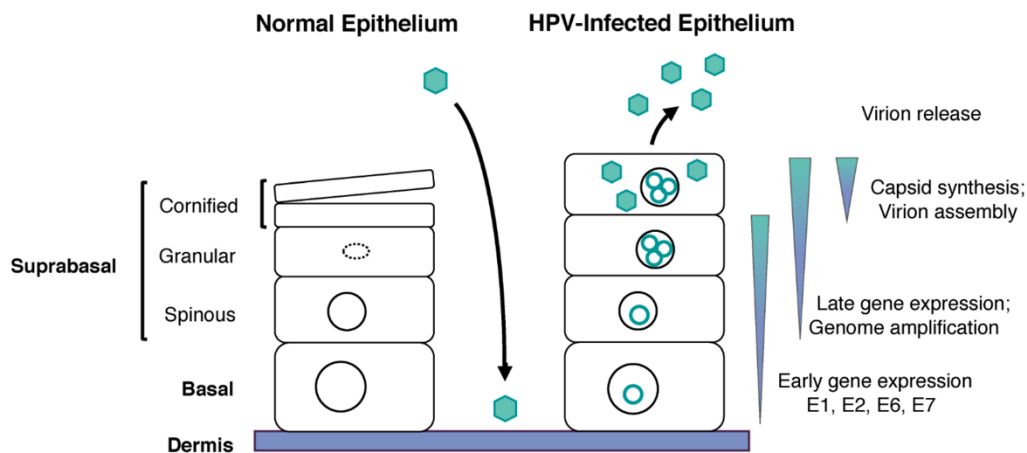


Figura 4. Ciclo replicativo de HPV. El virus infecta la capa de células basales, a las que accede a través de microlesiones en la mucosa. En los núcleos de las células infectadas, el virus establece su DNA como elementos extracromosómicos, o episomas. Al momento de la división celular, las células infectadas migran a capas suprabasales, donde se produce la amplificación del genoma viral a miles de copias por célula. La expresión génica tardía, el ensamblaje del virión, así como la liberación, se producen en las capas superiores.

El ciclo viral, está por lo tanto, estrechamente relacionado con la diferenciación de las células basales infectadas [6].

En células derivadas de cáncer cérvico uterino se ha demostrado que las oncoproteínas E6 y E7 interactúan con un gran número de proteínas intracelulares, provocando alteraciones moleculares adicionales. Una de las vías de señalización más importantes en el ciclo viral es la activación de MTORc1 y la vía de las MAPK a través de la activación de receptores tirosina quinasa e internalización de EGFR. De esta manera la sobreexpresión temprana de las oncoproteínas E6 y E7 es el punto clave para la tumorigénesis pues favorece y promueve la progresión del ciclo replicativo del virus.

4.4 Regulación de la expresión génica de HPV.

La capacidad de AR-HPV para promover la transformación celular se atribuye en parte a la coordinación estricta de la expresión de los genes virales con la etapa de diferenciación de la célula infectada. La expresión génica de HPV es compleja y está regulada principalmente por proteínas celulares, factores virales, por *splicing* y poliadenilación de RNA. De esta forma un programa de expresión génica desregulada permite que algunos genotipos de HPV establezcan la persistencia a largo plazo [13].

En las primeras etapas del ciclo viral, la actividad del promotor temprano p97 se ve influenciada por factores transcripcionales celulares, muchos de ellos considerados como parte de familias multigénicas responsables de la transcripción celular general. Dentro de estos, la proteína adaptadora 1 (AP-1) promueve la expresión temprana del genoma viral durante el proceso de diferenciación celular. AP-1 está constituido por los productos de las familias de oncogenes celulares *jun* y *fos*, los cuales constituyen homo o heterodímeros funcionales capaces de activar fuertemente la actividad de p97 a través de su unión física en el *enhancer* del genoma viral. Aunque AP-1 se considera como un factor ubicuo y asociado a la transcripción de varios genes celulares, las combinaciones de los diferentes productos de la familia *jun* (*c-jun*, *junB* y *junD*) entre sí y con los de la familia *fos* (*c-fos*, *fosB*, *fra1* y *fra2*), establecen una transcripción tejido-específica.

Por otro lado, los factores Octa-1, TEF-1 y TEF-2 son considerados como factores transcripcionales epitelio-específicos para ciertos genotipos de HPV, donde pueden también desempeñar actividades represoras de la transcripción. En consecuencia, la transcripción epitelio-específica de HPV depende de una variedad de factores celulares, muchos de ellos considerados como parte de familias multigénicas responsables de la transcripción celular general y tejido-específica. Sin embargo, cada factor por sí solo no tiene una actividad significativa sobre el promotor temprano y algunos parecen redundar en sus funciones. Se requiere de la cooperación funcional de todos para constituir la actividad potenciadora de la transcripción de HPV. Esta cooperación además requiere del contacto físico directo entre los diferentes factores, así como del establecimiento de interacciones proteína-proteína a través de factores reguladores que no establecen un contacto directo con el DNA, como los supresores de tumor p53 y p105 [14]. Si bien las proteínas celulares juegan un rol clave en la regulación de la transcripción de HPV, la actividad que ejerce la proteína viral E2, es quizás más importante, pues participa reprimiendo o activando la transcripción dependiendo de la cercanía entre sus sitios de interacción y la caja TATA. Existen dos sitios de unión para E2 a 3-4 pb de la caja TATA, así la unión de E2 en estos sitios resulta en la represión del promotor temprano debido posiblemente a la exclusión física de los factores asociados a caja TATA. Por otra parte, los HPV cutáneos presentan sitios de interacción a E2 a menos de 100 pb de distancia de la caja TATA, lo cual no influye en la actividad transcripcional [15]. La proteína E2 posee tres dominios funcionales: el extremo amino terminal, donde reside la actividad potenciadora de la transcripción que es, aparentemente, independiente de la interacción con el DNA; el extremo carboxilo terminal, donde se realiza la función de interacción con el DNA y, por lo tanto, es donde reside la capacidad de represión transcripcional; y la porción intermedia que, por su alto contenido de prolina, es considerada como una bisagra. La capacidad de activación de E2 se debe a la facilidad del extremo amino de interactuar físicamente con factores celulares [16]. En vista de las características palindrómicas del sitio E2, es lógico y ha sido experimentalmente demostrado que

la proteína E2 se une en forma dimérica a su sitio blanco. Sin embargo, se requieren dos sitios E2, es decir de un tetrámero de la proteína E2, para activar la transcripción. Además de su papel esencial en la regulación transcripcional, la proteína E2 también tiene una función relevante en la replicación del DNA viral [17]. Al asociarse físicamente con la proteína E1, E2 le confiere especificidad de secuencia para unirse al DNA. Esta interacción es necesaria y suficiente para promover la replicación viral, independientemente del entorno celular.

La regulación de la expresión génica de HPV, no solo depende de factores de transcripción, sino también de procesos post transcripcionales. Durante el ciclo viral, se generan mRNA policistrónicos, los cuales son sometidos posteriormente a *splicing* alternativo a través del uso diferencial de sitios de *splicing* ubicados en el genoma viral. Así, los mRNA expresados a partir de p97 tienen el potencial de expresar las oncoproteínas E6 y E7, así como E1, E2, E4 y E5. A medida que la célula infectada se diferencia, el promotor tardío p670 se activa, y la maquinaria transcripcional evita los genes E6 y E7 e induce una alta expresión de mRNAs de E1, E2 y E4 usando sitios de *splicing* distintos.

Por otro lado, y como se dijo anteriormente, los altos niveles de E2 inhiben el promotor p97, pero no el promotor p670, esto da como resultado altos niveles de E1, E2 y E4 y un eventual apagado en la expresión de E6 y E7, permitiendo así la expresión de L1 y L2. Durante estas condiciones, se propicia la replicación del genoma viral en la célula infectada [13].

Como se ha mencionado, la regulación de la expresión génica de HPV puede ocurrir mediante diferentes mecanismos gatillados por factores endógenos tanto virales como celulares, aunque se han descrito que otros cofactores exógenos también podrían estar involucrados. Una de las primeras evidencias al respecto fue la investigación de Chan y colaboradores, quienes identificaron una secuencia de nucleótidos específica para la unión de receptores a glucocorticoides dentro de la LCR de HPV16 [18]. Más tarde, Yuan y colaboradores, demostraron que la progesterona aumenta la transcripción de los oncogenes E6 y E7 de HPV16 en líneas celulares que contienen el genoma viral [19].

Dada la evidencia anterior, se ha propuesto que algunos compuestos químicos ambientales también podrían influenciar la expresión génica de HPV. De hecho, en la primera mitad del siglo XX, Peyton Rous demostró la acción conjunta entre los alquitranes y HPV para inducir consistentemente carcinomas de células escamosas en conejos [20]. Estos experimentos históricos fueron los primeros en demostrar que la carcinogénesis en animales se puede inducir a través de la acción conjunta entre dos agentes. En 1977, Winkelstein planteó la hipótesis de que el tabaquismo era un factor causal del cáncer de cuello uterino al encontrar evidencia de una correlación directa entre las tasas de incidencia de cáncer de cuello uterino y cáncer de pulmón en hombres [21]. Así entonces el modelo de Rous como prototipo y los resultados de Winkelstein, se podría especular que algunos casos de cáncer de cuello uterino surgen de una interacción entre virus oncogénicos y exposiciones a factores ambientales, por ejemplo, el humo del cigarrillo.

4.5 Humo de cigarrillo.

De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS), el humo del cigarrillo es considerado el principal carcinógeno humano, el cual a través de distintos mecanismos participa en la iniciación y progresión neoplásica. Además es considerado la mayor causa prevenible de morbilidad y mortalidad en el mundo, produciendo más de 5 millones de muertes cada año [22].

El humo del tabaco es una mezcla compleja de compuestos químicos. Algunos de estos, como el monóxido de carbono (CO), el cianuro de hidrógeno (HCN) y los óxidos de nitrógeno (NO_x), son gases. Otros, como el formaldehído, la acroleína, el benceno y ciertas nitrosaminas, son sustancias volátiles suspendidas como coloides, mientras que la nicotina, el fenol, algunos hidrocarburos poliaromáticos (HAP) y ciertas nitrosaminas, están contenidos como partículas sólidas en suspensión [23].

Las alteraciones moleculares que ejerce el humo del cigarrillo han sido por mucho tiempo el principal foco de estudio para comprender el proceso de carcinogénesis pulmonar, demostrando que las alteraciones más frecuentes son la generación de

aductos en el DNA así como la activación de distintas vías de transducción de señales producto de la unión de componentes del humo de cigarrillo como la nicotina a receptores de membrana [24]. Una de las vías gatilladas mejor caracterizadas, en el modelo de células orales y pulmonares es la vía de las Proteínas Quinasas Activadas por Mitógeno ERK 1/2 [25], cuya activación inicial por EGFR conlleva al reclutamiento de la proteína Raf1 a la cara interna de la membrana y a una cascada de fosforilaciones que culminan con la activación de los factores de transcripción Sp1, Ets1, AP-1 y su posterior unión a sus respectivos sitios regulatorios posicionados en la región promotora de distintos genes blanco [26] (**Figura 5**).

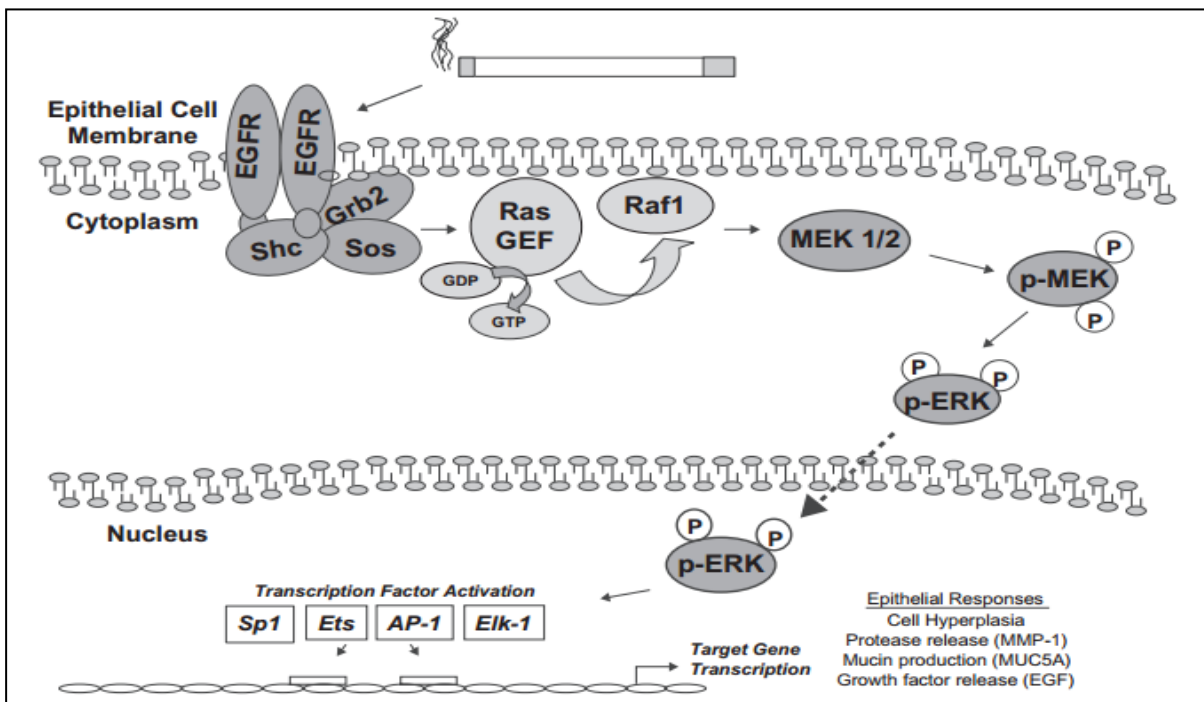


Figura 5. El humo de cigarrillo induce la activación de EGFR y MAPK en células de pulmón humanas [26]

4.6 Hábito tabáquico y virus papiloma humano.

Se ha descrito que la infección por HPV es la condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de cáncer cérvico uterino y de un subgrupo de tumores de cabeza y cuello, pues un alto porcentaje de sujetos infectados por

HPV, no desarrollan finalmente la enfermedad [8]. Por lo tanto, se ha postulado que otros factores tanto genéticos como ambientales, podrían colaborar en el proceso de carcinogénesis. En este sentido, numerosos estudios epidemiológicos sugieren una sinergia entre el hábito tabáquico y la infección por AR-HPV en el desarrollo de cáncer cérvico uterino [27]. De hecho, en el año 2003, la IARC a través de un meta-análisis demostró que el factor de riesgo (OR) para el cáncer cervical se incrementa para las mujeres fumadoras sugiriendo un sinergismo entre estos dos factores [28]. Sin embargo, se desconoce el mecanismo que ejercerían ambos factores para colaborar en la carcinogénesis.

Se han sugerido diferentes modelos para explicar estos datos epidemiológicos: En 1977, Winkelstein señaló que el tabaquismo era un factor causal del cáncer de cuello uterino [21]. En el año 1993, otro estudio dio luces de un posible proceso secuencial entre la infección por AR-HPV y la exposición a un extracto de humo del cigarrillo (CSC). Los autores demostraron que células orofaríngeas inmortalizadas con HPV16 son capaces de adquirir un fenotipo tumoral post tratamiento con nitrosamina y nitroguanósina, dos potentes carcinógenos presentes en el humo del cigarrillo [29].

Más tarde, estudios de Alam y colaboradores demostraron que el Benzo[a]pireno, un potente carcinógeno presente en el humo del cigarrillo, es capaz de incrementar el número de viriones y genomas de HPV16 en un modelo de cultivos cervicales estratificados. Los autores observaron que utilizando altas concentraciones de Benzo[a]pireno, aumenta la síntesis de viriones, mientras que a bajas concentraciones se amplifica el número de genomas virales [30].

Tres años más tarde, los mismos autores observaron que la vía ERK1/2 es la vía de señalización que media el aumento del título de HPV31 en respuesta al tratamiento con Benzo[a]pireno [31]. En esta misma línea, otro estudio mostró resultados que sugieren que la nicotina es capaz de aumentar la actividad de la región LCR de HPV16 en sinergia con el factor de transcripción celular Brn-3a, y por lo tanto, favorecer la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 [32]. Además, un reporte reciente demostró que el Benzo[a]pireno aumenta la expresión de E7 de

HPV-16 en un modelo de cultivos cervicales estratificados y su sobreexpresión es inhibida por la cúrcuma, un potencial agente quimiopreventivo [33].

Por otro lado, Wei y colaboradores, demostraron que el tratamiento agudo con extracto de humo de cigarrillo se traduce en un aumento de la expresión de E6 y E7 en células cervicales que mantienen el genoma viral en forma episomal [34]. Asimismo, en el año 2012, Muñoz y colaboradores demostraron que células de pulmón humanas que expresan las oncoproteínas E6 y E7 de HPV16 y expuestas a componentes del humo del cigarrillo incrementan sus propiedades tumorales [35] y recientemente, otro estudio procedente del mismo grupo, demostró que los componentes del humo del cigarrillo inducen la activación del promotor p97 de HPV16 en células de pulmón, provocando además un aumento del daño al genoma en cooperación con las oncoproteínas E6 y E7 [36].

De acuerdo con estos antecedentes, en modelo *in vitro*, los componentes del humo del cigarrillo tendrían un efecto activador sobre la LCR de HPV16, con consecuencias tanto para la replicación viral como para la expresión de sus oncogenes.

4.7 AP-1 como mediador de CSC y HPV

De acuerdo con la literatura, la LCR de HPV16 contiene sitios de unión para factores de transcripción celulares, entre ellos AP-1 [6] (**Figura 2**). AP-1 es un complejo hétero u homo-dimérico de proteínas pertenecientes a las familias FOS (c-Fos, Fos B, Fra-1 and Fra-2) y JUN (c-Jun, JunB and JunD). En respuesta a un amplio rango de estímulos extracelulares, AP-1 se une al DNA celular en sitios específicos de respuesta a 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato, (sitios TRE), para activar la expresión de genes que regulan procesos celulares como proliferación celular, diferenciación, apoptosis y transformación oncogénica [37, 38] (**Figura 6**). Así, AP-1 cumple un rol muy importante en la carcinogénesis inducida por HPV. La actividad de AP-1 puede ser regulada por fosforilación de c-Jun o c-Fos, a través de la activación de la vía de las MAPK en respuesta a diversos estímulos, entre ellos la exposición a CSC [39, 40].

AP-1 se ha descrito como un factor de transcripción clave en la biología de HPV, pues su expresión durante la diferenciación celular, promueve y mantiene la expresión de E6 y E7 en el epitelio estratificado [6]. Interesantemente, en el año 2011 se reportó que componentes de humo de cigarrillo incrementan la actividad de AP-1 con la consecuente sobreexpresión de citoquinas proangiogénicas en el modelo orofaríngeo [41]. Además se ha demostrado que carcinógenos presentes en el humo del cigarrillo, pueden generar mutaciones que favorecen la unión de AP-1 en la LCR de HPV16 aumentando la actividad del promotor p97 [42]. Este es un mecanismo indirecto, por el cual los componentes del humo del cigarrillo, a través de AP-1, aumentan la actividad del promotor p97.

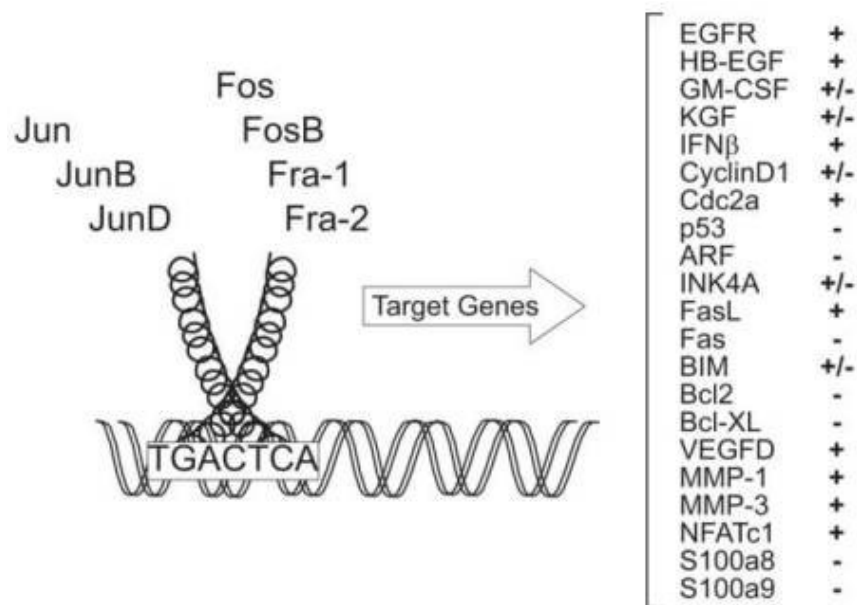


Figura 6. AP-1 es un factor de transcripción dimérico compuesto por las subunidades Jun (c-jun, junB, junD), Fos (c-fos, fra-1, fra-2) o ATF (factor de transcripción activador) que se unen a un sitio de ADN común, denominado sitio de unión a AP-1, o sitio de respuesta a TPA, (sitios TRE). A través de su unión al DNA, AP-1 controla la expresión de diferentes genes y regular actividades biológicas específicas como proliferación, supervivencia, apoptosis, migración y transformación celular

Frente a estos antecedentes y dado el vacío que existe en la literatura con respecto al mecanismo que explique cómo los componentes del humo de cigarrillo incrementan la replicación y expresión de los oncogenes de HPV, se propone el siguiente mecanismo: En etapas tempranas de la infección por HPV en células basales, el genoma viral es mantenido como episomas, con una baja expresión de los oncogenes E6 y E7 [43], debido por un lado a la represión transcripcional que ejerce la proteína viral E2 y debido a la carencia de factores transcripcionales que activen el promotor p97 en las células basales. Sin embargo, frente a la presencia de componentes del humo del cigarrillo, se promovería la activación de EGFR con la subsecuente fosforilación del factor de transcripción AP-1, el que por medio de sus sitios de unión a la LCR, aumentaría la actividad del promotor p97 y por lo tanto, la expresión de E6 y E7. (**Figura 7**).

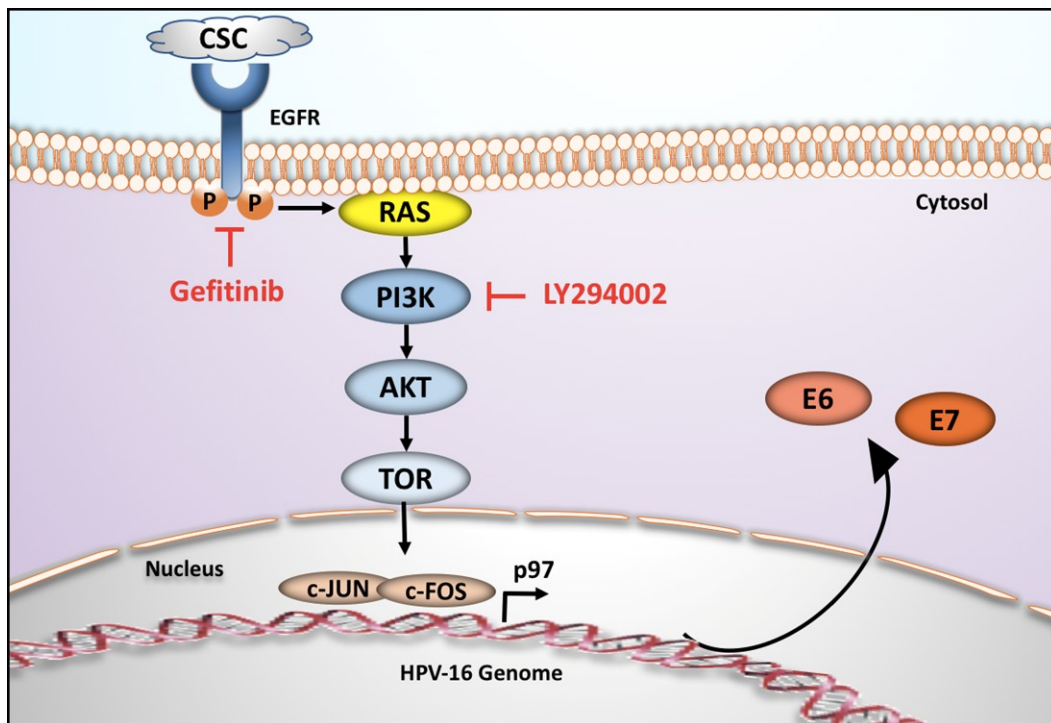


Figura 7. Modelo propuesto

V- HIPÓTESIS

La actividad transcripcional del promotor p97 de HPV16 es inducida por condensado de humo de cigarrillo a través de la señalización mediada por EGFR en líneas celulares de cáncer de cuello uterino.

VI- OBJETIVOS

Objetivo General.

Establecer un mecanismo celular para la activación del promotor p97 de HPV16 en respuesta al tratamiento con condensado del humo de cigarrillo.

Objetivos Específicos

- 1- Demostrar que la incubación con CSC induce la actividad transcripcional de HPV16 y cambios en el fenotipo celular.
- 2- Determinar el rol que cumple la vía PI3K en la activación del promotor p97.
- 3- Evaluar si la activación del promotor p97 es mediada por la fosforilación y unión de AP-1 a la LCR de HPV16.

VII- MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares y cultivo celular

Las líneas celulares SiHa (HTB-35), CaSki (CRL-1550) se obtuvieron directamente de la American Type Culture (ATTC, Manassas, VA, EE. UU.). Las células C33A fueron donadas por la Dra. Priscilla Brebi, Universidad La Frontera, Temuco, Chile. Las células se incubaron en medio basal RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA, EE. UU.) Suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Hyclone, Fremont, CA, EE. UU) con antibióticos (penicilina y estreptomycin) y se mantuvieron a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Para el subcultivo, las células fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS) y posteriormente incubadas con tripsina durante 3-5 min. Para inactivar la tripsina se utilizó medio RPMI suplementado con 10% SFB. Las células se analizaron periódicamente para detectar contaminación por micoplasma.

Ensayo reportero de luciferasa

Las células SiHa y CaSki se sembraron por triplicado en placas de 24 pocillos a una confluencia del 70-80% y fueron mantenidas en medio RPMI 1640 libre de FBS por 24 h. Posteriormente se transfectaron con 500 ng de vector pMir-Glo LCR utilizando 500 µL de medio Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.) y 1 µL de Lipofectamina 2000 por pocillo (Invitrogen, California, EE. UU). Después de 6 h de incubación A 37°, la mezcla de transfección se reemplazó por medio de cultivo que contenía DMSO al 0,1% o 10 µg/mL de CSC durante 24 h, las células se lavaron en PBS 1X y se recolectaron con tampón de lisis pasivo (Promega, Madison, WI, EE. UU) en un tubo nuevo sobre hielo. La actividad luciferasa se midió usando el sistema de ensayo Dual-Luciferase Reporter (Promega, Madison, WI, EE. UU), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Western Blot

Para determinar la expresión de E7, p53, pRb, c-Jun^{S73}, c-Fos^{T232}, EGFR, ERK y Akt, las células CaSki y SiHa fueron lisadas con tampón RIPA 1X, suplementado con Inhibidor de proteasa y fosfatasa 1X (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza).

Posteriormente, la concentración de proteína se determinó usando el reactivo Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De estos, 40 µg de proteína fueron denaturadas con tampón de carga 1X (National Diagnostics, Atlanta, EE.UU) a 95°C durante 5 min para luego ser cargadas en un gel de poliacrilamida suplementado con dodecilsulfato sódico al 1% (SDS-PAGE). El proceso de electroforesis se realizó a 100 Volts durante dos horas con una fuente de poder BioRad, PowerPac (Bio-Rad, California, EE. UU). Posteriormente, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa por medio del dispositivo Trans-Blot[®] SD semi-dry transfer a 15 volts durante 30 min de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad, California, EE. UU). La membrana se sometió después a bloqueo con una disolución de 5% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0.1% de Tween 20 en tampón tris Salino (TBS-T20) durante 2 h a temperatura ambiente, para luego ser lavada tres veces con TBS-T20 durante 15 min. La incubación con anticuerpo primario para EGFR, p53, c-Jun, c-Fos, pRB, se realizó con una dilución de 1: 1000 en TBS-T20 por 12 h. Para β-actina se utilizó una dilución de 1:2000 mientras que para E7 una dilución 1:500. Una vez realizada la incubación con los respectivos anticuerpos la membrana se lavó tres veces con TBS-T20 durante 15 y se incubó con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU) diluido 1: 2000 en TBS-T20 por 2 h. Las membranas se lavaron tres veces en TBS-T20 por un total de 15 min y las señales de la reacción de peroxidasa se detectaron usando el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La β-actina se usó como un control de carga interno para normalizar los niveles de todas las proteínas. La normalización se llevó a cabo usando el programa ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, EE.UU),

a través del análisis densitométrico respecto a la cantidad de píxeles de cada banda.

PCR en tiempo real

Después de los respectivos tratamientos, las células se homogeneizaron con 1 mL de reactivo TRIzol (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Retirado el lisado celular, se mezcló con 0.2 mL de cloroformo (Merck, Burlington, Massachusetts) para luego ser centrifugado a 12.000 x g por 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y el RNA fue precipitado adicionando 0.5 mL de alcohol isopropílico (Merck, Burlington, Massachusetts) y la mezcla fue almacenada a -80°C durante 1 h. Luego de centrifugar 12.000 x g por 10 min a 4°C, se lavó el precipitado con 1 mL de alcohol etílico (Merck, Burlington, Massachusetts) al 75% v/v en agua libre de nucleasas (Winkler, Lampa, Chile), se separó mediante centrifugación y finalmente fue disuelto en 20 µL de agua libre de nucleasas. El RNA obtenido fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260/280 nm usando el equipo Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.). El RNA se trató con DNasa RQ1 (Promega, Madison, WI, EE. UU) a 37° C durante 60 min y luego se incubó con solución de detención (Promega, Madison, WI, EE. UU) durante 10 min a 65°C. El cDNA se preparó utilizando un volumen de reacción de 20 µL que contenía RNA tratado con DNasa (2 µg), 1U de inhibidor de RNasa (Promega, Madison, WI, EE. UU.), random primers 0,04 µg/µL (Promega, Madison, WI, EE. UU.), dNTP 2 mM (Promega, Madison, WI, EE. UU) y 10 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney (MMLV) (Promega, Madison, WI, EE. UU). La mezcla de reacción se incubó durante 1 h a 37 ° C y posteriormente a 70°C para la inactivación de la enzima. El cDNA se sometió a cuantificación por PCR en tiempo real con partidores específicos en el sistema RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Cada mezcla de amplificación se preparó con 12,5 µL de SYBR Green Mastermix 2X (Promega, Madison, WI, EE. UU), 0.4 µM de partidores específicos y 1 µL de cDNA en un volumen final de 25 µL. Las condiciones de termociclado para qPCR para los genes CYP1B1, β-Actina, c-Jun, c-Fos fueron las siguientes: 94 ° C durante 30 s,

55 ° C durante 20 y 72 ° C durante 20 s, para un total de 40 ciclos. Mientras que para los genes E6 y E7, fue a 94° C durante 30 s, 58° C durante 20 s y 72° C durante 20 s, para un total de 40 ciclos. La expresión génica relativa se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ tomando como referencia los niveles de β -Actina.

Ensayos de viabilidad

Las líneas celulares de cáncer de cuello uterino (SiHa y CaSki) se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células por pocillo. Después de 48 h, las células se trataron con CSC, DMSO, AG1478, U0126 a diferentes concentraciones y se incubaron en un rango de tiempo entre 24 a 48 h. La viabilidad se midió usando el kit CellTiter 96 AQueous Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, EE. UU) del cual se añadió 20 μ L a cada pocillo y se incubó durante 3 h a 37°C. La formación del producto formazán se midió espectrofotométricamente a 490 nm usando un lector Multi-Modal synergy HTX (Biotek, Vermont, EE. UU). Así la absorbancia es proporcional al número de células vivas en cada pocillo.

Inmunofluorescencia y microscopía confocal.

1×10^5 células fueron sembradas en Chambers Slides (Invitrogen, California, EE. UU). Después de 24 h (60% de confluencia) las células se lavaron con PBS 1X y el medio de cultivo se reemplazó por medio que contenía CSC o DMSO. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS (pH 7,4), se secaron e incubaron posteriormente durante 5 min con acetona a 4°C (Merck, Burlington, Massachusetts). Las células fijadas se almacenaron a -20°C hasta su uso. Las células se incubaron con BSA 1% durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de incubación con un anticuerpo primario monoclonal diluido en PBS de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, las células fijadas se lavaron tres veces durante 5 min a temperatura ambiente y se incubaron con un anticuerpo secundario anti IgG conjugado a FITC. Después de tres lavados con PBS, las células se visualizaron en un microscopio confocal C2 Plus.

Phospho MAPK array

Las células CaSki se cultivaron hasta el 90% de confluencia en placas de 10 cm, acto seguido se sometieron a depleción de suero durante 24 horas y luego se trataron con CSC (10 µg/mL) y una concentración equivalente de DMSO durante 2 h. Las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X y luego disueltas en tampón de lisis de extracción durante 20 min a 4°C. La concentración de proteína se determinó usando el reactivo de ensayo de proteína Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 200 µg de proteína fueron incubados en membranas procedentes del kit Proteome (R & D Systems, Minnesota, EE.UU) para la determinación paralela de los niveles relativos de fosforilación de proteínas quinasas activadas por mitógeno y otras serina/treonina quinasas. La membrana permite detectar la fosforilación relativa de estas quinasas: Akt1, HSP27, p38 beta, Akt2, JNK1, p38 delta, Akt3, JNK2, p38 gamma, Akt pan, JNK3, p53, CREB, JNK pan, p70, S6K, ERK1, MKK3, RSK1, ERK2, MKK6, RSK2, GSK-3 alfa / beta, MSK2, TOR, GSK-3 beta, p38 alfa. Después de la incubación el sustrato de peroxidasa de rábano (Millipore Corporation, Massachusetts, EE. UU) fue utilizado para detectar la señal de proteína y los datos se capturaron mediante exposición a películas de revelado (Agfa, Mortsel, Bélgica). El análisis de las películas se realizó utilizando el software NIH ImageJ, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Inmunoprecipitación de Cromatina

La inmunoprecipitación de c-Jun^{S73} y c-Fos^{T232} unida a cromatina se llevó a cabo usando perlas de inmunofibrina G (IgG) –Sefarosa prebloqueadas. Cantidades iguales de cromatina se incubaron en presencia de 50 µL de perlas de IgG-Sefarosa en tampón A - SDS al 0,1%. Antes de la inmunoprecipitación con perlas de IgG, se guardó el 1% de cada muestra como fracción de entrada. La mezcla se incubó durante 2 h a 4°C en un agitador rotatorio y luego fue sometida a centrifugación a 12.000 RPM durante 1 min. Se lavaron 500 µL de inmunoprecipitado cuatro veces en 400 µL de tampón A y en 1 mL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Después de cada lavado, las

suspensiones líquidas se transfirieron a tubos nuevos. Los inmunocomplejos se eluyeron mediante dos incubaciones secuenciales a 65°C durante 10 min en 250 µL de tampón de elución (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, SDS al 1%), seguido de centrifugación a 12.000 RPM durante 1 min. La cromatina se incubó a 65°C durante 18 h y posteriormente en presencia de 50 µg de proteinasa K durante 2 h a 37 °C. Se purificó el DNA libre de la solución mediante extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25: 24: 1). Después de la centrifugación y la precipitación mediante la adición de glucógeno y etanol, se suspendió el DNA precipitado en 100 µL de tampón TE para el análisis por PCR.

Crecimiento independiente de anclaje.

Para estudiar la pérdida de anoikis, células SiHa tratadas con DMSO o CSC, fueron resuspendidas y contabilizadas mediante tinción de exclusión con azul de Tripán en cámara de Neubauer. De estas 1×10^4 fueron recolectadas y resuspendidas en Bacto-agar (BD, California, EE.UU) 0,33% disuelto en una mezcla de nutrientes compuesto por RPMI1640 2X, SFB 12,5 %, RPMI1640 1X suplementado además con los correspondientes tratamientos de 0; 0,1 y 10 µg/mL de CSC. La mezcla de células en agar al 0,33% fue sembrada sobre una base de Bacto-agar 0,5% siendo mantenidas a 37°C y suministrando medio completo de crecimiento, con los distintos tratamientos dos veces por semana. Después de 4 semanas se realizó la tinción de las colonias mediante la adición de 1 mL de cristal violeta 0,005% durante 1 h contabilizando posteriormente el número de colonias por placa.

Análisis estadístico.

Los datos se analizaron con el software Graphpad Prism v7 (La Jolla, CA, EE.UU). Los resultados se expresaron como los medios \pm desviaciones estándar de tres determinaciones independientes. La significancia de las diferencias entre las muestras se analizó utilizando la prueba t de Student, y un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo

VIII- RESULTADOS

El condensado de humo de cigarrillo promueve la sobreexpresión de E6 / E7 de HR-HPV en líneas celulares derivadas del cáncer de cuello uterino

El condensado de humo del cigarrillo (CSC) es una mezcla de 4000 compuestos distintos sintetizada a partir de cigarrillos estándar 3R4F [44]. Como esta mezcla contiene material particulado con aproximadamente 60 carcinógenos, incluidas nitrosaminas e hidrocarburos policíclicos, las altas concentraciones podrían ser perjudiciales para las células. Por lo tanto, para evaluar los niveles de CSC no tóxicos en células derivadas de cáncer de cuello uterino, expusimos SiHa (2 copias de HPV16/genoma) y CaSki (500 copias de HPV16/genoma) a diferentes concentraciones de CSC. Como se observa en la **Figura 8**, una dosis de 10 µg/mL fue la concentración máxima no tóxica pues no se observó un cambio significativo de viabilidad a las 72 h. Por lo tanto, se eligió la concentración de 10 µg/mL CSC para los experimentos posteriores.

Estudios previos han demostrado que CSC promueve la expresión del gen CYP1B1 [45]. Por lo tanto, para evaluar la actividad biológica de CSC en nuestros modelos, evaluamos la expresión del mRNA de CYP1B1 por RT-qPCR en diferentes períodos de tiempo de exposición a CSC. Como se muestra en la **Figura 9**, el tratamiento con CSC promueve un aumento significativo de los niveles de CYP1B1 en células CaSki en cada tiempo analizado cuando se compara con el tratamiento con DMSO.

Una vez determinada la concentración de trabajo y la funcionalidad del CSC, las líneas celulares CaSki y SiHa fueron expuestas a distintas concentraciones de CSC durante diferentes períodos de tiempo (0 a 24 horas) y se analizaron los niveles de expresión de E6 y E7 con respecto al tratamiento control que incluye una concentración equivalente de DMSO.

Los resultados muestran que la exposición a CSC aumentó significativamente los niveles del mRNA de E6 y E7 (**Figura 10**) con un máximo a las 2 h después de la incubación con CSC en células CaSki. Estos resultados también se confirmaron en células SiHa, que alcanzaron un nivel máximo de E6 / E7 a las 4 h después de la exposición a CSC (**Figura 11**).

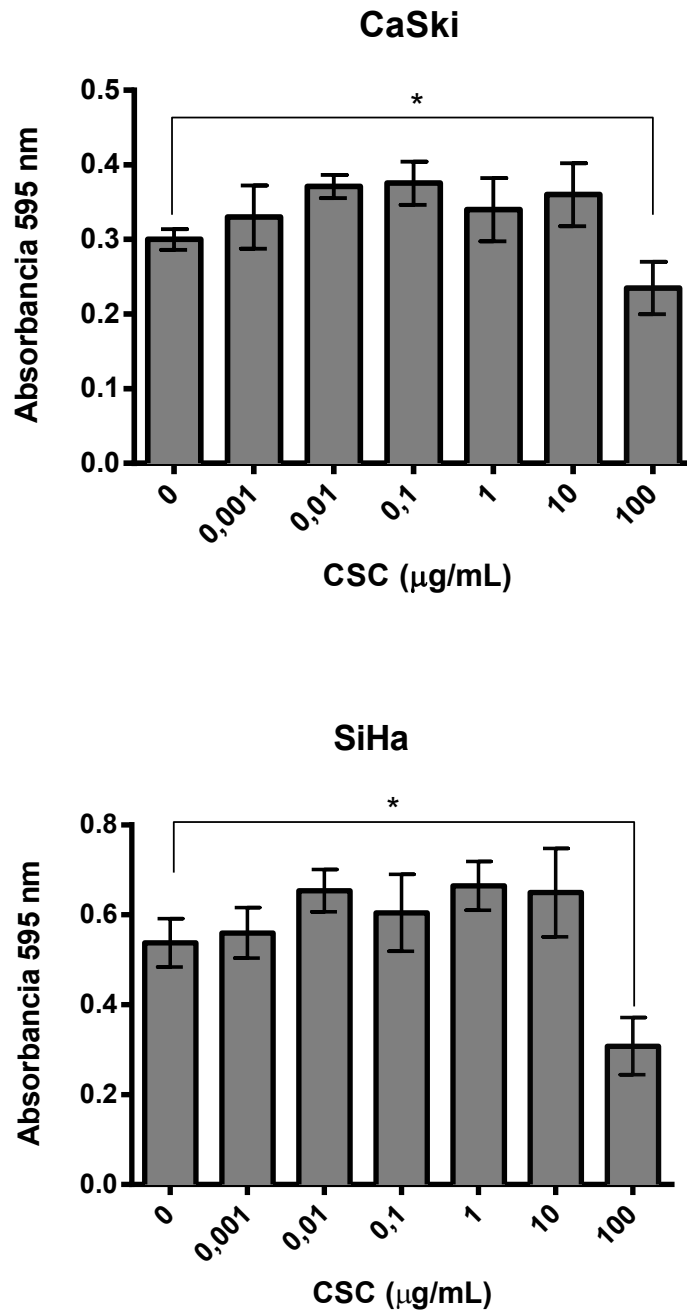


Figura 8. Efecto dosis-respuesta del CSC sobre la viabilidad celular. Células CasKi y SiHa fueron expuestas a distintas concentraciones de CSC. La viabilidad celular fue medida mediante el ensayo de MTS a las 72 h de incubación con CSC. Los datos fueron expresados como promedio con desviaciones estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$

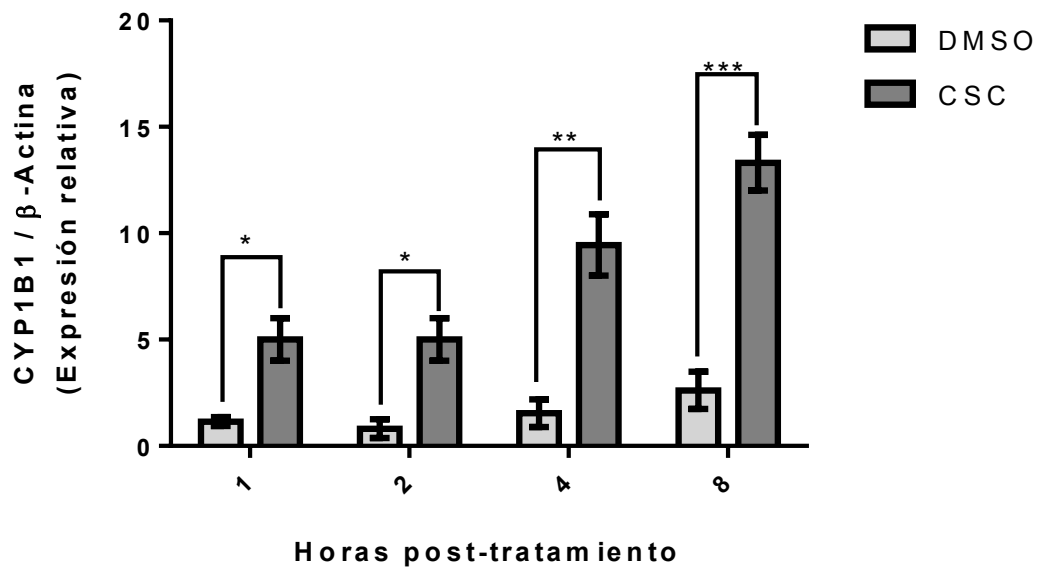


Figura 9. La exposición a CSC aumenta los niveles de expresión de CYP1B1 en células CaSki. Células CaSki fueron sometidas a tratamientos con DMSO y CSC de acuerdo a las concentraciones previamente establecidas, por diferentes periodos de tiempo. Los niveles del mRNA de CYP1B1 se evaluaron mediante RT-qPCR. Se empleó una concentración equivalente de DMSO como control negativo. Los datos fueron expresados como promedio con desviaciones estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Para descartar la posibilidad que el aumento en los niveles de E6 y E7 se deba a mecanismos independientes de la transcripción, las células CaSki se expusieron a 10 µg/mL de actinomicina D previo a la exposición con CSC. Como se muestra en la **Figura 12**, no se observaron diferencias significativas en el decaimiento de los transcritos de E6 cuando las células se expusieron a CSC y DMSO en presencia de Actinomicina D, lo que sugiere que CSC conduce a un incremento en los niveles de E6 a través del aumento en su transcripción.

Posteriormente, para evaluar los niveles de las proteínas E6 y E7 después de la exposición a CSC, se usaron análisis de inmunoblot e inmunofluorescencia indirecta. Como se muestra en la **Figura 13**, el tratamiento con CSC condujo a la sobreexpresión de ambas proteínas con respecto al tratamiento con DMSO el cual fue sostenido hasta las 24 h de tratamiento. Luego, para verificar si estos incrementos en las oncoproteínas tenían alguna influencia en el contexto celular, evaluamos la pérdida en los niveles proteicos de p53 y pRB. Como se muestra en la **Figura 14**, el tratamiento con CSC durante 24 horas se asoció con una disminución de los niveles de p53 y pRB. Además, usando la línea celular C33A de cáncer de cuello uterino HPV -, no se observó una disminución de los niveles de p53 después del tratamiento con CSC, lo cual demuestra que los efectos en p53 y pRB dependen del aumento de E6 y E7.

Una vez demostrada la funcionalidad de las oncoproteínas virales, hipotetizamos que estas repercutirían también en la viabilidad celular y en el crecimiento libre de anclaje, por ello, se realizaron experimentos de viabilidad celular a través de la incorporación de MTS y ensayos de formación de colonias en agar semisólido.

Sin embargo, los resultados demostraron que a pesar de la sobreexpresión de E6 y E7, esto no se traduce en incrementos en la formación de colonias libres de incorporación de MTS y ensayos en de agar semisólido en células tratadas con DMSO y CSC anclaje ni en la viabilidad celular (**Figura 14**) pues no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ambos ensayos con respecto a la situación control con DMSO.

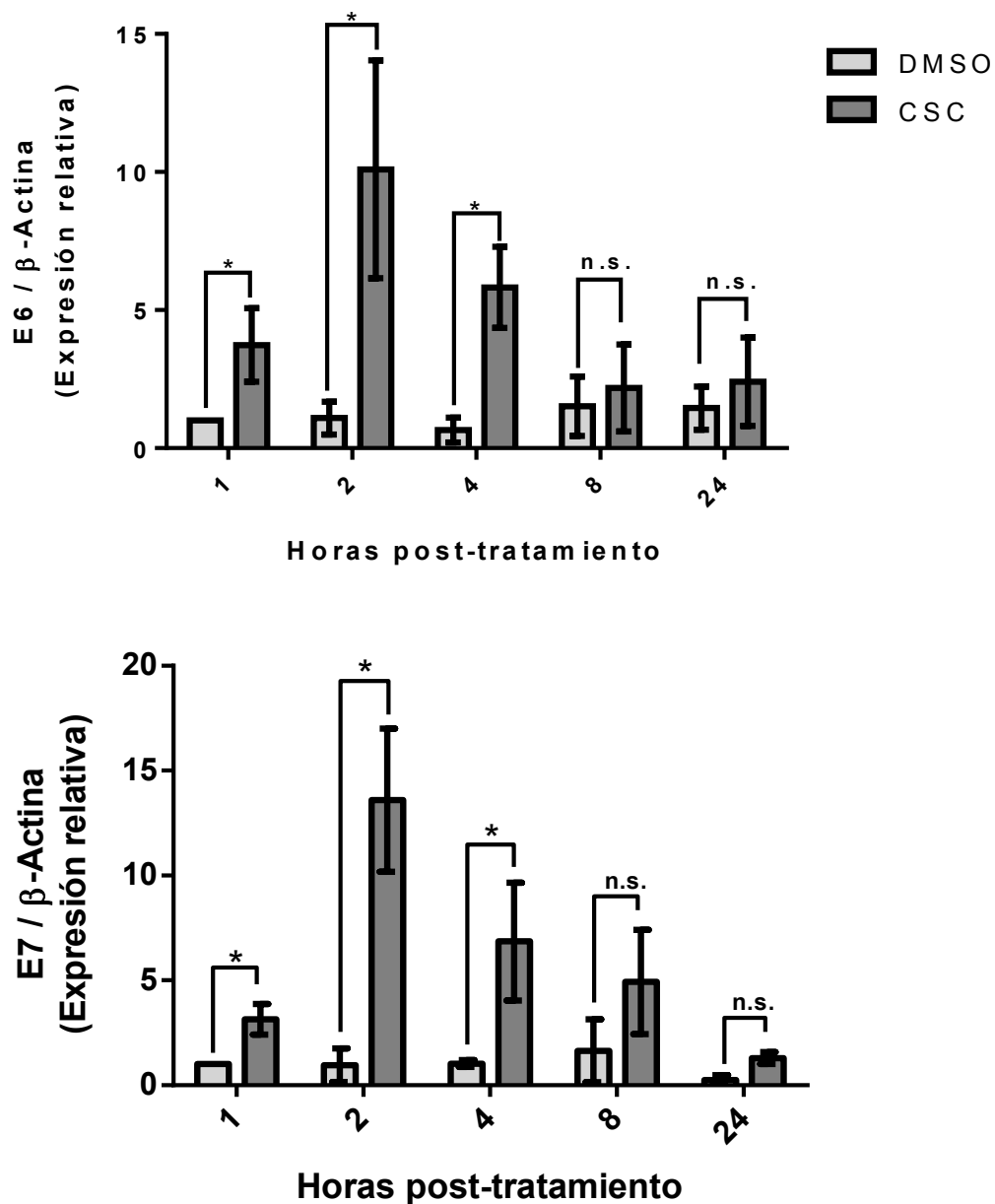


Figura 10. Efecto tiempo dependiente del CSC sobre la expresión de E6/E7 en células CaSki. RNA de células CaSki fue extraído a distintos tiempos posterior al tratamiento con 10 μ g/mL de CSC y una equivalente concentración de DMSO. El RNA fue convertido a cDNA y sometido RT-qPCR con partidores para E6 y E7 de HPV16. El resultado indica los niveles de productos de PCR para E6 y E7. Los datos fueron expresados como promedios con desviaciones estándar de 3 experimentos independientes * $p < 0.05$.

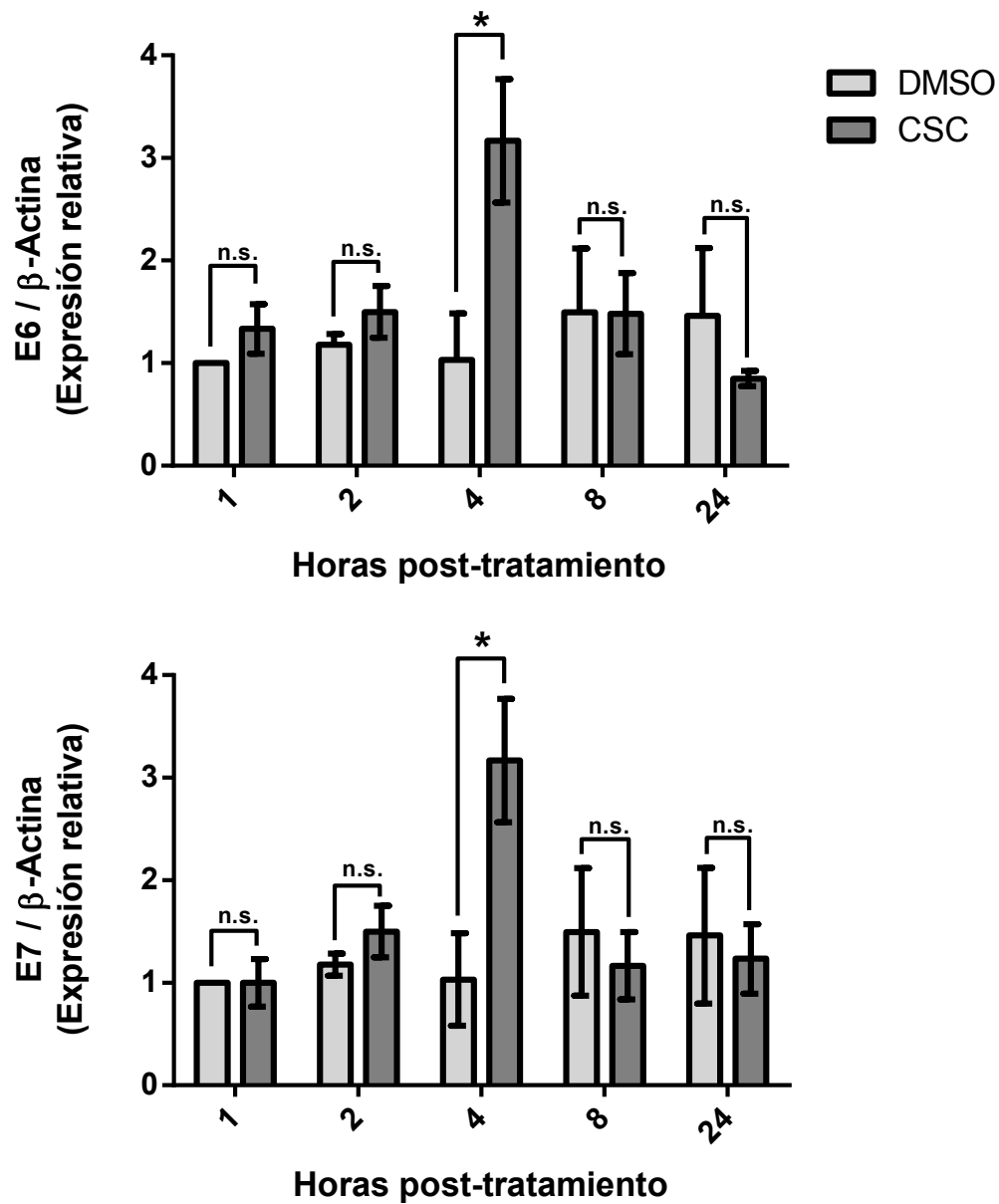


Figura 11. Efecto tiempo dependiente del CSC sobre la expresión de E6/E7 en células SiHa. RNA de células SiHa fue extraído a distintos tiempos posterior al tratamiento con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CSC y una equivalente concentración de DMSO. El RNA fue convertido a cDNA y sometido RT-qPCR con partidores para E6 y E7 de HPV16. El resultado indica los niveles de productos de PCR para E6 y E7. Los datos fueron expresados como promedios con desviaciones estándar de 3 experimentos independientes * $p < 0.05$.

En conjunto, estos resultados sugieren que CSC induce la sobreexpresión de E6 y E7 en células de cáncer de cuello uterino positivas para HPV16 lo cual conduce naturalmente a una disminución de las proteínas supresoras de tumores p53 y pRB pero no en cambios de viabilidad ni en la formación de colonias libres de anclaje.

El condensado de humo del cigarrillo induce la activación del promotor p97 dependiente de LCR en líneas celulares derivadas de cáncer de cuello uterino.

Dados los resultados anteriores que demuestran el incremento transcripcional de los oncogenes virales, el siguiente paso fue evaluar la activación del promotor p97 de HPV16 por CSC. Para esto, células CaSki y SiHa fueron transfectadas con el vector pMirGLO-LCR-p97-Luc2, el cual incorpora la secuencia de la LCR de HPV-16 río arriba del gen reportero luciferasa (Luc2). Además, se diseñó el vector pMirGlo-Luc2 el cual contiene la secuencia de Luc2 en ausencia de la LCR, para usarlo como control. En la **Figura 15** se muestra un esquema con los vectores utilizados en estos experimentos.

De acuerdo con los resultados, observamos que la activación máxima del promotor p97 se produjo a las 24 h después del tratamiento con CSC de una manera dosis-dependiente en el intervalo de 0,1 a 50 µg/mL de CSC (**Figura 16**). Por otro lado, el vector pMir-Glo-p97 que carecía de la LCR de HPV16 no produjo aumento en la actividad de luciferasa tras el tratamiento con CSC, lo que confirma la importancia de la LCR para la activación del promotor p97 mediado por CSC (**Figura 17 A**).

Estudios previos muestran que los sitios de unión para los factores de transcripción AP-1 dentro de la LCR son importantes para la actividad del promotor temprano de HR-HPV. Por lo tanto, para determinar la importancia relativa de los sitios TRE para la activación del promotor p97 mediada por CSC, se obtuvieron cinco mutantes de pMirGLO-LCR-p97-luc por mutagénesis sitio dirigida (**Figura 15**)

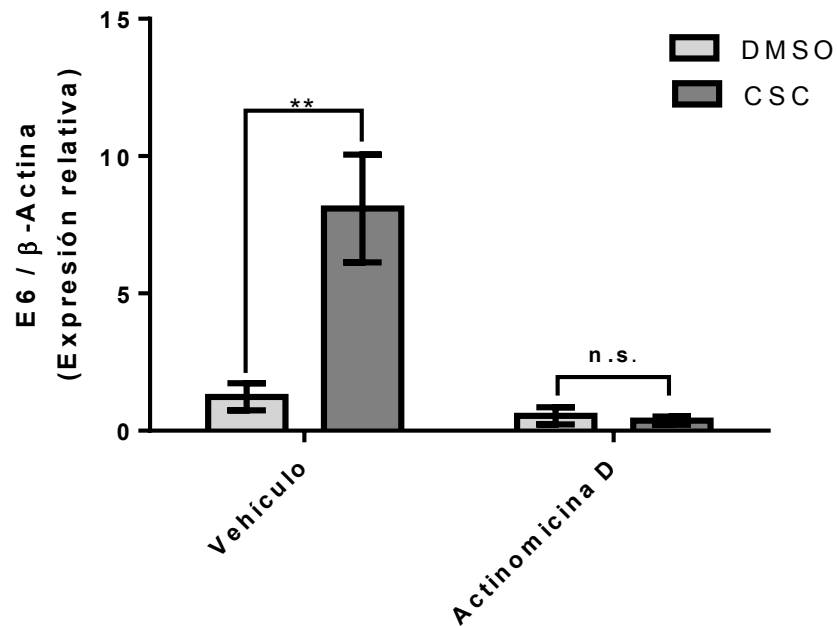
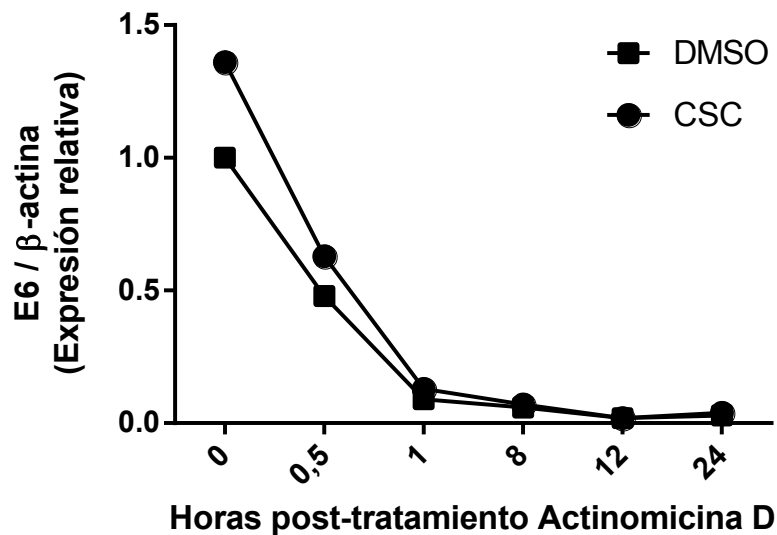
A**B**

Figura 12. El tratamiento con actinomicina D disminuye los niveles de E6/E7 inducidos por CSC. Células CaSki fueron tratadas con 10 μ g/mL de actinomicina D por distintos periodos de tiempo, luego fueron expuestas CSC y una equivalente concentración de DMSO. El RNA fue extraído, convertido a cDNA y sometido a RT-qPCR con partidores para E6 (A). A una hora de tratamiento con CSC o DMSO las células fueron expuestas a 10 μ g/mL de actinomicina D o su solvente (vehículo), el RNA fue convertido a cDNA y sometido a q-RT-PCR (B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

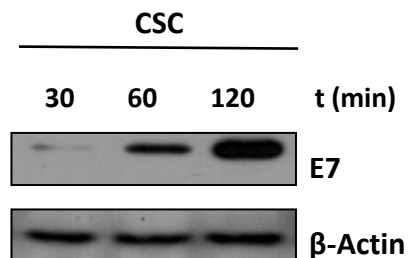
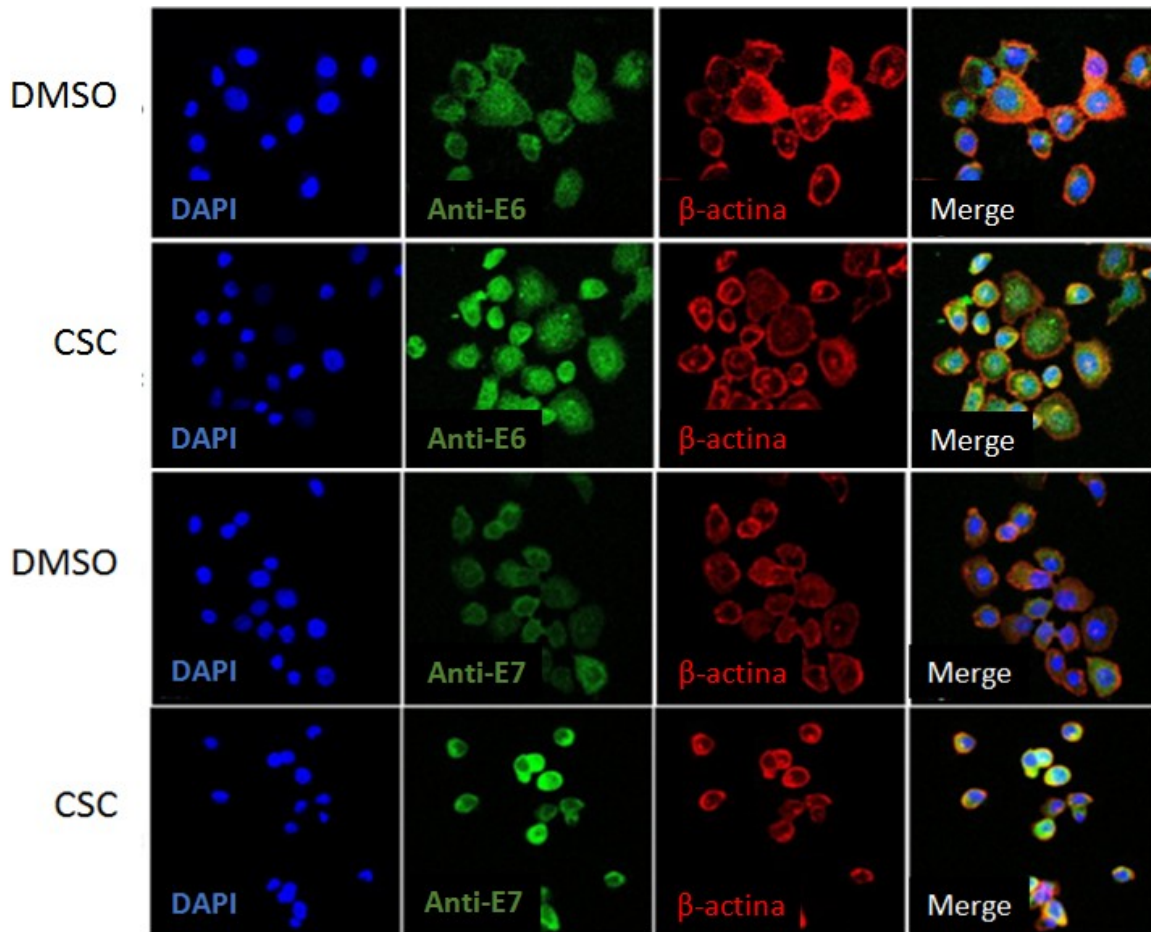


Figura 13. CSC incrementa los niveles proteicos de E6 y E7. (paneles superiores) Microscopia confocal para E6 y E7 en células CaSki tratadas 24 h con DMSO y CSC, utilizando un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo FITC. DAPI: marcador fluorescente de DNA, Rodamina: marcador fluorescente de citoesqueleto de β -actina. (Abajo) Inmunoblot con anticuerpo para E7 para lisados totales de células CaSki, tratadas hasta 2 h con CSC. Se usó β -actina para comparar los niveles de carga en todos los tiempos.

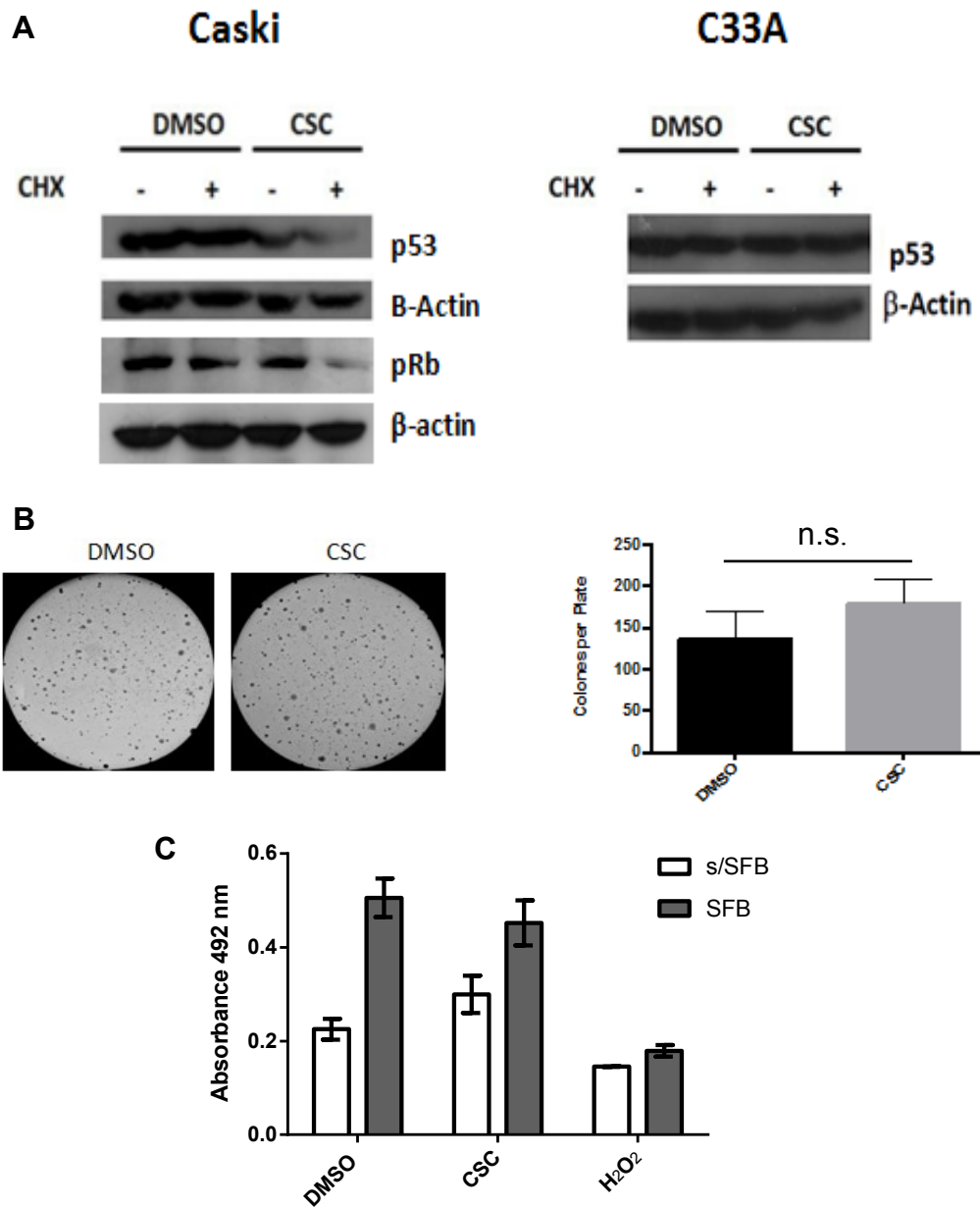


Figura 14. El tratamiento con CSC se asocia con cambios en los niveles de proteínas supresoras de tumor. (A) Células CaSki y C33A fueron tratadas con 10 µg/mL de CSC y DMSO por distintos periodos de tiempo en presencia de cicloheximida (CHX). Los extractos proteicos se usaron para inmunoblot con anticuerpos dirigidos contra p53 y pRb. B) Agar semisólido de células SiHa expuestas a DMSO y CSC. Las colonias fueron cuantificadas en tres experimentos independientes. C) Ensayo de viabilidad mediante MTS en células CaSki tratadas con DMSO, CSC y H₂O₂, en presencia y ausencia de SFB.

Como se muestra en la **Figura 17 B**, se observó una disminución significativa de la actividad solo con las mutantes 3, 4 y 5. Estos resultados indican que los sitios TRE localizados en las posiciones 7344 (TTAGCTT) y 7293 (TGAACCTT) son críticos para la activación del promotor p97 mediado por CSC.

Estudios previos han demostrado que el tratamiento con CSC promueve la activación y fosforilación de EGFR en los modelos de epitelio del conducto bronquial, ductal y pancreático [26-28]. Por lo tanto, se evaluó si EGFR se activa por CSC en las líneas celulares CaSki y SiHa derivadas de células de cáncer de cuello uterino. Como se observa en la **Figura 18**, la exposición a CSC provocó un aumento en la fosforilación de EGFR en la tirosina 1173 (Y1173) a los 30 minutos y se mantuvo a lo largo de 3 h. Se observaron resultados similares en células SiHa donde la diferencia con respecto al tratamiento con DMSO fue más evidente que en las células CaSki.

Para evaluar la vía de señalización río abajo de EGFR en respuesta a CSC, se utilizó un ensayo fosfoproteómico. Los resultados mostraron que al exponer las células CaSki durante 2 h a CSC, se observaron aumentos en las formas fosforiladas de Akt1, Akt2, CREB, Erk1, Erk2, Jnk1, p38a, p38d y la fosforilación de mTOR (**Figura 19**). Por el contrario, la fosforilación de JNK / pan, MKK3, Msk2, p53 y p70 disminuyó después de la exposición a CSC respecto al tratamiento con DMSO. Además, como se observa en la **Figura 20**, los aumentos en Akt2 y Erk1 fosforilados fueron los más pronunciados después del tratamiento con CSC, lo que sugiere que las rutas PI3K y MAPK fueron activadas posterior a la fosforilación de EGFR.

Dado que el tratamiento con CSC estimuló la sobreexpresión de E6 / E7 en células de cáncer de cuello uterino y concomitantemente indujo la activación de PI3K y MAPK, usamos inhibidores específicos para verificar la importancia de estas vías de señalización para inducir un aumento de los niveles de oncogenes en células CaSki. Como se muestra en la **Figura 21**, CSC promovió un aumento de los niveles de proteína E7 que, a su vez, se anuló en presencia de los inhibidores de EGFR, AG1478 y gefitinib. Además, el inhibidor de PI3K LY294002 bloqueó la activación de fosfo-AKT (S473) mediada por CSC, y eliminó por

completo la expresión de E7, sugiriendo que la señalización de PI3K / Akt es crítica para la activación mediada por CSC. Finalmente, el inhibidor de MEK U0126 disminuyó la activación de fosfo-ERK1 / 2 por CSC, y también evitó el aumento en la expresión de E7 pero en menor magnitud que el inhibidor de PI3K (**Figura 22**). Estos experimentos confirmaron la importancia de la activación de EGFR para la sobreexpresión de E7 mediada por CSC en células de cáncer de cuello uterino.

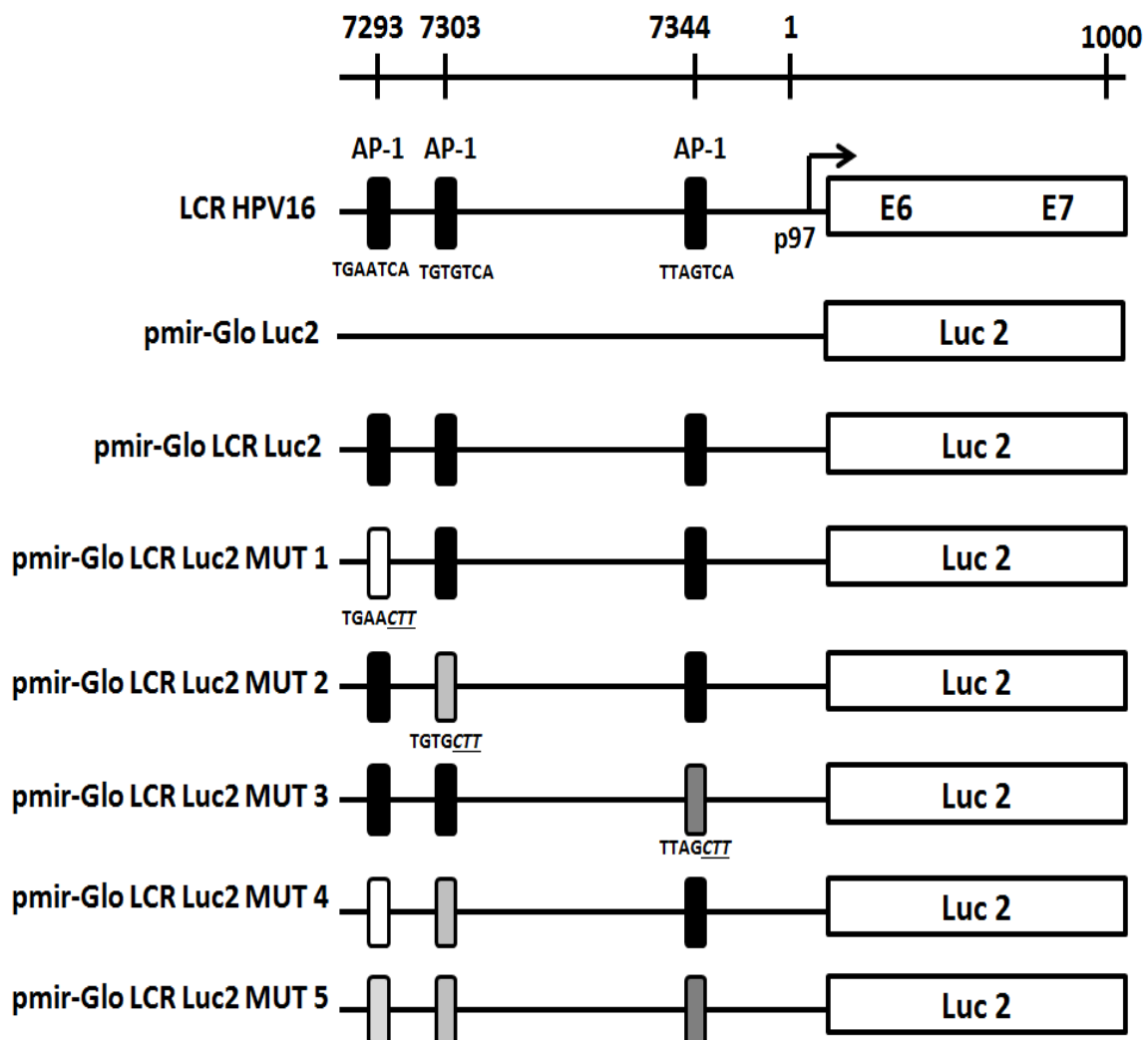


Figura 15. Diagrama esquemático que representa los diferentes constructos utilizados en esta tesis. Las células CaSki se transfectaron con los vectores y se trataron con diferentes concentraciones de DMSO y CSC. Posteriormente se midió la actividad de Firefly Luciferasa en cada condición.

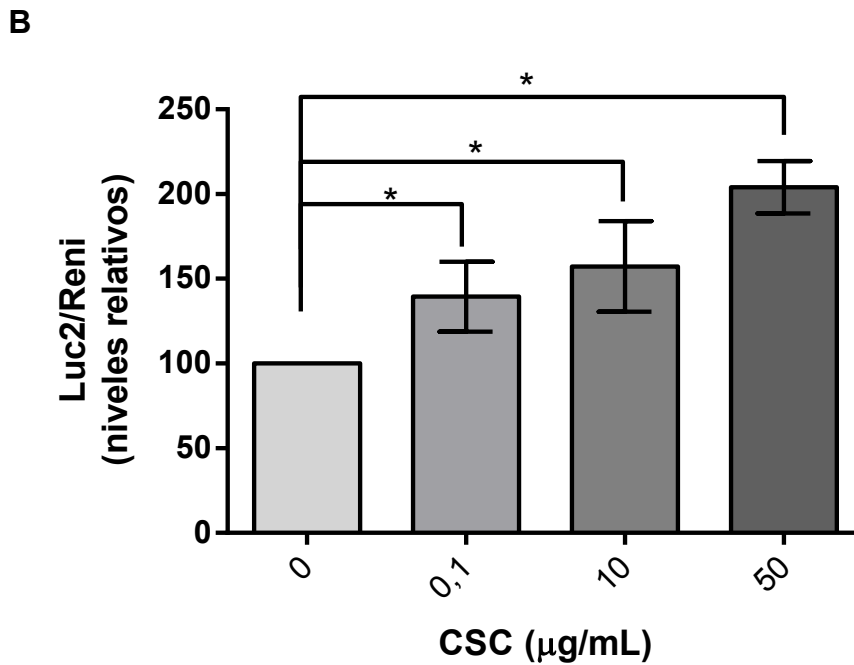
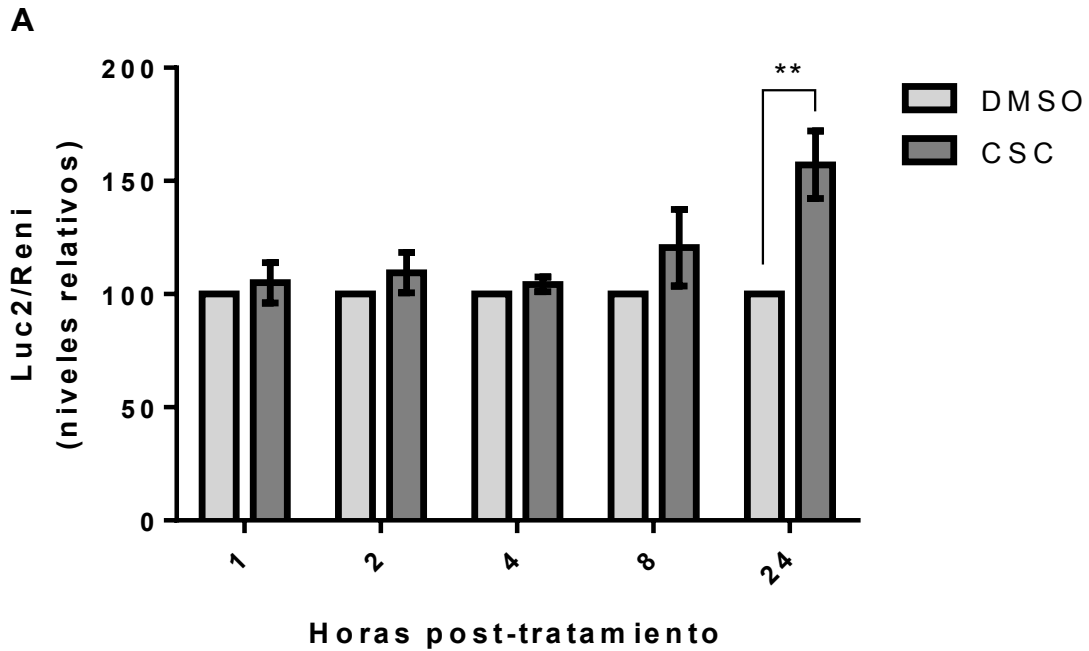


Figura 16. CSC induce la actividad de p97 de HPV16. Actividad de luciferasa normalizada con la actividad de renilla en células CaSki previamente transfectadas con pMIR-GLO LCR-Luc2 y tratadas con CSC o DMSO por distintos periodos de tiempo (A). Actividad de luciferasa en células SiHa con distintas concentraciones de CSC (B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

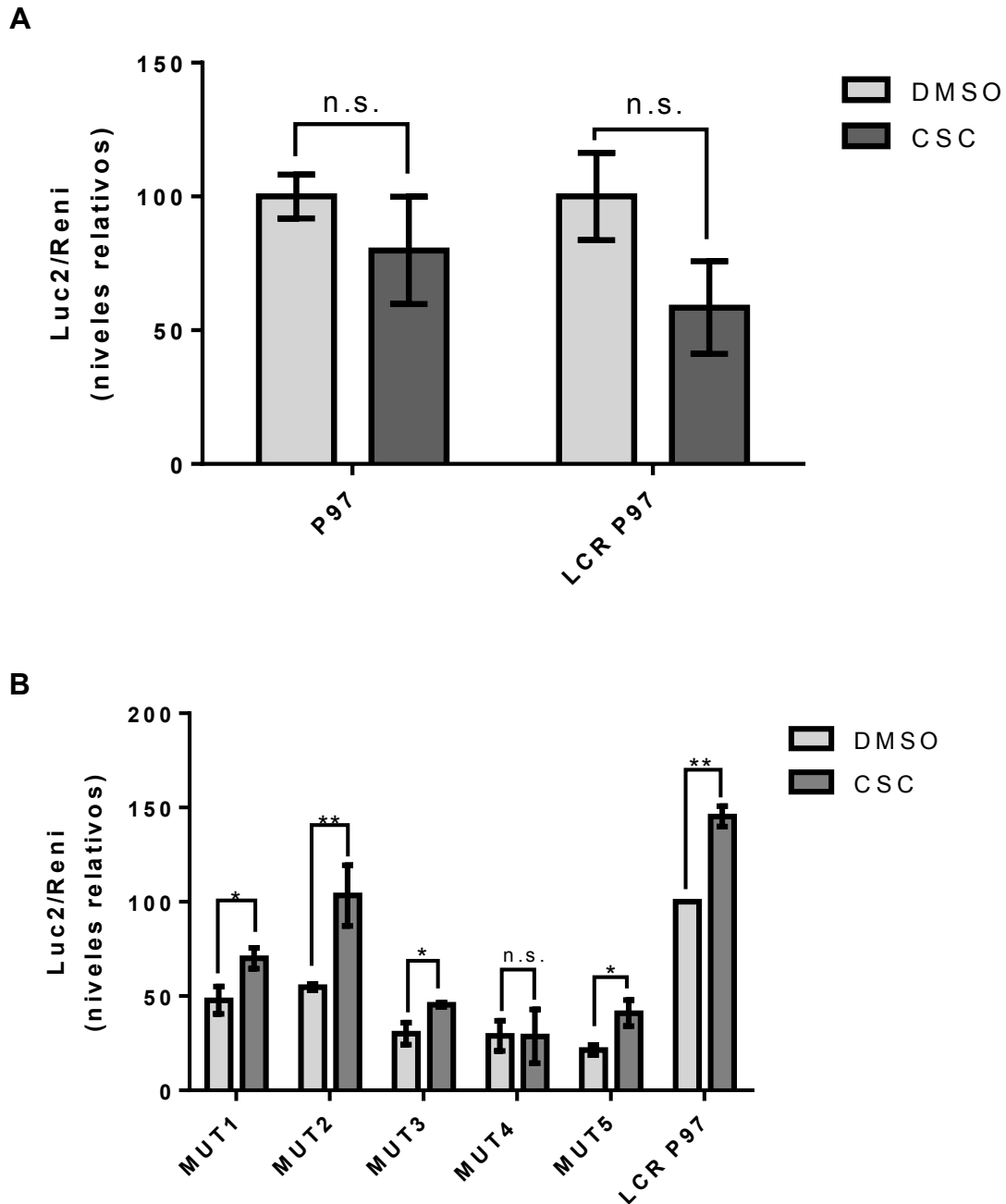


Figura 17. Los sitios TRE proximales de la LCR de HPV-16 son necesarios para activar p97. Actividad de luciferasa normalizada con la actividad de renilla en células CaSki previamente transfectadas con pMIR-GLO-Luc2 y pMIR-GLO LCR-Luc2 tratadas con CSC o DMSO (A). Actividad luciferasa de mutantes LCR en células CaSki sometidas a tratamiento con CSC y DMSO durante 24 h (B). Los datos fueron expresados como promedios con desviaciones estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

C-Jun es sobre-expresado, fosforilado e interactúa con sitios TRE / AP-1 en el LCR de HPV16 en células expuestas a CSC

Los experimentos en la **Figura 17 B** demostraron la importancia de los sitios TRE proximales para la activación del promotor p97 mediado por CSC. Por lo tanto, se presume que las proteínas c-Jun y/o c-Fos podrían estar involucradas como mediadores de la actividad transcripcional de p97. Para comprobar esto, se analizaron los niveles de fosforilación de c-Jun en la serina 73 (S73) y c-Fos en la treonina 202 (T202) posterior al tratamiento con CSC. Los resultados mostraron un aumento de la fosforilación de c-Jun en el núcleo de células CaSki (**Figura 23**). Sin embargo, no detectamos fosforilación de c-Fos (T202) después de la exposición a CSC. Estos resultados fueron posteriormente comprobados por western Blot como se observa en la **Figura 23 (B y D)**.

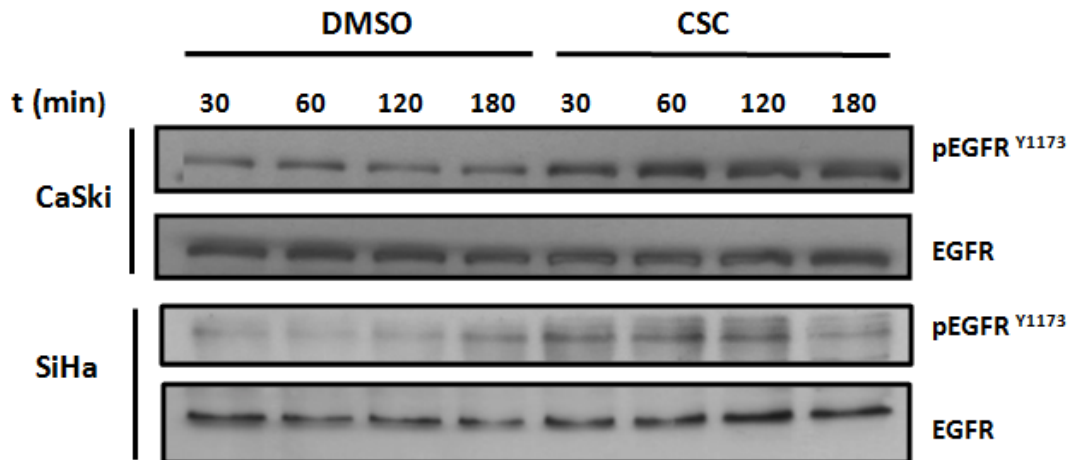


Figura 18. CSC induce la fosforilación de EGFR. Inmunoblot con anticuerpos dirigidos contra la forma fosforilada de la tirosina 1173 de EGFR (EGFR Y1173) de células CaSki y SiHa tratadas con DMSO y CSC por distintos periodos de tiempo.

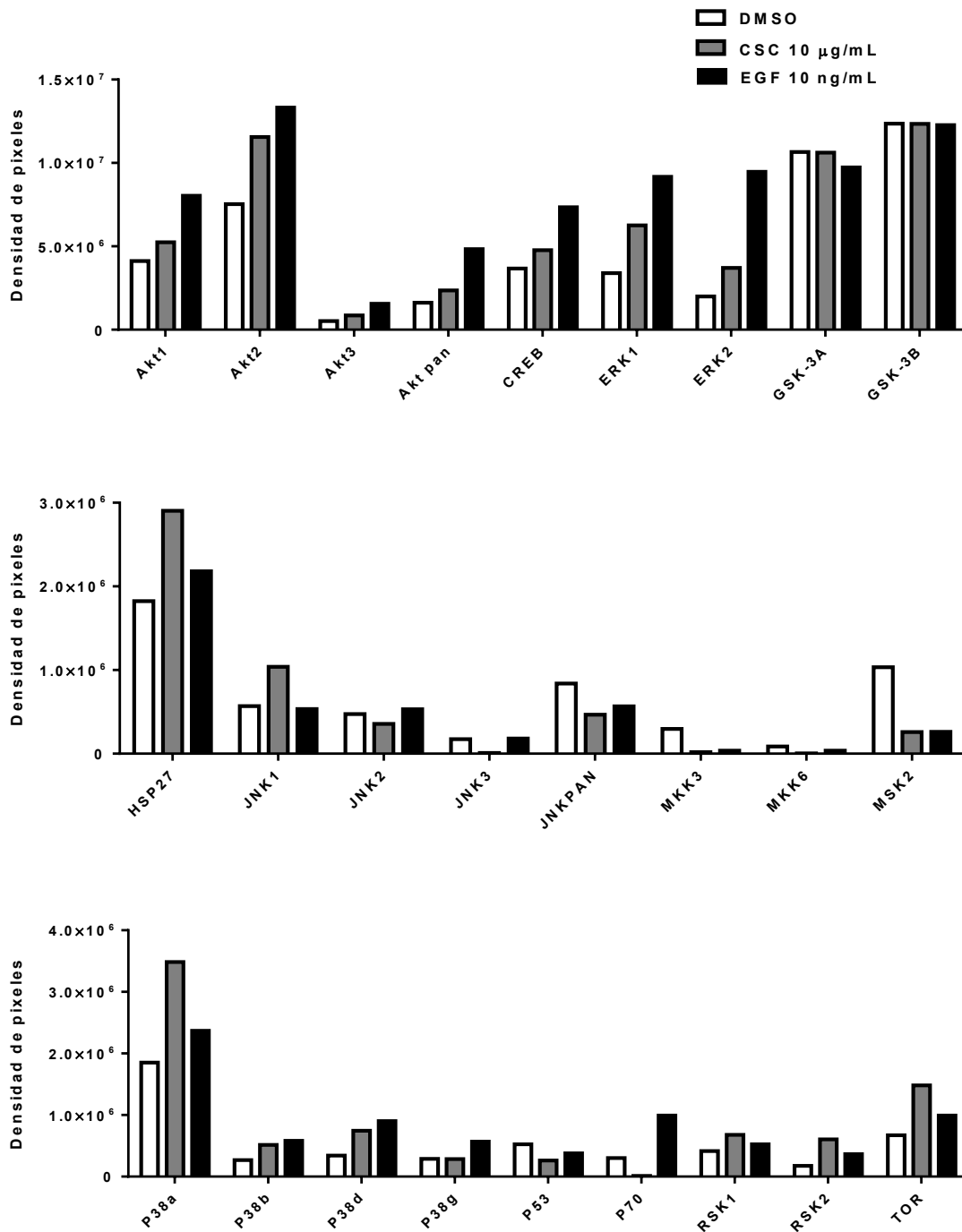


Figura 19. CSC induce la fosforilación de miembros de las vías MAPK y PI3K. Resultado del análisis de microarreglo de proteínas para los miembros de la vía MAPK y PI3K en células CaSki tratadas durante 120 min con DMSO, CSC y EGF. Los resultados son expresados como densidad de pixeles procedentes de “spots” de cada tipo de proteína (a) y como niveles de cambio con respecto al tratamiento con DMSO (b).

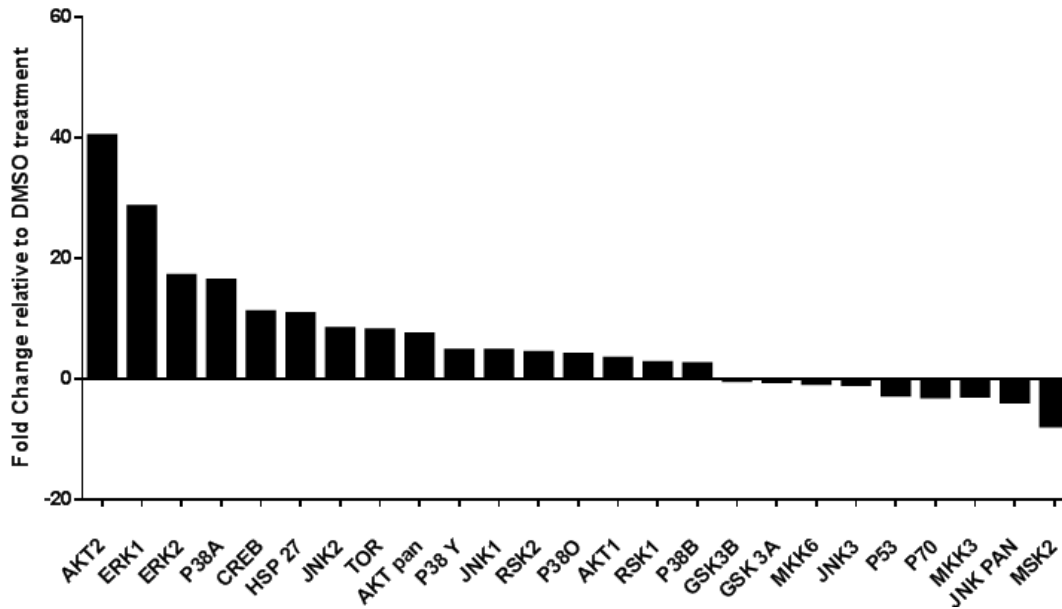


Figura 20. CSC induce la fosforilación de miembros de las vías MAPK y PI3K. Resultado del análisis de microarreglo de proteínas para los miembros de la vía MAPK y PI3K en células CaSki tratadas durante 120 min con DMSO, CSC y EGF. Los resultados son expresados como densidad de pixeles procedentes de “spots” de cada tipo de proteína (a) y como niveles de cambio con respecto al tratamiento con DMSO (b).

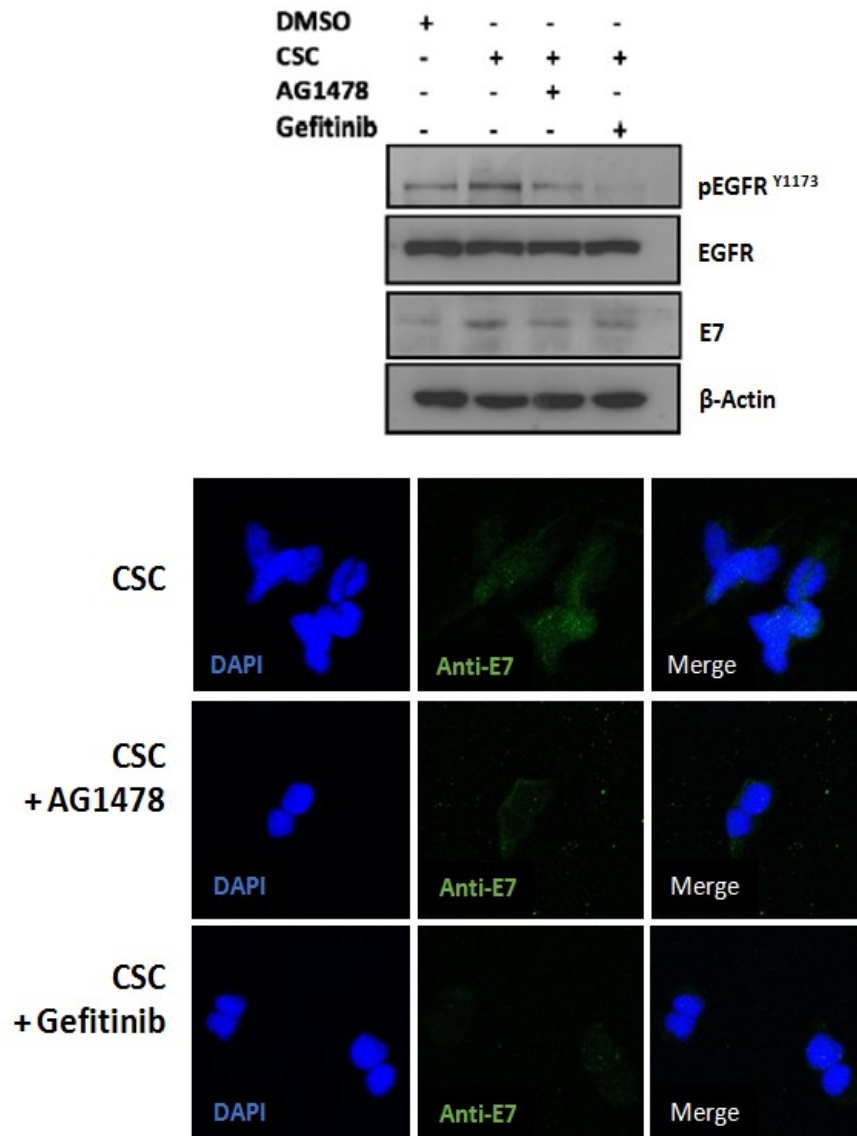


Figura 21. La pérdida de la señalización de EGFR se asocia con una disminución en los niveles de proteína E7. Las células CaSki previamente expuestas a inhibidores contra EGFR se incubaron en medio RPMI que contenía DMSO o CSC. Sus extractos proteicos se sometieron a inmunoblot (a) e inmunofluorescencia indirecta (b) con anticuerpos dirigidos contra pEGFR^{Y1173} y E7.

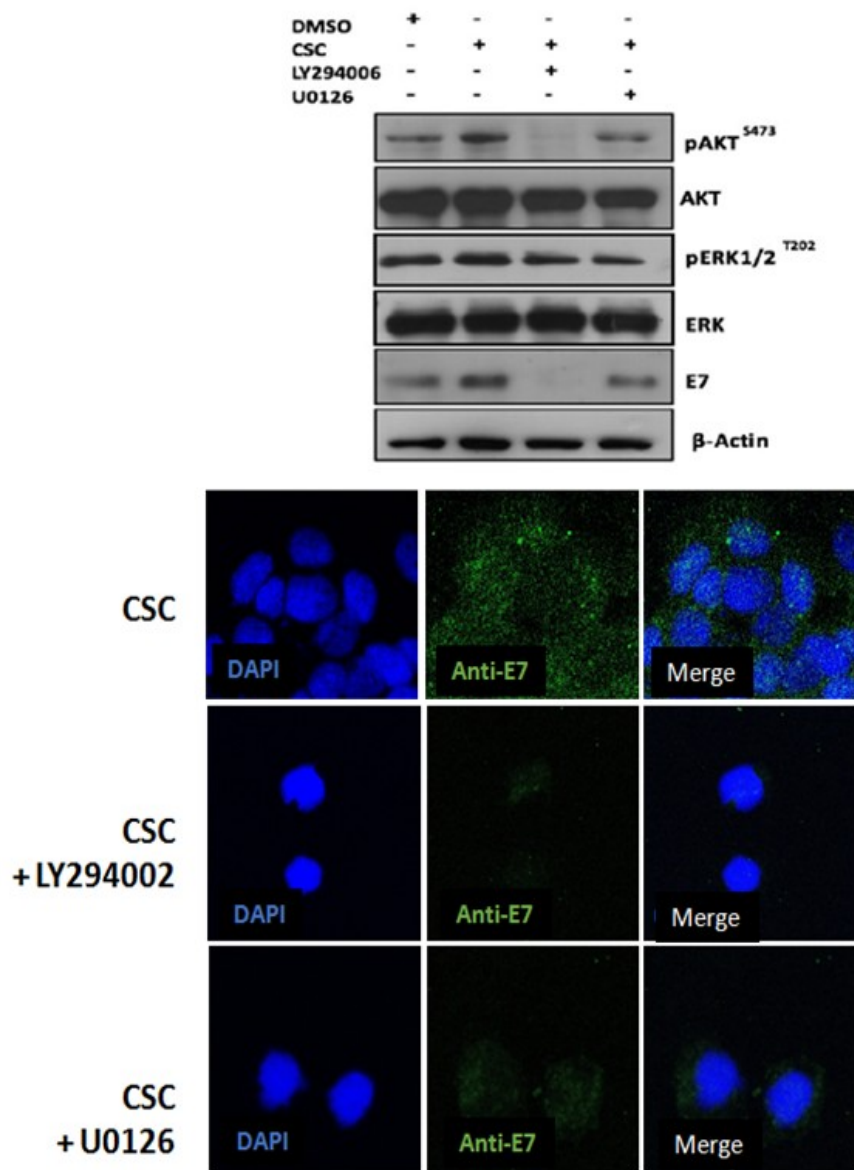


Figura 22. La señalización de Akt es crítica para inducir la sobreexpresión de E7 inducida por CSC. Las células CaSki previamente expuestas a inhibidores contra AKT y MEK se incubaron en medio RPMI que contenía DMSO o CSC. Sus extractos proteicos se sometieron a inmunoblot (a) e inmunofluorescencia indirecta (b) con anticuerpos dirigidos contra pAKT^{S473}, pERK^{T202}, E7 y β-actina.

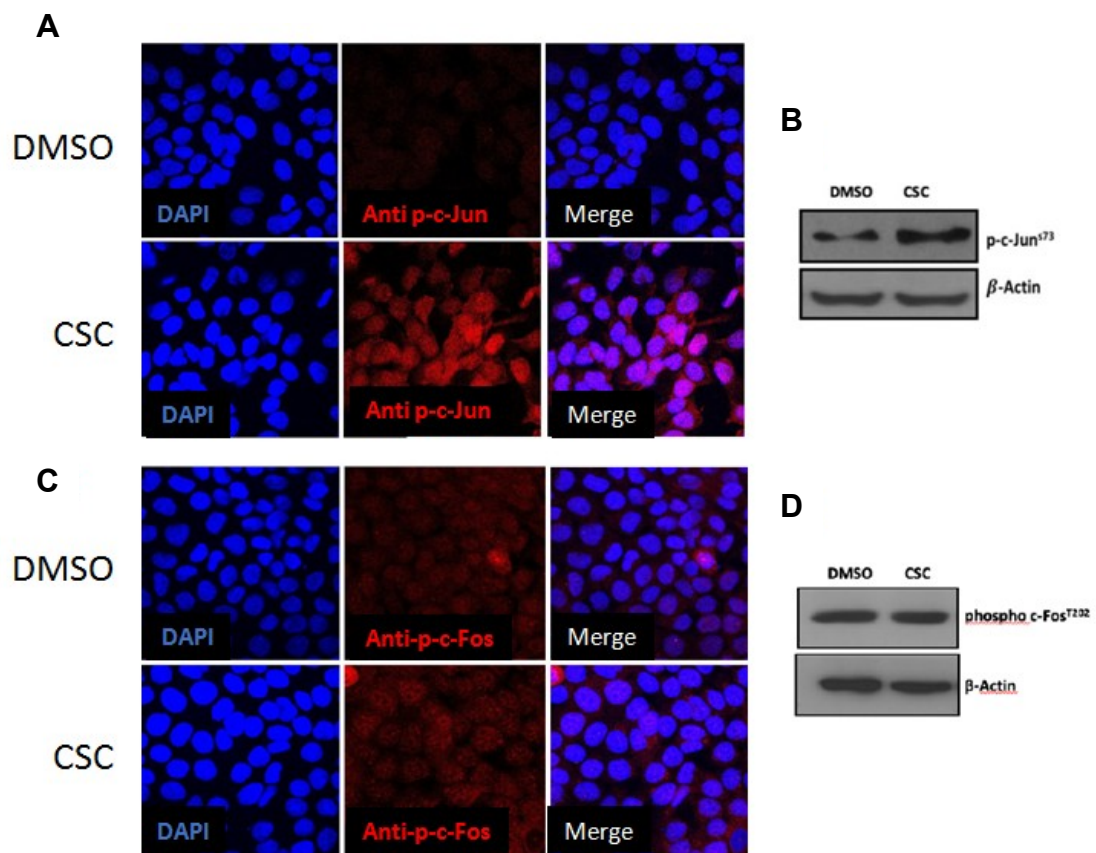


Figura 23. CSC induce la fosforilación de c-Jun pero no c-Fos en células CaSki. Microscopía confocal para p-c-Jun (A) y p-c-Fos (C) en células CaSki tratadas 2 h con DMSO y CSC, utilizando un anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo rojo de Texas. DAPI: marcador de DNA fluorescente, rodamina: marcador fluorescente del citoesqueleto de actina. Los resultados fueron confirmados por inmunoblot para p-c-Jun (B) y p-c-Fos (D)

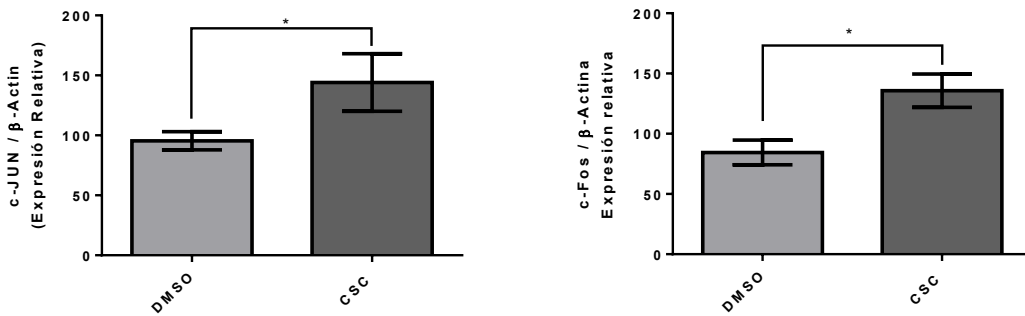
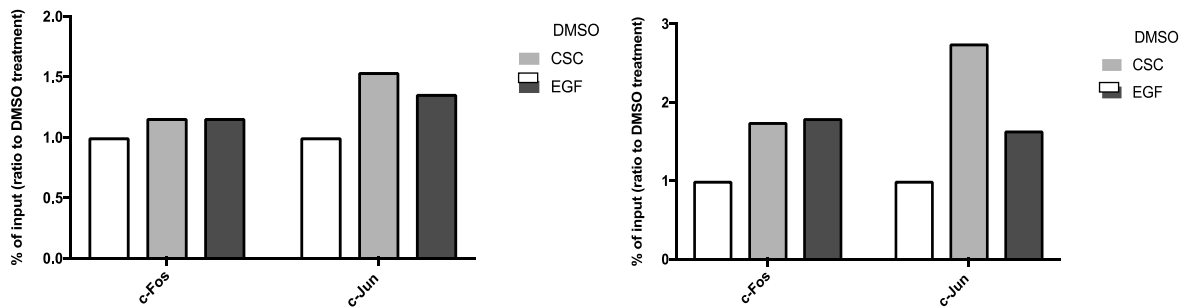
A**B**

Figura 24. CSC promueve la sobreexpresión de c-Jun y su unión a la LCR del genoma viral. A) Niveles relativos de c-Jun y c-Fos post tratamiento con DMSO y CSC normalizado frente a los niveles de β -actina. B) q-PCR para los sitios TRE proximal y distal de DNA de células CaSki precipitado con anticuerpos contra c-Jun y c-Fos. Las células fueron expuestas previamente a 2 h de DMSO, CSC y EGF. * $p < 0.05$.

Al analizar los niveles de expresión de c-jun y c-fos mediante RT-qPCR los resultados mostraron un incremento después de la exposición a CSC en las células CaSki (**Figura 24 A**). Además, utilizando inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con anticuerpos dirigidos contra c-Fos y c-Jun post tratamiento con DMSO y CSC se demostró enriquecimiento tanto de c-Fos como de c-Jun en el sitio TRE / AP-1 distal (**Figura 21 B**). Sin embargo, al analizar el sitio TRE-AP-1 proximal se detectó menos enriquecimiento de c-Jun, mientras que c-Fos no demostró cambios significativos después de la exposición a CSC.

Tomados en conjunto, nuestros datos sugieren que la proteína c-Jun fosforilada es un mediador de la sobreexpresión de E6 y E7 inducida por CSC en células CaSki.

IX- DISCUSIÓN

Se ha establecido que la infección con HR-HPV es una condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de cáncer cérvico uterino [5]. Por otro lado, se conoce que el humo de cigarrillo es un cofactor involucrado en el desarrollo de esta enfermedad [22]. Por lo tanto, se puede conjeturar que el humo del cigarrillo, a través de un mecanismo directo, podría influenciar la carcinogenicidad de HPV. Esta hipótesis se fortalece al considerar estudios previos que informan sobre el hallazgo de componentes del humo del cigarrillo en la mucosa cervical de mujeres infectadas con HPV que presentan displasia cervical [46]. Además, se ha demostrado previamente que los componentes del humo del cigarrillo activan el promotor p97 de HPV16 en líneas celulares de pulmón [36]. Por ello, considerando estos antecedentes, esta tesis fue planteada con el objetivo de caracterizar una eventual vía de señalización que medie la activación del promotor p97 de HPV16 por componentes de humo de cigarrillo y, por ende, la cooperación entre ambos agentes carcinogénicos.

Los efectos de los componentes del humo del cigarrillo han sido evaluados en diversos estudios que han mostrado las diversas alteraciones a nivel genético que induce. Dentro de los componentes particulados del humo del cigarrillo, los

hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) y compuestos nitrosamínicos juegan un rol importante en su capacidad oncogénica [22]. Estos compuestos, al ser procesados y activados metabólicamente por oxidorreductasas, entre las que se encuentran enzimas de la familia citocromo P450, forman moléculas electrofílicas hidrosolubles capaces de unirse al material genético formando complejos covalentes y estables con las bases nitrogenadas, conocidos como aductos, los cuales al escapar de los mecanismos celulares de reparación, pueden causar alteraciones en los perfiles de expresión génica [47].

En efecto, estudios recientes demuestran que células pulmonares expuestas a estos componentes presentan cambios en los patrones de expresión de alrededor de 3.700 genes, entre ellos, la expresión de la enzima citocromo P450 [47]. Por esta razón, los primeros experimentos se realizaron con el fin de evaluar la actividad funcional del CSC, lo cual se realizó cuantificando los niveles de expresión de CYP1B1, un miembro de la familia de enzimas citocromo P450. Como se demostró, el tratamiento con CSC estuvo asociado a incrementos de casi 10 veces en los niveles de esta enzima, lo cual demuestra la actividad funcional del extracto usado.

Una vez demostrada la actividad del CSC en nuestro modelo de estudio, se evaluó su efecto sobre la expresión de los oncogenes tempranos de HPV-16. Los resultados demuestran que el CSC induce un efecto en la actividad transcripcional de HPV16, puesto que el tratamiento con el inhibidor de la transcripción, actinomicina D, produce una disminución significativa de los niveles de transcritos de E6 y E7. Además, la presencia de CSC, en ausencia de actinomicina D, produce un incremento de los transcritos de E7 y E7 a distintos tiempos de exposición. En este punto, resultan interesantes las diferencias observadas entre ambas líneas celulares, pues en CaSki se observó un incremento de casi 10 veces en los niveles de transcritos a las dos horas de exposición a CSC, mientras que en SiHa, solo se observó un alza de solo el doble a las 4 h de tratamiento. Las diferencias anteriores pueden tener sustento en la cantidad de genomas de HPV que existen en cada línea celular: Se ha demostrado que en CaSki, existen alrededor de 600 genomas de HPV16 por célula, mientras que en SiHa desde una

a dos copias [48, 49]. Además, la diferente localización en la que se encuentra integrado el genoma de HPV-16 en ambas líneas celulares puede conferir distintos niveles de transcripción basal. En efecto, al evaluar los niveles basales de expresión de E6 se observaron diferencias de casi 100 veces lo cual podría ser la explicación del porqué frente a la exposición a CSC no se aprecian los mismos resultados en ambas líneas celulares.

Considerando estos resultados y los datos previos de actividad del promotor p97, los experimentos posteriores se enfocaron en conocer el rol de p97 en la sobreexpresión de E6/E7. Sin embargo, dado que el humo del cigarrillo contiene numerosos compuestos químicos, incluyendo abundantes especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y aldehídos, no podemos negar la posibilidad de que otros mecanismos, además de la activación transcripcional, puedan estar involucrados de manera indirecta en la regulación de los niveles de E6 y E7. En este contexto, es posible que mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión génica inducidos por el humo del cigarrillo puedan ser responsables también de regular los niveles de expresión de E6 y E7. Según estudios en células de pulmón, la exposición a CSC se asocia con procesos de remodelación de cromatina lo cual a su vez se traduce en una expresión diferencial de diversos genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo e interesantemente, estas diferencias resultan amplificadas en casos donde ocurre infección viral [50].

De este modo, es plausible que el CSC promueva la expresión de los genes virales a través una vía indirecta mediante remodelación de cromatina. Por otro lado, el estrés oxidativo inducido por CSC también puede modular la expresión génica, promoviendo los procesos de acetilación y metilación de las histonas, e inhibiendo la actividad de las deacetilasa.

Por lo tanto, tomando estos antecedentes, resulta posible que el incremento en la expresión de los genes virales esté determinado en parte, por múltiples procesos de regulación de la expresión génica. A través de estos mecanismos el CSC puede alterar múltiples procesos celulares, incluida la polaridad celular, remodelación del citoesqueleto, migración celular, síntesis de proteínas, autofagia y apoptosis [51]. Por lo tanto, la dificultad de evaluar una sola vía de señalización

es inherente al uso del CSC y todos los estudios previos que utilizan este compuesto han tenido que sortear este problema.

Es interesante destacar que el incremento en los niveles de expresión de E6 y E7 observados en este estudio están en concordancia con un estudio previo en el cual se usó Benzo[a]pireno, donde se demuestra una correlación entre la exposición a este compuesto y el aumento en los niveles de E7 [33]. Sin embargo, estos resultados se contraponen a otro estudio el cual no reporta alteración en los niveles de E6 y E7 post-tratamiento con componentes del humo del cigarrillo [34]. Las razones que podrían explicar esta controversia pueden ser abordadas desde perspectivas biológicas y/o técnicas. Debido a su naturaleza, las líneas celulares SiHa y CaSki tienen enormes diferencias con las líneas celulares usadas en el reporte de Wei, entre ellas, el origen de las células. En efecto, las células CaSki, fueron derivadas de un carcinoma epidermoide, mientras que las células SiHa fueron establecidas desde fragmentos de un tumor primario de cérvix [48, 49]. Por lo tanto, ambas líneas celulares son derivadas de lesiones intraepiteliales de alto grado. En contraposición a esto, las líneas celulares utilizadas en el estudio de Wei, W12 y CIN612, fueron establecidas de biopsias de lesiones intraepiteliales grado I, y en consecuencia, son representativas de lesiones de bajo grado [34]. En este contexto, se ha reportado que la expresión de los factores de transcripción en una lesión de alto grado es marcadamente distinta respecto a las lesiones de bajo grado. Por ejemplo, análisis por inmunohistoquímica sugieren que la expresión de AP-1 ocurre predominantemente en todas las capas de lesiones de alto grado y en cáncer invasivo [52] esto sugiere que las diferencias en los tipos de queratinocitos empleados en cada estudio pueden explicar los resultados contradictorios, más allá del efecto real del CSC.

Por otro lado, los diferentes sitios de integración del genoma viral pueden explicar también las diferencias en la expresión génica mediada por CSC. Mientras que la región 13q21-22 es el sitio principal para la integración de HR-HPV en las células CaSki y SiHa, las células W12 muestran patrones de integración diferenciales, denominados tipo I y tipo II [53]. Por lo tanto, si se consideran los diferentes sitios de integración de HPV en el genoma de las células hospederas y la alterada

expresión génica en las líneas celulares empleadas en ambos estudios, se podría explicar la diferente respuesta al ser enfrentadas a CSC.

Los aspectos técnicos también deben ser considerados. En nuestros ensayos con CSC, las células están previamente privadas de suero durante 24 h debido a que algunas moléculas séricas, como los factores de crecimiento, pueden inducir la señalización de PI3K / Akt y MAPK, enmascarando posteriormente el efecto del CSC. Además, a diferencia del estudio de Wei, empleamos solo exposiciones cortas a CSC. Por lo tanto, no podemos negar la posibilidad de que cuestiones de diseño experimental estén involucradas en las diferencias observadas en ambos estudios.

En este estudio encontramos que la sobreexpresión de E6 / E7 mediada por CSC está mediada por la activación del promotor p97 en células derivadas de cáncer de cuello uterino de una manera dosis-dependiente. Además, evaluamos la importancia de los sitios TRE usando mutantes específicos y descubrimos que los sitios TRE proximales afectan significativamente la actividad del promotor p97 inducido por CSC. Estudios previos en fibroblastos han demostrado que el sitio AP-1 proximal es necesario para la transactivación de la LCR de HPV16 durante el ciclo viral [54]. Sin embargo, otros estudios han demostrado que el sitio distal AP-1 es crítico para la función potenciadora, mientras que el sitio proximal AP-1 parece ser importante solo en ciertos tipos celulares [55]. Por lo tanto, es plausible que AP-1 pueda ser parte de los mecanismos moleculares que median la sobreexpresión de E6 / E7 inducida por CSC.

En este estudio demostramos que el tratamiento con CSC indujo la fosforilación de EGFR en las tirosinas 1068 y 1173 en tiempos cortos de exposición, lo cual está de acuerdo con reportes previos los cuales señalan que algunos componentes del humo del cigarrillo, como la nicotina, son capaces de estimular respuestas mitogénicas y promover la proliferación celular a través de su unión a EGFR o al receptor nicotínico [24]. Interesantemente, la fosforilación en la tirosina 1068 se advierte a los 60 minutos de exposición a CSC mientras que la fosforilación en la tirosina 1173 a los 90 minutos. Este fenómeno ha sido descrito en estudios previos

donde se sugiere que la diferente localización de los aminoácidos en la proteína, podrían tener distinta sensibilidad a la estimulación de EGFR [25]. .

El EGFR, comúnmente sobre-expresado en neoplasias malignas, activa la vía de PI3K y las vías de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), las cuales pueden potencialmente modular la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) y AP-1. Interesantemente, se ha reportado que el receptor nicotínico, un receptor ionotrópico localizado en la membrana plasmática, está ampliamente distribuido en células epiteliales, lo cual podría explicar el amplio espectro de enfermedades que induce el humo del cigarrillo [56]. En esta misma línea, observamos que al inhibir EGFR se produce una disminución significativa en los niveles de E7, lo cual demuestra la importancia de este receptor para la señalización y expresión de los oncogenes virales.

Posteriormente, el análisis de microarreglo de proteína mostró que el tratamiento con CSC induce la fosforilación de distintos miembros de la vía de señalización MAPK, como la proteína ERK1, ERK2, p38a, p38b, p38d, JNK1, JNK2 y miembros de la vía PI3K, como akt1 y akt2, TOR. Esta activación generalizada de distintas vías de señalización es uno de los factores que complejiza el sistema pues genera distintas variables que difícilmente se pueden controlar. Por ende, la hipótesis del proyecto no descarta que más de una vía de señalización esté involucrada en el aumento de la expresión de E6/E7.

Debido a las numerosas proteínas que se activan en respuesta al tratamiento con CSC, se evaluó si la inhibición de alguna ruta de señalización afecta los niveles de expresión de E6/E7. Los resultados mostraron que el tratamiento con U0126, que inhibe la fosforilación de la proteína MEK, no produjo cambios notorios en la expresión de E6/E7. Estos hallazgos sugieren que la fosforilación de MEK, aunque es inducida por el tratamiento con CSC, no es esencial para inducir la sobreexpresión de E7.

Previamente Alam y col. usando cultivos estratificados, demostraron que el Benzo[a]pireno, dependiendo de su concentración, es capaz de incrementar el número de viriones y genomas de HPV31 a través de la vía MAPK. Los autores encontraron que utilizando altas concentraciones de Benzo[a]pireno, aumenta la

síntesis de viriones, mientras que a bajas concentraciones se amplifica el número de genomas [30]. Los autores reportaron posteriormente que la quinasa dependiente de ciclina-1 (CDK1), que se activa después de la incubación con Benzo[a]pireno, está implicada en la maduración del virión, un mecanismo utilizado por varios virus en su periodo de morfogénesis y que induce la actividad del promotor tardío en el genoma viral [57].

Por otro lado, la inhibición de Akt con LY294002 reveló que los niveles de E7 fueron completamente abolidos, lo que sugiere un papel crítico de esta vía de señalización para la sobreexpresión de oncogenes de HPV16 inducida por CSC. Este es uno de los resultados más relevantes de este trabajo, pues sugiere una nueva ruta de señalización por la cual los componentes de humo de cigarrillo inducen la sobreexpresión de los oncogenes tempranos de HPV.

La señalización de PI3K / AKT / mTOR controla gran parte de las rutas celulares alteradas en cáncer, como ciclo celular, supervivencia, metabolismo, motilidad e inestabilidad genómica [58]. Se ha demostrado que PI3K se amplifica y activa en cánceres de cuello uterino inducidos por HR-HPV, y juega un papel muy importante en la carcinogénesis inducida por HPV al actuar a través de una plétora de eventos celulares y moleculares. Estudios previos han demostrado que la proteína E7 de HPV16 aumenta la activación de AKT a través de la proteína RB, promoviendo un aumento en la señalización río abajo [59]. Por otro lado, la señalización de AKT promueve la diferenciación de los queratinocitos, y la inhibición farmacológica de la señalización de AKT reduce la diferenciación de los queratinocitos [60]. Por lo tanto, parece que la activación de la señalización de PI3K favorece el ciclo de vida del HPV16. Además, la vía de señalización de PI3K se ha descrito como un mediador conocido de los efectos del cigarrillo. Por ejemplo, la estimulación con nicotina promueve el crecimiento y la supervivencia celular al activar los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) a través de PI3K-AKT [61]. Además, algunas nitrosaminas como la 4- (metilnitrosamino) -1- (3-piridil) -1-butanona o NNK están asociadas a la formación de aductos de DNA, hemoglobina o lípidos, a través de también PI3K [61]. Por lo tanto, esta vía de señalización, activada por los componentes del cigarrillo, puede alterar la

homeostasis celular promoviendo la sobre-expresión de oncogenes, la fosforilación de histonas y la transformación celular.

El factor de transcripción AP-1 participa en el control de las respuestas celulares a estímulos que regulan la proliferación, la diferenciación, la respuesta inmune, la muerte celular y la respuesta a agentes genotóxicos o al estrés [62]. La composición molecular del complejo AP-1 es heterogénea, así familias de fosfoproteínas nucleares Fos y Jun pueden participar en la formación de complejos homo o heterodiméricos [63]. Nuestros resultados mostraron que la expresión de *c-jun* y su fosforilación aumentan después del tratamiento con CSC. De acuerdo con este hallazgo, estudios previos también han demostrado que diferentes miembros del complejo AP-1, como c-Fos o c-Jun son activados y podrían promover la expresión génica durante la exposición al humo del cigarrillo [64, 65]. Sin embargo, en nuestro estudio no observamos cambios en el estado de fosforilación de c-Fos.

Usando el análisis de *supershift*, muchos estudios han demostrado que la composición del complejo AP-1 es diferente en diversas condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. De hecho, los miembros estrechamente relacionados de la misma familia pueden contribuir a fenómenos biológicos bastante distintos [66]. Por lo tanto, es posible que en nuestro modelo los cambios en la composición de AP-1, debido al ciclo celular o asociados con el tratamiento CSC, promuevan un aumento y activación de los complejos c-Jun.

El humo del cigarrillo ha demostrado inducir cambios semejantes a la transición epitelio-mesenquimal con implicancias en la proliferación celular y en el crecimiento libre de anclaje [22]. Por ello, para evaluar si realmente los cambios en el patrón de expresión de los genes virales se traducen formalmente en alteraciones de la viabilidad celular, se determinaron cambios en la capacidad proliferativa de células SiHa y CaSki a través de un ensayo con el reactivo MTS que mide la viabilidad celular mediante el análisis de su capacidad para metabolizar un sustrato cromogénico. Los resultados observados muestran que la exposición a CSC es suficiente para inducir un aumento en la viabilidad celular solo en células CaSki, lo cual está en concordancia con los resultados de

expresión génica, donde se encontró que los mayores efectos se producían en esta línea celular, En consecuencia, los datos obtenidos permiten establecer que el CSC incrementa la tasa proliferativa debido en parte a la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7.

En células bronquiales humanas se ha demostrado que las vías regulatorias embrionarias Wnt y Hedhehog cumplen un rol fundamental en la transformación del fenotipo maligno inducido por CSC [67]. Por otro lado se ha reportado que la proteína E6, a través de su unión a la proteína paxilina y a la proteína de matriz extracelular fibulina 1 está involucrada en la reorganización del citoesqueleto, lo que favorece el crecimiento libre de adherencia [68]. Además, E7 interactúa con la proteína citoplasmática p600 promoviendo la resistencia a anoikis [7]. Esta es una forma de muerte celular programada que es activada cuando la célula normal intenta dividirse en la ausencia de matriz extracelular. Es así como en las líneas celulares de esta tesis, se esperaba que el CSC, a través del aumento en los niveles de E6 y E7, promoviera el crecimiento libre de adherencia aumentando el número y tamaño de las colonias en el experimento de agar semisólido. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en células SiHa. Las razones pueden ser atribuidas principalmente a los bajos niveles de expresión de las oncoproteínas virales inducidas por CSC. Como se mostró en la figura 2 c-d, el CSC solo induce incrementos a las 4 h de exposición a CSC, los cuales además no se sostienen en el tiempo. Por ello, sospechamos que estas bajas diferencias con respecto al tratamiento con DMSO, podrían ser la causa de estos resultados. Es interesante destacar que la vía Wnt promueve la transformación maligna por HPV en queratinocitos cervicales humanos [69]. Por lo tanto, es plausible un efecto aditivo en la activación de la vía Wnt canónica complementado además con las distintas vías de transformación mencionadas para E6 y E7.

Finalmente, a pesar que algunos estudios epidemiológicos han reportado una sinergia entre el hábito tabáquico y la infección por HPV en el desarrollo de cáncer cérvico uterino [27], plantear una potencial interacción entre estos dos agentes a través de un estudio *in vitro* es muy complejo, debido a que factores adicionales

pueden intervenir y afectar de manera indirecta el grado de infectividad. Por ejemplo, se ha propuesto que los componentes del humo del cigarrillo podrían alterar la capacidad oncogénica de HPV a través de la generación de estrés oxidativo y posterior depresión de la respuesta inmune [70]. En este sentido, es conocido el efecto inmunosupresor del humo del cigarrillo como responsable de otras enfermedades. Por otro lado, se ha propuesto que los niveles de Benzo[a]pireno presentes en la polución ambiental también podrían ejercer un efecto en la expresión génica de HPV [71]. Por esta razón, esta tesis se ha enfocado en comprender la señalización que regula la expresión de las principales oncoproteínas virales E6 y E7.

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado una relación causal entre el tabaquismo y el desarrollo del cáncer cérvico uterino [72, 73]. A pesar que no existe todavía un mecanismo claro, la presencia de carcinógenos del tabaco en la mucosa cervical [74] abre la posibilidad que estos compuestos puedan alterar el ciclo replicativo de HPV en aquellas células previamente infectadas. Esta tesis constituye una aproximación *in vitro* que aborda esta posibilidad y propone un modelo de comunicación cruzada entre dos agentes carcinogénicos. Los resultados mostrados dan cuenta de una correlación entre el tratamiento con condensado de humo de cigarrillo y el aumento en la expresión de los oncogenes tempranos de HPV-16 en células CaSki. A pesar que aún no se puede establecer el mecanismo completo, hay luces de un proceso secuencial, donde EGFR, MAPK, PI3K, y AP-1 juegan un rol importante.

En conclusión, esta tesis demuestra que la transcripción de genes virales tempranos de HPV se altera por la exposición al humo del cigarrillo a través de la vía EGFR/PI3K, lo cual sugiere un mecanismo común de carcinogenicidad entre ambos factores en el contexto de células de cuello uterino.

X- CONCLUSIONES

- Los resultados expuestos permiten concluir que la transcripción génica de HPV-16 en células de cáncer de cuello uterino es un proceso dinámico y modulable en respuesta a estímulos externos.
- La exposición aguda a componentes de humo de cigarrillo incrementan la transcripción de los oncogenes E6 y E7 de HPV16. EGFR juega un rol clave en este proceso, pues a través de este receptor se propaga la cascada de señalización.
- La vía de señalización PI3K es crítica para incrementar los niveles proteicos de E6 y E7 en respuesta al tratamiento con condensado de humo de cigarrillo.
- c-Jun fosforilado podría ser un mediador de la sobreexpresión de E6 y E7 inducida por CSC en células CaSki.

XI- BIBLIOGRAFÍA

1. Bosch, F.X. and S. de Sanjose, *The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. Dis Markers, 2007. **23**(4): p. 213-27.
2. Wentz, W.B., *Histologic grade and survival in cervical cancer*. Obstet Gynecol, 1961. **18**: p. 412-6.
3. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
4. zur Hausen, H., et al., *Human papilloma viruses and cancer*. Bibl Haematol, 1975(43): p. 569-71.
5. de Villiers, E.M., et al., *Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology*. Lancet, 1987. **2**(8561): p. 703-6.
6. Gupta, S., P. Kumar, and B.C. Das, *HPV: Molecular pathways and targets*. Curr Probl Cancer, 2018.
7. Moody, C.A. and L.A. Laimins, *Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(8): p. 550-60.
8. zur Hausen, H., *Human papillomavirus & cervical cancer*. Indian J Med Res, 2009. **130**(3): p. 209.
9. Doorbar, J., et al., *Human papillomavirus molecular biology and disease association*. Rev Med Virol, 2015. **25** Suppl 1: p. 2-23.
10. Akeel, R.A., *Identification of HPV Integration and Genomic Patterns Delineating the Clinical Landscape of Cervical Cancer*. Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **16**(18): p. 8041-5.
11. Pim, D. and L. Banks, *Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses*. APMIS, 2010. **118**(6-7): p. 471-93.
12. DiMaio, D. and L.M. Petti, *The E5 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 99-114.
13. Kanda, T. and S. Mori, *[Regulation of HPV-gene expression]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2007. **52**(10 Suppl): p. 1106-12.
14. Schwartz, S., *Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 187-96.
15. Hebner, C.M. and L.A. Laimins, *Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity*. Rev Med Virol, 2006. **16**(2): p. 83-97.
16. McBride, A.A., *The papillomavirus E2 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 57-79.
17. Li, C.C., et al., *Identification of the human papillomavirus E2 protein in genital tract tissues*. J Virol, 1988. **62**(2): p. 606-9.
18. Chan, W.K., G. Klock, and H.U. Bernard, *Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia*. J Virol, 1989. **63**(8): p. 3261-9.

19. Yuan, F., K. Auburn, and C. James, *Altered growth and viral gene expression in human papillomavirus type 16-containing cancer cell lines treated with progesterone*. *Cancer Invest*, 1999. **17**(1): p. 19-29.
20. Rous, P. and J.W. Beard, *A Virus-Induced Mammalian Growth with the Characters of a Tumor (the Shope Rabbit Papilloma) : Iii. Further Characters of the Growth: General Discussion*. *J Exp Med*, 1934. **60**(6): p. 741-66.
21. Winkelstein, W., Jr., *Smoking and cancer of the uterine cervix: hypothesis*. *Am J Epidemiol*, 1977. **106**(4): p. 257-9.
22. IARC, *Tobacco Smoking and Tobacco Smoke*. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans (Lyon, France). 2004. **83**: p. 121-844.
23. Hang, B., *Formation and repair of tobacco carcinogen-derived bulky DNA adducts*. *J Nucleic Acids*, 2010. **2010**: p. 709521.
24. Chu, M., J. Guo, and C.Y. Chen, *Long-term exposure to nicotine, via ras pathway, induces cyclin D1 to stimulate G1 cell cycle transition*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(8): p. 6369-79.
25. Petecchia, L., et al., *Bronchial airway epithelial cell damage following exposure to cigarette smoke includes disassembly of tight junction components mediated by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway*. *Chest*, 2009. **135**(6): p. 1502-12.
26. Mercer, B.A. and J.M. D'Armiento, *Emerging role of MAP kinase pathways as therapeutic targets in COPD*. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2006. **1**(2): p. 137-50.
27. Gunnell, A.S., et al., *Synergy between cigarette smoking and human papillomavirus type 16 in cervical cancer in situ development*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. **15**(11): p. 2141-7.
28. Plummer, M., et al., *Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study*. *Cancer Causes Control*, 2003. **14**(9): p. 805-14.
29. Kim, M.S., et al., *HPV-16, tobacco-specific N-nitrosamine, and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in oral carcinogenesis*. *Cancer Res*, 1993. **53**(20): p. 4811-6.
30. Alam, S., et al., *The cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene enhances human papillomavirus synthesis*. *J Virol*, 2008. **82**(2): p. 1053-8.
31. Bowser, B.S., S. Alam, and C. Meyers, *Treatment of a human papillomavirus type 31b-positive cell line with benzo[a]pyrene increases viral titer through activation of the Erk1/2 signaling pathway*. *J Virol*, 2011. **85**(10): p. 4982-92.
32. Ndisang, D., et al., *The cellular transcription factor Brn-3a and the smoking-related substance nicotine interact to regulate the activity of the HPV URR in the cervix*. *Oncogene*, 2010. **29**(18): p. 2701-11.

33. Maher, D.M., et al., *Curcumin suppresses human papillomavirus oncoproteins, restores p53, Rb, and PTPN13 proteins and inhibits benzo[a]pyrene-induced upregulation of HPV E7*. *Mol Carcinog*, 2011. **50**(1): p. 47-57.
34. Wei, L., et al., *Tobacco exposure results in increased E6 and E7 oncogene expression, DNA damage and mutation rates in cells maintaining episomal human papillomavirus 16 genomes*. *Carcinogenesis*, 2014. **35**(10): p. 2373-81.
35. Munoz, J.P., et al., *Functional interaction between human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins and cigarette smoke components in lung epithelial cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e38178.
36. Pena, N., et al., *Tobacco smoke activates human papillomavirus 16 p97 promoter and cooperates with high-risk E6/E7 for oxidative DNA damage in lung cells*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0123029.
37. Lopez-Bergami, P., E. Lau, and Z. Ronai, *Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(1): p. 65-76.
38. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(5): p. E131-6.
39. Cripe, T.P., et al., *Transcriptional activation of the human papillomavirus-16 P97 promoter by an 88-nucleotide enhancer containing distinct cell-dependent and AP-1-responsive modules*. *New Biol*, 1990. **2**(5): p. 450-63.
40. Li, Y.T., B. He, and Y.Z. Wang, *Exposure to cigarette smoke upregulates AP-1 activity and induces TNF-alpha overexpression in mouse lungs*. *Inhal Toxicol*, 2009. **21**(7): p. 641-7.
41. Swenson, W.G., B.R. Wuertz, and F.G. Ondrey, *Tobacco carcinogen mediated up-regulation of AP-1 dependent pro-angiogenic cytokines in head and neck carcinogenesis*. *Mol Carcinog*, 2011. **50**(9): p. 668-79.
42. Liu, Y., et al., *An AP-1 binding site mutation in HPV-16 LCR enhances E6/E7 promoter activity in human oral epithelial cells*. *Virus Genes*, 2002. **24**(1): p. 29-37.
43. Doorbar, J., et al., *The biology and life-cycle of human papillomaviruses*. *Vaccine*, 2012. **30 Suppl 5**: p. F55-70.
44. Chen, R.J., et al., *Epigenetic effects and molecular mechanisms of tumorigenesis induced by cigarette smoke: an overview*. *J Oncol*, 2011. **2011**: p. 654931.
45. Verma, S., et al., *Evaluation of CYP1B1 Expression, Oxidative Stress and Phase 2 Detoxification Enzyme Status in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients*. *J Clin Diagn Res*, 2017. **11**(3): p. BC01-BC05.
46. Prokopczyk, B., et al., *Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers*. *J Natl Cancer Inst*, 1997. **89**(12): p. 868-73.
47. Starek, A. and I. Podolak, *[Carcinogenic effect of tobacco smoke]*. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2009. **60**(4): p. 299-310.

48. Baker, C.C., et al., *Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines*. J Virol, 1987. **61**(4): p. 962-71.
49. Pattillo, R.A., et al., *Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line*. Science, 1977. **196**(4297): p. 1456-8.
50. Chen, D., et al., *Cigarette smoke component acrolein modulates chromatin assembly by inhibiting histone acetylation*. J Biol Chem, 2013. **288**(30): p. 21678-87.
51. Sobus, S.L. and G.W. Warren, *The biologic effects of cigarette smoke on cancer cells*. Cancer, 2014. **120**(23): p. 3617-26.
52. Kyo, S., et al., *Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 2): p. 401-11.
53. Stanley, M.A., et al., *Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line*. Int J Cancer, 1989. **43**(4): p. 672-6.
54. Kikuchi, K., A. Taniguchi, and S. Yasumoto, *Induction of the HPV16 enhancer activity by Jun-B and c-Fos through cooperation of the promoter-proximal AP-1 site and the epithelial cell type--specific regulatory element in fibroblasts*. Virus Genes, 1996. **13**(1): p. 45-52.
55. Bauknecht, T., et al., *Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1*. EMBO J, 1992. **11**(12): p. 4607-17.
56. Wu, J. and R.J. Lukas, *Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes*. Biochem Pharmacol, 2011. **82**(8): p. 800-7.
57. Alam, S., et al., *Downregulation of Cdc2/CDK1 kinase activity induces the synthesis of noninfectious human papillomavirus type 31b virions in organotypic tissues exposed to benzo[a]pyrene*. J Virol, 2010. **84**(9): p. 4630-45.
58. Polivka, J., Jr. and F. Janku, *Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway*. Pharmacol Ther, 2014. **142**(2): p. 164-75.
59. Zhang, L., et al., *The role of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in human cancers induced by infection with human papillomaviruses*. Mol Cancer, 2015. **14**: p. 87.
60. Sayama, K., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40390-6.
61. Zhang, Q., et al., *A Phosphatidylinositol 3-kinase-regulated Akt-independent signaling promotes cigarette smoke-induced FRA-1 expression*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 10174-81.
62. Mechta-Grigoriou, F., D. Gerald, and M. Yaniv, *The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity*. Oncogene, 2001. **20**(19): p. 2378-89.

63. Kaminska, B., et al., *Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2000. **60**(3): p. 395-402.
64. Yu, D., et al., *Cigarette smoke induced urocytic epithelial mesenchymal transition via MAPK pathways*. Oncotarget, 2017. **8**(5): p. 8791-8800.
65. Geng, H., et al., *Cigarette smoke extract-induced proliferation of normal human urothelial cells via the MAPK/AP-1 pathway*. Oncol Lett, 2017. **13**(1): p. 469-475.
66. Pyrzynska, B., G. Mosieniak, and B. Kaminska, *Changes of the trans-activating potential of AP-1 transcription factor during cyclosporin A-induced apoptosis of glioma cells are mediated by phosphorylation and alterations of AP-1 composition*. J Neurochem, 2000. **74**(1): p. 42-51.
67. Hassan Lemjabbar-Alaoui^{1*}, V.D., Sukhvinder S. Sidhu^{1,2.}, Aklilu Mengistab¹, Walter Finkbeiner³, Marianne Gallup¹, Carol Basbaum¹{, *Wnt and Hedgehog Are Critical Mediators of Cigarette Smoke-Induced Lung Cancer*. PLoS ONE, 2006(1).
68. Sarode, G.S. and S.C. Sarode, *E6 oncoprotein interaction with paxillin and FAK*. Oral Oncol, 2014. **50**(4): p. e17.
69. Uren, A., et al., *Activation of the canonical Wnt pathway during genital keratinocyte transformation: a model for cervical cancer progression*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6199-206.
70. Sopori, M., *Effects of cigarette smoke on the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 372-7.
71. Lee, P.N., A.J. Thornton, and J.S. Hamling, *Epidemiological evidence on environmental tobacco smoke and cancers other than lung or breast*. Regul Toxicol Pharmacol, 2016. **80**: p. 134-63.
72. McCann, M.F., et al., *Nicotine and cotinine in the cervical mucus of smokers, passive smokers, and nonsmokers*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1992. **1**(2): p. 125-9.
73. Tsai, H.T., et al., *Lifetime cigarette smoke and second-hand smoke and cervical intraepithelial neoplasm--a community-based case-control study*. Gynecol Oncol, 2007. **105**(1): p. 181-8.
74. Melikian, A.A., et al., *Identification of benzo[a]pyrene metabolites in cervical mucus and DNA adducts in cervical tissues in humans by gas chromatography-mass spectrometry*. Cancer Lett, 1999. **146**(2): p. 127-34.

“La ciencia es una empresa cooperativa que se extiende de generación en generación. Es el paso de la antorcha del maestro, al estudiante, al maestro. Una comunidad de mentes que se remontan desde la antigüedad y hacia adelante a las estrellas”

Neil DeGrasse Tyson