

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Postgrado



***“Rol de la oncoproteína E7 de virus papiloma humano tipo 16 y
de la vía EGFR/MAPK-PI3K en la activación de PIR/NF- κ B en
células orales humanas”***

Diego Antonio Carrillo Beltrán

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Francisco Aguayo Gonzalez
Director de Tesis

Fecha: 12/08/2020

Financiamiento

Esta tesis fue financiada por proyecto Fondecyt regular 1161219 (F Aguayo); Conicyt-Fondap 15130011 (F Aguayo); Beca Conicyt Doctorado nacional 2018 (Diego Carrillo Beltrán) y Beca Gastos operacionales Conicyt 21180901 (Diego Carrillo Beltrán).

Agradecimientos

Para mi realizar esta tesis fue todo un agrado, gracias al constante apoyo de una gran persona, investigador, profesor y guía de tesis. El doctor Francisco Aguayo me ayudo a orientar mi camino en la ciencia, me faltan palabras para agradecer por todo su apoyo y ayuda.

Dentro del laboratorio he conocido a amigos y colegas que han aportado en gran medida en un ambiente muy bueno de trabajo con un constante apoyo y buen compañerismo. Son muchas las personas que han colaborado en este aspecto, solo puedo dar las gracias a todos ellos los que están y que estuvieron en el laboratorio.

Agradezco al programa de doctorado que me dio la oportunidad de ingresar y aprender en gran medida diferentes aspectos de las ciencias biomédicas. Con respecto a lo anterior agradezco a cada profesor que me impartió clases y a la gente que trabaja para el alumnado y que siempre está dispuesta ayudar y comprender las diferentes situaciones que pueden afectar al alumno. En especial agradecer a Cecilia Carter por siempre estar presente en mis requerimientos.

En particular quiero agradecer al profesor Enrique Boccardo de la universidad de Sao Paulo, por entregarme herramientas metodológicas para desarrollar esta tesis y por ser una gran persona que me acogió de gran manera en su laboratorio en Brasil.

Finalmente quiero agradecer Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo del país por otorgarme la beca de doctorado y los beneficios complementarios que ayudaron en mi formación y me permitieron ser alumno del doctorado en ciencias biomédicas.

Dedicatoria

Esta tesis es dedicada a mi esposa y padres. Las personas que siempre me han apoyado en todo lo que realizo, aquellos que sienten quizás hasta más felicidad que yo por cada logro de mi camino profesional. Gracias a ustedes pude llegar al lugar en el que estoy. Me siento muy orgulloso que Yasna, Consuelo y Antonio estén presente a mi lado en este nuevo salto en mi vida. Esta tesis para mí fue un gran trabajo que solo puedo dedicárselos a ustedes a los que amo con mi vida.

I. Tabla de contenido

II. Tabla de figuras	6
III. Resumen	8
IV. Introducción	10
1. Cáncer de cabeza y cuello: epidemiología y factores de riesgo	10
2. Virus papiloma Humano.....	11
2.1. Estructura y clasificación	11
2.2. Ciclo replicativo viral.....	12
2.3. Proteínas virales: estructura y función.....	14
2.4. Epidemiología de la infección y cáncer.	15
2.5. Mecanismos de oncogénesis mediados por VPH.	15
2.6. VPH y Cáncer Oral	18
2.7. PIR/NF- κ B en la progresión tumoral del cáncer oral y su relación con VPH ..	19
V. Hipótesis	21
VI. Objetivos	21
VII. Materiales y Metodos	22
1. Líneas celulares y cultivo celular	22
2. Transducción.....	22
3. Ensayo de viabilidad	22
4. Cultivos organotípicos.....	23
5. Extracción y cuantificación de proteínas	23
6. Western blot	24
7. Inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	25
8. PCR en tiempo real	25
9. NF- κ B y Phospho MAPK array	26
10. Ensayos de reportero de Luciferasa y ensayos de activación de NF- κ B.....	27
11. Ensayos de inhibición farmacológica.....	28
12. Ensayos con ARN interferentes	29
13. Inmunoprecipitación de Cromatina	29
14. Ensayo de migración celular	31
15. Análisis estadístico.....	31
VIII. Resultados	32
IX. Discusión	58

X. Conclusiones.....	66
XI. Bibliografía.....	¡Error! Marcador no definido.

II. Tabla de figuras

Figura 1. Regiones anatómicas del cáncer de cabeza y cuello	10
Figura 2. Organización del genoma de VPH	12
Figura 3. Infección del VPH en el epitelio normal.....	14
Figura 4. Mecanismos de oncogénesis de E6	16
Figura 5. Mecanismos de oncogénesis de E7	17
Figura 6. Modelo de la hipótesis	20
Figura 7: Vector pmiR-GLO PIR-PRO.	28
Figura 8: Vector pHAGE NF-κB-TA-LUC-UBC-GFP-W.	28
Figura 9. Efecto de geneticina (G418) sobre la viabilidad celular	33
Figura 10. La expresión de E7 de VPH16 regula positivamente los transcritos y los niveles de proteína de PIR.....	34
Figura 11. Ensayo de interferencia de E7 de VPH16 analizando los niveles de Pirin .	35
Figura 12. La proteína E7 de VPH16 regula la actividad del promotor de PIR	37
Figura 13. NRF2 es regulado positivamente y reclutado en el promotor de PIR con E7 de VPH16.....	38
Figura 14. La expresión de E7 de VPH16 induce cambios fenotípicos en células orales	39
Figura 15. La proteína E7 de VPH16 induce la activación de NF-κB en células tumorales orales.....	41
Figura 16. Membranas array NF-kB.....	41
Figura 17. La expresión de E7 de VPH16 induce cambios en las proteínas de la vía NF-kB en las células orales	42
Figura 18. Los niveles de p65 ^{S529} y C-Rel aumentan en presencia de la proteína E7 de VPH16 en células tumorales orales	43
Figura 19. La expresión de E7 de VPH16 induce un incremento en los niveles de EGFR y activación de la vía PI3K/AKT en células orales	46
Figura 20. Membranas array MAPK/PI3K.....	47
Figura 21. La expresión de E7 de VPH16 induce cambios en las proteínas de las vías MAPK y PI3K en las células orales.....	48
Figura 22. EGFR y la vía PI3K/AKT son importantes en la regulación de los niveles de Pirin inducidos por E7 de VPH16	50
Figura 23. La expresión de E7 de VPH16 induce un incremento en los niveles de Pirin, EGFR y activación de la vía PI3K/AKT en cultivos organotípicos orales y de queratinocitos primarios.....	54
Figura 24. El dominio de E7Δ21-24 (mutación en el sitio de unión a pRb) es relevante en la regulación de la expresión de Pirin.....	55
Figura 25. Los niveles de Pirin regulados por E7 son dependientes de EGFR/PI3K/AKT1 en los cultivos organotípicos.....	56

Figura 26. Los niveles de c-Rel y p65 ^{S529} regulados por E7 son dependientes de PI3K/AKT1 en los cultivos organotípicos	57
Figura 27. Modelo de los resultados de la tesis.	65

III. Resumen

El virus papiloma humano (VPH) está involucrado en el desarrollo de cáncer cervical, cabeza y cuello y anogenital. VPH16 es el tipo viral asociado a un mayor número de casos de cáncer. El cáncer de la cavidad oral es un tipo de cáncer de cabeza y cuello en el cual VPH16 ha sido detectado en un subgrupo de casos y se caracteriza por alta frecuencia de metástasis regionales. Se ha sugerido que VPH está involucrado en la regulación de la vía del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas (NF- κ B) para inducir un fenotipo metastásico, aunque no es clara su función durante la progresión tumoral. Previamente, hemos encontrado que la oncoproteína E7 de VPH16 promueve un incremento de los niveles de la proteína Pirin, codificada por el gen PIR y que funciona como un regulador de NF- κ B. Además, la proteína Pirin es asociada a progresión tumoral debido a que regula positivamente la transición epitelial-mesenquimal (TEM) y la migración de células tumorales. Por lo mencionado anteriormente, en esta tesis se propuso como hipótesis que “La oncoproteína E7 de VPH16 promueve la activación de la vía PIR/NF- κ B a través de la señalización EGFR/MAPK-PI3K en células orales humanas” y el objetivo general fue analizar la activación de PIR/NF- κ B por la oncoproteína E7 de VPH16 y mediada por la vía de señalización EGFR/MAPK-PI3K en células orales humanas. Los resultados obtenidos indican que E7 induce un incremento en los niveles de transcritos de PIR a través de la activación de su promotor, mediado por el reclutamiento de NRF2, lo cual se traduce en un aumento significativo de los niveles de la proteína Pirin. Además, se determinó que el incremento de E7 y Pirin promueve la activación de la vía NF- κ B. Mediante una aproximación proteómica, se observó regulación positiva de diversas proteínas relacionadas con la señalización de NF- κ B. Dentro de ellas, IRF5, IRF8, p-P65^{S529}, C-REL (proteínas relacionada con activación) e I κ B (proteína de auto regulación NF- κ B) fueron reguladas positivamente. Del mismo modo, se observó que la vía EGFR/PI3K/AKT1 es en gran parte la responsable de la regulación de PIR/NF- κ B inducida por E7 de VPH16. Esta tesis permite concluir que E7 induce activación de la vía EGFR/PI3K/AKT1/NRF2 lo cual a su vez lleva a activación de PIR/NF- κ B promoviendo la migración de células tumorales epiteliales orales.

IV. Abstract

Human papillomavirus (HPV) is involved in the development of cervical, head and neck, and anogenital cancers. HPV16 is the viral type associated with the highest number of cancer cases. Oral cavity cancer is a type of head and neck cancer in which HPV16 has been detected in a subset of cases and is characterized by a high frequency of regional metastasis. HPV has been suggested to be involved in the regulation of the activated B cell kappa light chain enhancer nuclear factor pathway (NF- κ B) to induce a metastatic phenotype, although its role during tumor progression is unclear. Previously, we have found that the HPV16 E7 oncoprotein promotes increased levels of the Pirin protein, encoded by the PIR gene, which functions as a regulator of NF- κ B. Furthermore, the Pirin protein is associated with tumor progression because it positively regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and tumor cell migration. In this Thesis, we hypothesized that "HPV16 E7 oncoprotein promotes activation of the PIR/NF- κ B pathway through EGFR/MAPK-PI3K signaling in human oral cells" and the general goal was to analyze the activation of PIR/NF- κ B by the HPV16 E7 oncoprotein and mediated by the EGFR/MAPK-PI3K signaling pathway in human oral cells. The results obtained indicate that E7 induces an increase in the levels of PIR transcripts through the activation of its promoter, mediated by the recruitment of NRF2, which translates into a significant increase in the levels of the Pirin protein. In addition, the increase in E7 and Pirin promotes activation of the NF- κ B pathway. Using a proteomic approach, we observed positive regulation of various proteins related to NF- κ B signaling. Among these, IRF5, IRF8, p-P65^{S529}, C-REL (activation-related proteins) and I κ B (NF- κ B self-regulating protein) were upregulated. Similarly, we observed that the EGFR/PI3K/AKT1 pathway is largely responsible for the regulation of PIR/NF- κ B induced by HPV16 E7. This thesis allows us to conclude that E7 induces activation of the EGFR/PI3K/AKT1/NRF2 pathway, which in turn leads to activation of PIR/NF- κ B, promoting the migration of oral epithelial tumor cells.

V. Introducción

1. **Cáncer de cabeza y cuello: epidemiología y factores de riesgo**

El cáncer de cabeza y cuello es un conjunto heterogéneo de tumores que se inician en senos paranasales, nasofaringe, orofaringe (amígdala, paladar blando, base de lengua), hipofaringe, laringe, cavidad oral (mucosa oral, encía, paladar duro, lengua y suelo de boca), lengua y glándulas salivales (**Figura 1**) [1]. En el año 2018, se reportaron a nivel mundial 710.237 nuevos casos, ocupando el 7º lugar de todos los cánceres reportados. Además, se detectaron 358.477 muertes, ocupando el 9º lugar a nivel mundial [2]. En el mismo año, a nivel local se informaron 625 nuevos casos y 279 muertes, lo cual representa casi el 50% del total de casos [2].

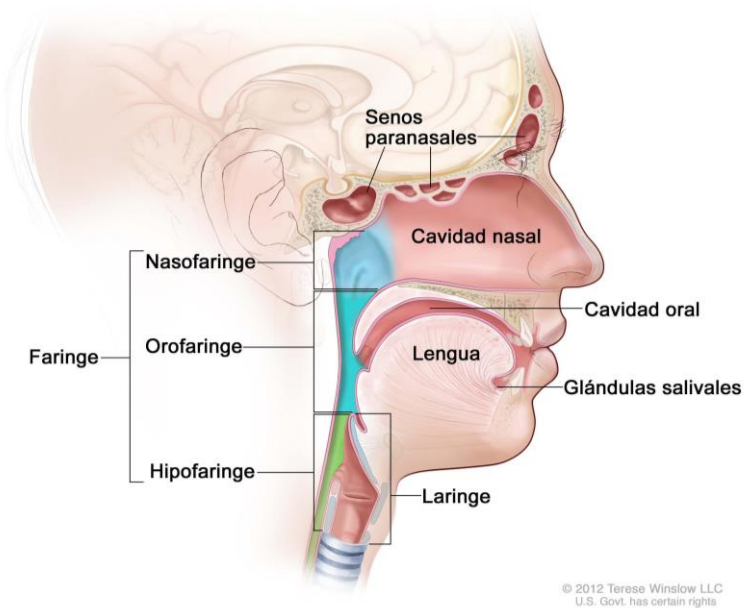


Figura 1. Regiones anatómicas del cáncer de cabeza y cuello [3].

Particularmente, el cáncer oral es bastante heterogéneo y se inicia en subsitios anatómicos como labio, lengua, piso de la boca, mucosa bucal, encía superior e inferior, trígono retromolar y paladar duro. La gran mayoría de estos cánceres comienzan en células escamosas (90%) y por ende se denominan carcinomas de células escamosas (OSCC)[3]. Sus principales características son la alta prevalencia y propensión a metástasis regionales [4]. Los sitios más comunes de presentación del cáncer son la

lengua, piso de boca y labio inferior [3]. Uno de los problemas frecuentes que presenta el cáncer oral es que el diagnóstico frecuentemente es realizado en etapas avanzadas, debido al poco conocimiento del paciente sobre la enfermedad y el mal diagnóstico inicial [5]. El avance de la enfermedad se determina principalmente por el sistema de estadificación TNM (metástasis de ganglios linfáticos tumorales) [5, 6]. En el año 2018, a nivel mundial se reportaron 354.864 nuevos casos con 177.384 muertos; siendo este tipo de cáncer el más común y con una mayor tasa de mortalidad dentro de los cánceres de cabeza y cuello [2]. Con respecto a los factores de riesgo asociados al carcinoma oral se encuentran principalmente el humo de cigarrillo, el alcohol e infección por virus papiloma humano (VPH) [7].

2. Virus papiloma Humano

2.1. Estructura y clasificación

El virus papiloma humano (VPH) pertenece a la familia *Papillomaviridae*, tiene un tamaño aproximado de 55 nm, no tiene envoltura y posee una cápside constituida por 72 capsómeros. El virus contiene un genoma consistente en ADN de doble hebra circular cerrado con aproximadamente 8 kb, el cual se divide en tres regiones (Figura 2) [8]. La primera es una región no codificante llamada “Long control region” (LCR) que contiene múltiples sitios de unión a factores de transcripción, tanto virales como celulares [8, 9]. Además, el virus posee dos regiones codificantes, la región “Early” (E) o temprana que contiene un conjunto de genes funcionales implicados en la replicación viral y una región “Late” (L) o tardía que codifica para las proteínas estructurales que forman la cápside [10] (**Figura 2**). El VPH es asociado a la infección de transmisión sexual más frecuente en la población mundial y puede afectar a hombres y mujeres [11]. La localización o región geográfica, edad promedio de iniciación sexual y ciertas medidas de control de enfermedades de transmisión sexual son factores que influyen en la prevalencia de esta infección viral [12, 13]. Se han identificado más de 200 tipos de VPH, los cuales se han clasificado en 5 géneros denominados α , β , γ , μ , and ν [14]. No obstante, existe otro método de clasificación basado por su capacidad de transformación maligna. De esta manera, existen los VPH de alto (VPH-AR) y bajo riesgo oncogénico (VPH-BR) [15, 16]. Dentro de los VPH-BR, que producen lesiones benignas

como condilomas están el VPH-6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72, -81, entre otros. Los VPH-AR, que producen lesiones malignas como el CaCu, incluye a los genotipos VPH-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -68, -73, -82 [17].

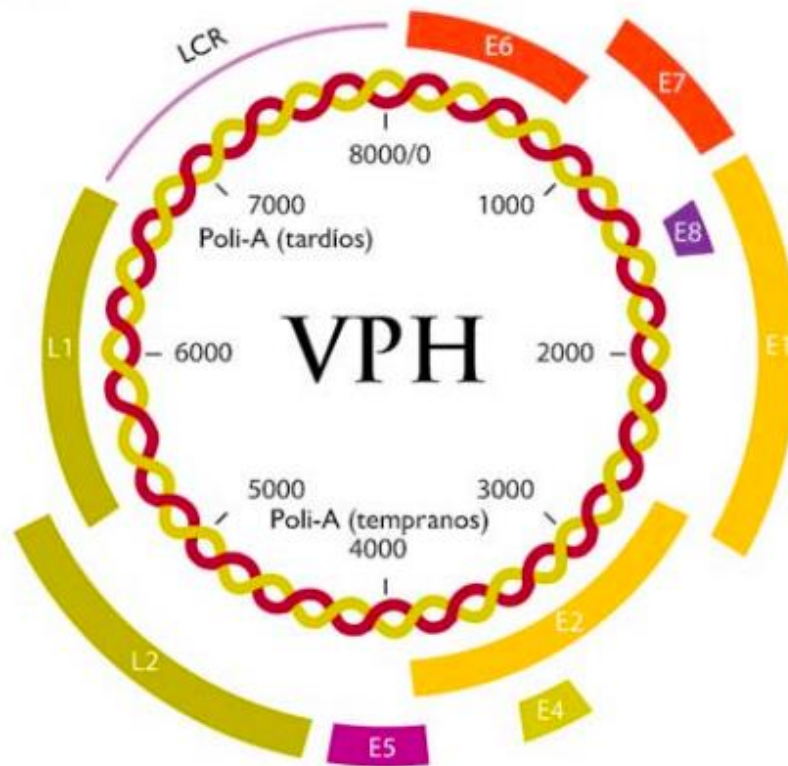


Figura 2. Organización del genoma de VPH. Se observan las regiones temprana, tardía y no codificante Extraído de [18].

2.2. Ciclo replicativo viral

El VPH presenta tropismo por células epiteliales de la piel y mucosas [19] con un ciclo replicativo dependiente de la maduración del epitelio que consta de 6 etapas: infección, desensamblaje, mantenimiento del genoma, proliferación, amplificación del genoma y síntesis del virión (**Figura 3**)[19]. En un evento de infección, el virus ingresa a través de lesiones o microtraumas en el epitelio estratificado, donde interactúa con receptores de membrana como el complejo integrina $\alpha 6 -\beta 4$ [20]. A la vez, el virus interactúa con proteoglicanos de heparán sulfato, que permiten generar un cambio conformacional en la proteína estructural L2 del virus para iniciar el ingreso a la célula [21]. Una vez unido a los receptores, el ingreso del virus se produce por un proceso endocítico relacionado

a macropinocitosis [22]. Además, se ha sugerido que dinamina-2 participa en la formación de vesículas endocíticas para permitir el ingreso del VPH [22-24]. Una vez en el citoplasma, el transporte del endosoma ocurre por el mecanismo del sistema de red Trans Golgi; de este modo, el primer evento para liberar el genoma viral en el núcleo es el reconocimiento de L2/L1/genoma viral por el complejo de clasificación endosomal celular requerido para el transporte (ESCRT)[25]. El complejo ESCRT se encarga de clasificar y enviar a L2 a degradación lisosomal [26]. El transporte en el interior de la célula ocurre a través de microtúbulos y mediante la interacción de la proteína viral L2 con dineína y β -actina [27] de manera retrógrada con dirección al retículo endoplásmico. Se ha establecido que el genoma viral ingresa al núcleo de la célula durante la mitosis [28]. Una vez dentro del núcleo de la célula hospedera, el virus inicia la expresión de sus genes tempranos. En esta primera fase del ciclo replicativo viral, el genoma se mantiene en un número bajo de copias, con la expresión de los primeros genes E1 y E2, que forman un complejo multimérico capaz de promover la amplificación del genoma viral [29]. La fase replicativa y la síntesis de proteínas ocurren en capas suprabasales del epitelio, donde hay expresión de proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), garantizando una mayor amplificación del número de copias del genoma viral y la progresión del ciclo celular [30]. Para la replicación del genoma viral, se requiere la unión de E2 a la región larga de control (LCR), lo cual promueve la unión de E1 al sitio de origen de replicación viral. Luego, a medida que el epitelio se va diferenciando, se expresan los genes tardíos que permiten formar la cápside viral [30]. Finalmente, ocurre el ensamblaje de las partículas virales mediante las proteínas L1 y L2 que permiten la formación de la cápside en el estrato granuloso del epitelio y eventualmente las células infectadas se descaman liberando viriones [31]. En resumen, el VPH necesita de un epitelio estratificado para completar su ciclo replicativo ya que requiere de la diferenciación completa de las células epiteliales para la generación de nuevos viriones.

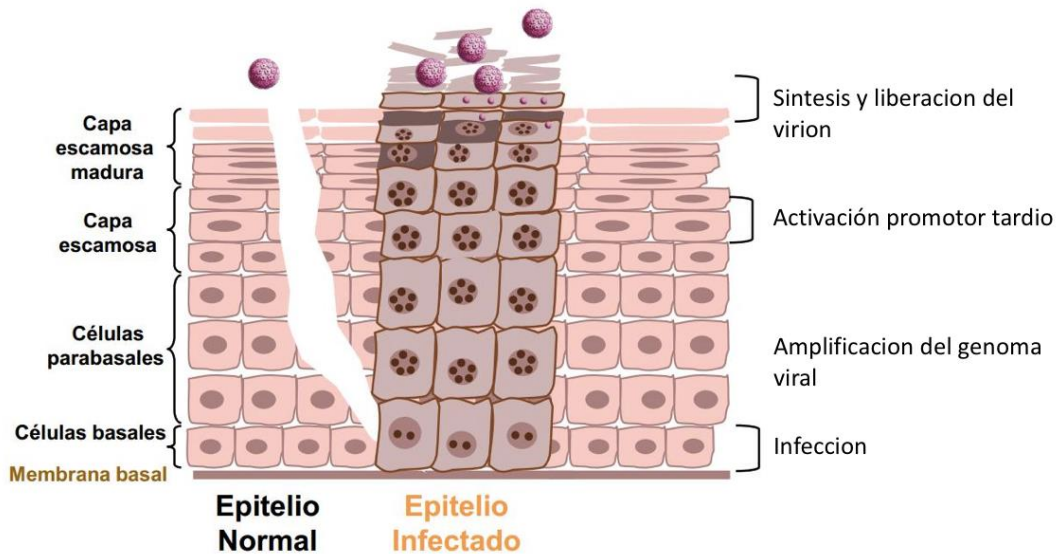


Figura 3. Infección del VPH en el epitelio normal Adaptado de [31].

2.3. Proteínas virales: estructura y función

El VPH tiene la capacidad de usurpar los mecanismos de replicación, transcripción y traducción de la célula hospedera, lo que permite al virus expresar sus propias proteínas a partir de los diferentes genes virales. El gen E1 es el de mayor tamaño en el genoma de VPH, posee alrededor de 2.000 pb y se caracteriza por ser altamente conservado [32]. La proteína codificada tiene un peso molecular entre 67 y 76 KDa y su función en la infección por VPH es funcionar como una enzima helicasa dependiente de ATP, en el origen de replicación viral [32]. Otra proteína importante en el ciclo replicativo del virus es E2. Esta proteína tiene un peso molecular de 45 KDa y desempeña un papel crucial en la transcripción viral, ya que tiene un dominio de unión a ADN y uno de transactivación, lo cual permite que E2 funcione como factor de transcripción [33]. Específicamente, E2 se une a sitios específicos llamados "E2 binding sites" (E2BSs) ubicados en la LCR viral. La unión de E2 a E2BSs proximales al promotor temprano de VPH se traduce en represión transcripcional [33]. Cuando el genoma viral se integra al genoma de la célula hospedera ocurre la ruptura de la secuencia del gen E2, lo que se traduce en la sobreexpresión de los oncogenes virales E6 y E7 [34, 35]. Otra proteína viral que regula el ciclo replicativo de VPH es E5, expresada a partir de una secuencia que posee entre 230 y 250 pb [36]. Esta proteína puede ser considerada

una oncoproteína, aunque diversos estudios han demostrado que la presencia de E5 no es esencial en la progresión tumoral mediada por VPH [37]. Sin embargo, E5 adquiere gran importancia en la evasión de la respuesta inmune y en la actividad de ciertos receptores de factores de crecimiento como EGFR [38]. La oncoproteína E6, por otra parte, tiene un peso molecular de 16 a 18 KDa e interactúa con la proteína p53, regulándola negativamente [39]. La oncoproteína E7, la cual tiene un peso molecular de 10 KDa, juega un papel fundamental en el ciclo de vida del virus ya que es necesaria para la respuesta mitogénica y la mantención de los genomas episomales [40]. La proteína L1 se encarga de conformar el 80% de la cápside viral [41] y la proteína L2 forma parte minoritaria de dicha cápside. Ambas proteínas estructurales tienen un rol fundamental en la formación del virión [42].

2.4. Epidemiología de la infección y cáncer

Los VPH-AR son un agente etiológico importante en el desarrollo de cáncer cérvico uterino (CaCu), tumores anogenitales y de cabeza y cuello [43, 44]. Múltiples estudios detectan VPH en biopsias de distintos tipos de tumores, pero el CaCu marca la diferencia con alrededor de un 100% de presencia del virus [43, 45]. Por otra parte, los carcinomas anales presentan un 90% de positividad para VPH y los carcinomas de vulva, pene y tumores de cabeza y cuello exhiben menos del 50% de presencia del virus [44]. Los genotipos VPH16 y 18 son responsables del 70% de los casos de CaCu, aunque VPH16 es el tipo viral más frecuente en tumores extragenitales asociados etiológicamente a la infección por éste virus [46].

2.5. Mecanismos de oncogénesis mediados por VPH

La mera infección por VPH no es condición suficiente para el desarrollo neoplásico ya que otros factores cooperan con el virus para favorecer y promover el desarrollo tumoral [47]. Sin embargo, las señales moleculares relacionadas con el desarrollo tumoral asociado a VPH, se relacionan con la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-AR [48-50]. Un evento importante, aunque no imprescindible, involucrado en la sobreexpresión de estas oncoproteínas, es la integración del genoma viral al genoma del hospedero [43]. Esta acción de ruptura del genoma viral frecuentemente

ocurre en el gen codificante para E2 (represor transcripcional de E6 y E7) lo cual se traduce en la pérdida de función de ésta proteína viral en la célula hospedera, permitiendo la sobreexpresión de los oncogenes virales [51, 52]. La proteína viral E6 actúa bloqueando la apoptosis por medio de la degradación del supresor de tumores p53 uniéndose con una ubiquitina ligasa de asociación a la proteína E6 (E6-AP). La proteína E6-AP actúa como la ubiquitina ligasa Mdm2 que induce la degradación de p53 en una célula normal [53]. El mecanismo supresor de tumores de la proteína p53 es activado cuando se produce algún daño en el ADN, permitiéndole funcionar como factor de transcripción, lo cual favorece la expresión de p21 y genes pro-apoptóticos. La proteína p21 actúa como un inhibidor de quinasas dependientes de ciclina y se encarga de regular el ciclo celular, deteniéndolo en G1 [54]. Además, E6 es capaz de inducir la activación de telomerasa, la cual, al ser regulada positivamente, permite la inmortalización celular [55]. Otros mecanismos de oncogénesis mediados por E6 se describen en la **Figura 4**.

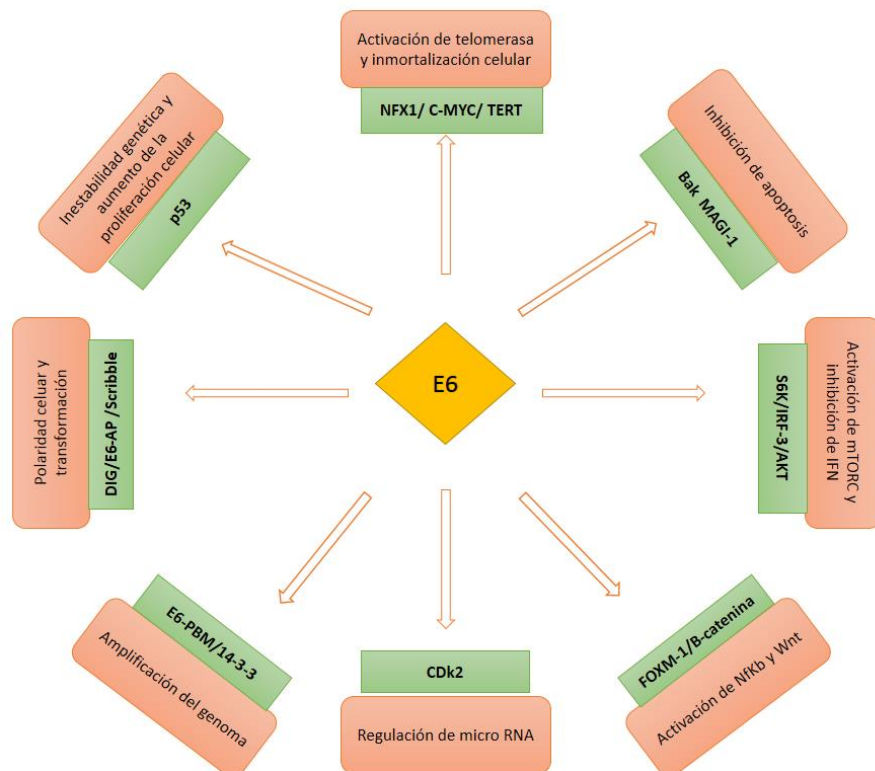


Figura 4. Mecanismos de oncogénesis de E6. Adaptado de [56].

La oncoproteína E7 induce la degradación de la proteína del retinoblastoma pRb, lo cual permite la liberación del factor de transcripción E2F [57]. La familia de pRb controla la transición de G1-S mediante la regulación de E2F [58] y tiene participación en algunas actividades como reparación del ADN y la mantención de la integridad genómica. Por otra parte, la oncoproteína E7, contribuye a la inmortalización celular mediante su interacción con proteínas que controlan el ciclo celular, tales como p21 y p27, que están involucradas en la detención del ciclo celular durante la diferenciación del epitelio. E7 interactúa además con las llamadas “proteínas de bolsillo” como p107 y p130, las cuales regulan el ciclo celular positivamente uniéndose a E2F4 y E2F5, respectivamente. La unión de E7 a dichas proteínas, permite la progresión del ciclo celular en la célula hospedera [59]. Otros mecanismos de oncogénesis mediados por E7 se describen en la **Figura 5**.

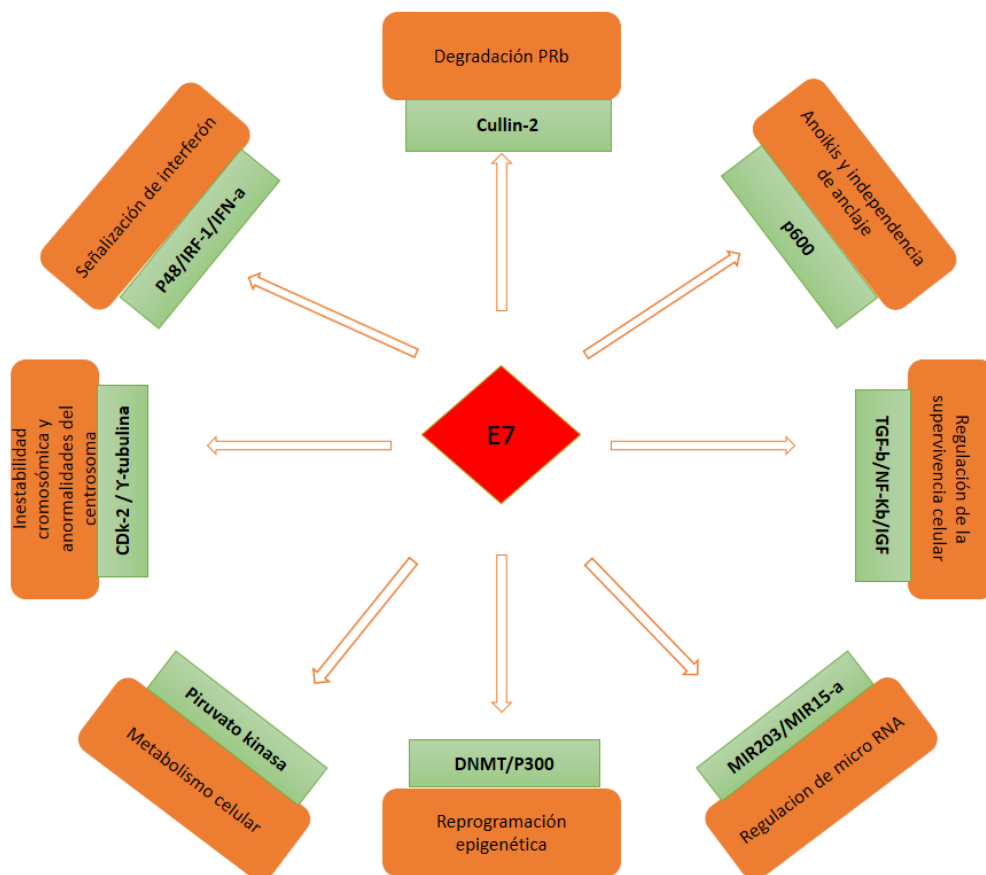


Figura 5. Mecanismos de oncogénesis de E7. Adaptado de [56].

Como se describe anteriormente, E6 y E7 de VPH-AR participan en desarrollo tumoral a través de múltiples mecanismos. Sin embargo, una pequeña proporción de estudios involucran a estas oncoproteínas con migración, invasión o transición epitelio-mesénquima (TEM), procesos relacionados a progresión tumoral [60-64]. Con respecto a la oncoproteína E7, datos previos dan cuenta de regulación de la migración a través de p27 kip1 (p27). En efecto, E7 induce el secuestro citoplasmático de p27 favoreciendo su efecto inhibitorio sobre RhoA (GTPasa pequeña que tiene la capacidad de organizar el citoesqueleto). Además, se ha demostrado que E7 puede regular la señalización de la vía PI3K/AKT1, lo cual favorece la agresividad tumoral en queratinocitos de prepucio [60]. Otros estudios dan cuenta que E7 puede regular la expresión de factores angiogénicos como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) e IL8 a través de una regulación independiente de pRb [61]. Todos los cambios fenotípicos relacionados a la progresión tumoral están asociados a cambios en la señalización celular. En ese sentido, se ha reportado que E6 y E7 están involucradas en progresión tumoral a través de promover cambios en vías de señalización como WNT/Catenina, HIPPO/YAP, EGFR/MAPK, entre otras [62-64]. Una de las señalizaciones que favorece la progresión tumoral es la vía del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), la cual está involucrada en diferentes procesos como TEM, migración e invasión. Sin embargo, no está clara la participación de VPH en la regulación de esta vía. El hallazgo de interacciones entre NF- κ B y las oncoproteínas de VPH representa la oportunidad para el hallazgo de nuevas herramientas terapéuticas, diagnósticas o pronósticas de cáncer oral asociado a esta infección viral.

2.6. VPH y Cáncer Oral

El VPH16 es el genotipo viral más prevalente en cáncer cervico-uterino y en los cánceres de cabeza y cuello, especialmente los de la orofaringe que incluyen amígdalas y base de lengua [65]. En Chile, se ha demostrado que VPH está presente en un 11% (especialmente VPH16) de carcinomas escamosos orales [66]. Un aspecto poco estudiado es como el VPH está involucrado en la progresión del cáncer oral. Más aún, existen limitados estudios respecto de aspectos moleculares relacionados con la progresión tumoral promovida por VPH en este tipo de cáncer. Por esta razón, es de

importancia estudiar los mecanismos que están involucrados en la metástasis de tumores VPH positivos.

2.7. PIR/NF- κ B en la progresión tumoral del cáncer oral y su relación con VPH

La vía NF- κ B, está compuesta por homo o heterodímeros de las proteínas pertenecientes a la familia NF- κ B y una proteína de la familia REL, dentro de las cuales se incluyen p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (REL A), REL B y c-REL [67]. La vía NF- κ B es reconocida por su acción clave en procesos de inflamación y cáncer [68, 69]. Además, está relacionada con un conjunto de aspectos de la progresión tumoral, entre ellos la migración celular [68]. Reportes anteriores muestran que NF- κ B está desregulado en cánceres de cabeza y cuello [70], aunque específicamente en cáncer oral, se ha observado activación de ésta vía y subsecuente translocación nuclear del complejo p65/P50 [71].

Los datos que vinculan a VPH con NF- κ B son contradictorios puesto que no se sabe con certeza si la vía es finalmente activa o inactiva en presencia de los oncogenes virales. Con respecto a lo anterior, los datos contradictorios pueden deberse al estudio en particular de efectores puntuales dentro de la vía NF- κ B. En ese sentido Harvar et al. demostraron activación diferencial de NF- κ B, demostrando que E7 regula los niveles totales de C-Rel y que E6 regula a p65 (Rel-A) en queratinocitos cervicales [72]. Sin embargo, los mecanismos por los cuales se activa NF- κ B son muy diversos y existen múltiples proteínas colaboradoras en esta señalización. Específicamente, la proteína Pirin, perteneciente a la superfamilia de las cupinas, producto del oncogén PIR, tiene estrecha relación con la regulación de NF- κ B y es activada bajo condiciones de estrés oxidativo (EO). En efecto, se ha reportado que esta proteína está regulada positivamente en tumores asociados a exposición al humo de cigarrillo, un fuerte inductor de EO [73]. Pirin facilita sustancialmente la unión de NF- κ B/p65 al ADN [74]. Ciertos estudios han usado modelos celulares de cáncer de cuello uterino VPH positivo para estudiar las funciones de Pirin, pero no lo relacionan con la presencia del virus [75, 76]. Previamente, en nuestro laboratorio se demostró que el oncogén PIR está regulado positivamente por E6 y E7 de VPH16 en células tumorales y no tumorales que expresan ectópicamente estas oncoproteínas [77]. Además, datos previos de nuestro Laboratorio

sugieren que E7 de VPH16 es relevante en promover un incremento en los niveles de Pirin. Por otro lado, se observó que esta regulación es dependiente de la activación del receptor de crecimiento epidermal (EGFR) en células orales [77].

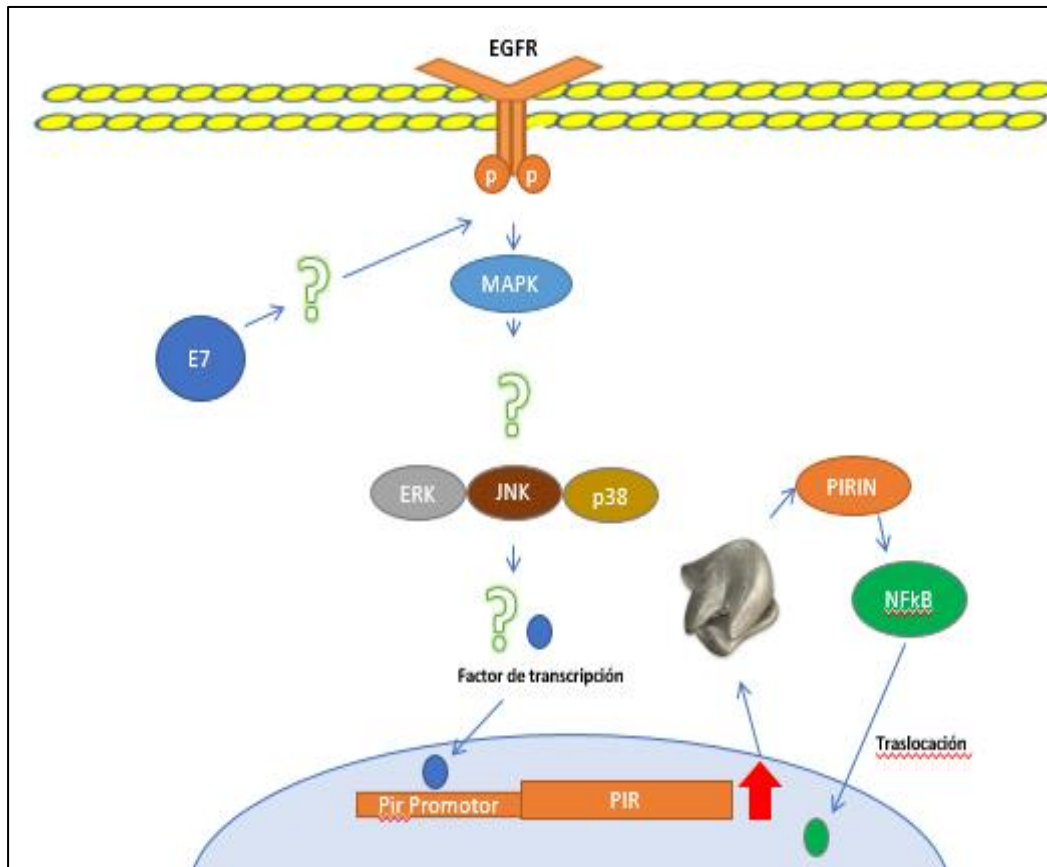


Figura 6. Modelo de la hipótesis. La oncoproteína E7 de VPH16 promueve la activación de la vía PIR/NF- κ B a través de la señalización EGFR/MAPK-PI3K en células orales humanas.

VI. Hipótesis

La oncoproteína E7 de VPH16 promueve la activación de la vía PIR/NF- κ B a través de la señalización EGFR/MAPK-PI3K en células orales humanas.

VII. Objetivos

Objetivo general

Analizar la activación de PIR/NF- κ B por la oncoproteína E7 de VPH16 y mediada por la vía de señalización EGFR/MAPK-PI3K en células orales humanas.

Objetivos específicos

- I. Evaluar la activación de la vía PIR/NF- κ B por la oncoproteína E7 de VPH16 en células orales humanas.
- II. Evaluar la activación de la vía EGFR/MAPK-PI3K por la oncoproteína E7 de VPH16 en células orales humanas.
- III. Asociar la vía EGFR/MAPK-PI3K activada por la oncoproteína E7 de VPH16 con la activación de la vía PIR/NF- κ B en cultivos primarios orales humanos.

VIII. Materiales y Metodos

1. Líneas celulares y cultivo celular

La línea celular SCC143 (tumoral de piso de boca) se obtuvo de la Universidad de Pittsburgh [78]. Las células de empaquetamiento de retrovirus PA317 (CRL-9078™) se obtuvieron directamente de ATCC®. La línea celular OKF6-TERT2 (no tumoral de piso de boca) y los queratinocitos primarios de prepucio humano (PHK) fueron donados por la Dra. Luisa Lina Villa (Instituto del Cáncer del Estado de São Paulo, São Paulo (SP), Brasil). Las células se incubaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco, Carlsbad, CA, EE. UU.) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Hyclone, Fremont, CA, EE. UU.) con antibióticos (100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina) y se mantuvieron a 37°C con 5% de atmósfera de CO₂. Para el subcultivo, las células se incubaron con tripsina durante 3-5 min y se mantuvieron con un nuevo medio que contenía 10% de SFB (Hyclone, Fremont, CA, EE. UU.).

2. Transducción

Para las transducciones celulares, los vectores recombinantes pLXSN y pLXSNHPV16E7 fueron donados por el Dr. Massimo Tommasino, de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), Lyon, Francia. Se obtuvieron partículas retrovirales de células de empaquetamiento PA317 previamente transfectadas con plásmidos pLXSN o pLXSNHPV16E7 durante 24 h a 37°C en una atmósfera que contiene 5% de CO₂ con lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células SCC143 fueron transducidas con partículas retrovirales y luego se seleccionaron con 0,3 mg/mL de Geneticina (GIBCO, Carlsbad, CA, EE. UU.).

3. Ensayo de viabilidad

Se cultivaron 4.000 células por pocillo en una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos con medio DMEM 1X con 10% de SFB y se trataron con Geneticina 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 y 1 mg/mL (GIBCO, Carlsbad, CA, EE. UU.) durante 7 días. Finalmente, se agregaron 20 µL de MTS (Promega Corporation, Madison, EE. UU.) a cada pocillo, la placa se incubó durante 3 h a 37°C y se midió la absorbancia a 492 nm utilizando un lector de microplacas (Biotek Instruments, Inc.).

4. Cultivos organotípicos

Para los cultivos organotípicos se utilizaron las células OKF6-TERT2 o PHK. Para generar el cultivo 3D, se sembraron las células en 800 μ L de equivalentes dérmicos de colágeno tipo I el cual se prepara a base de fibroblastos AM12 (fibroblastos de ratón) en pasajes tempranos y colágeno tipo I de Rata (Gibco, Carlsbad, CA, EE. UU). Luego sobre las camas de colágeno se sembraron los queratinocitos correspondientes. El medio de cultivo para RAFT se preparó con DMEM: F12 (3: 1) (Gibco, Carlsbad, CA, EE. UU.) suplementado con suero fetal bovino 10% (Hyclone, Fremont, CA, EE. UU), hidrocortisona (0,4 mg/ml), toxina del cólera 0,01 nM, transferrina (5 mg/ml) (Sigma) y factor de crecimiento epidérmico humano o de ratón (5ng/mL) (Clonéticos; GIBCO-BRL). Las camas de colágeno fueron posicionadas en grillas de acero inoxidable de 2 cm x 2 cm en placas de 6 cm. Finalmente los cultivos fueron cosechados después 14 días, fijados en formol tamponado al 4% y embebidos en parafina para su posterior análisis.

5. Extracción y cuantificación de proteínas

La extracción de proteínas de los cultivos analizados se realizó por lisis celular y posterior separación de la fracción proteica. Para esto, se agregó 500-700 μ L de solución de lisis RIPA1X (Abcam) e inhibidores de proteasa y fosfatasa 1X (Complete Mini, Roche) se añadieron a cada placa celular y se recogieron usando un raspador de células. Luego el lisado fue transferido a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y centrifugado a 14.000 rpm a 4 ° C durante 15 min. Finalmente, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y las muestras se almacenaron a -80°C. La concentración de proteínas se determinó utilizando el método Pierce BSA (Pierce, Rockford, IL, USA). Para la cuantificación de proteínas se preparó una curva estándar a partir de soluciones de albúmina de suero bovino (BSA) (Pierce, Rockford, IL, USA) de concentraciones conocidas de 2; 1,5; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 y 0,125 mg/mL. Se distribuyeron 200 μ L/pocillo de la solución Pierce (Pierce, Rockford, IL, USA) en placas de 96 pocillos y se agregaron 10 μ L de las soluciones BSA de concentraciones conocidas y de los extractos de proteínas de interés. La placa se incubó durante 30 min a 37° C y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

6. Western blot

Los extractos de proteína se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de 10% o 12% utilizando cámara de electroforesis mini-Protean II (Bio-Rad). Para la preparación de 5 mL del gel de separación de acrilamida al 10%, se usó 1,97 mL de H₂O Milli-Q, 1,25 mL de tampón inferior (Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,4%), 1,65 mL de acrilamida-bisacrilamida (29: 1) 30%, 100 µL de persulfato de amonio al 10% (APS) y 1,5 µL de TEMED (Sigma-Aldrich). Se aplicó un gel de apilamiento o concentrador al 4% a la porción superior del gel de separación, que consiste en: 3,6 mL de H₂O Milli-Q, 625 µL de tampón superior (Tris-HCl 1,0 M pH 6,8, SDS 0,4%), 665 µL de acrilamida-bisacrilamida (29: 1) 30%, 100 µL de APS al 10% y 1,5 µL de TEMED para un volumen final de 5 mL.

Las muestras se prepararon depositando entre 5 a 30 µg de proteína en tampón de carga de proteínas 6X (Tris-HCl 240 mM pH 6,8, SDS al 0,8%, β-mercaptoetanol 200 mM, glicerol al 40% y azul de bromofenol 0,02%) e incubando a 95°C durante 5 min. Luego, las muestras se aplicaron al gel y se sometieron a electroforesis a 80-100 V en tampón de corrida 1X (glicina 192 mM, Tris 25 mM, SDS al 0,1%). Finalmente, las proteínas se transfirieron a una membrana Hybond-P ECL (Amersham, Piscataway, NJ, EE. UU.) utilizando Tris 20 mM, glicina 150 mM, pH 8,3, en metanol al 20% mediante un equipo de transferencia semiseca (Bio-Rad, California, EE. UU.). Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (albúmina de suero bovino al 5%, solución salina tamponada con Tris-Tween 20 al 0,5%, pH 7,6) y se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo primario contra Pirin (ab51360), pRb (ab24), EGFR (ab32562), EGFR^{Y1173} (ab32578), EGFR^{Y1068} (ab40815), p65^{S536} (ab86299), β-actina (ab6276) (Abcam, Cambridge, Reino Unido), C-Rel (MAB2699), p65^{S529} (MAB7624) (R&D System, Minnesota, EE. UU.), HPV16 E7 (SC6981), pAKT1-2-3 (SC514032), PHOSPHO AKT^{S473} (4060S), NRF2 (4060S) (Cell Signaling, Danver, EE. UU.), ERK (SC514302), pERK (SC136521), AREG (SC5797), pMTORC (SC293133), MTORC (SC517464), Histone H3 (SC56616), GSK3 (SC7291), p65 (SC8008), (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EE. UU.) Diluido 1/1000 en solución salina Tris-buffer- Tween 20 (TBS - T20). Las membranas se lavaron tres veces en TBS-T20 y se incubaron con

peroxidasa secundaria marcada con anti-IgG (Anti-Mouse 554002; BD Pharmingen; BD Biosciences y Anti Rabbit SC2004; Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Después de tres lavados en TBS-T20, la detección se realizó mediante el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfon, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

7. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las células transducidas fueron contadas por conteo de exclusión usando Azul de Tripán 0,4%. Se sembraron 5×10^4 células en cada portaobjetos de 20 mm previamente tratados con polilisina 0,5%, se lavaron dos veces con 1X PBS (pH 7,4), se secaron e incubaron durante 5 min con paraformaldehído frío (PFA). A continuación, las células se incubaron con 3% de seroalbúmina bovina (BSA) durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de incubación con un anticuerpo primario monoclonal diluido en PBS 1X (1:50), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fijadas se lavaron tres veces durante 5 min a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con FITC o un anticuerpo anti-IgG marcado con Texas Red (1: 100) (Santa Cruz biotechnology, Dallas, EE. UU.). Después de tres lavados con 1X PBS, las células se incubaron durante 15 min con Rhodamina falloidina/DAPI o solo DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, EE. UU.), según el anticuerpo secundario usado y finalmente se visualizaron en un microscopio confocal C2 Plus (Nikon, Tokio, Japón).

8. PCR en tiempo real

El ARN de las líneas celulares se aisló usando el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la purificación con cloroformo y precipitación con isopropanol, el ARN se suspendió en agua libre de nucleasas y se almacenó a -80°C . A continuación, el ARN se trató con RQ1 ADNasa (Promega, Madison, EE. UU.) con incubación a 37°C durante 60 min y luego se incubó con la solución de detención de ADNasa RQ1 durante 10 min. El ADNc se preparó usando un volumen de reacción de 20 μL que contiene ARN tratado con ADNasa (2 μg), inhibidor de ARNasa 1 U (Promega, Madison, EE. UU.), partidores aleatorios (Random

Primers) 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Promega, Madison, EE. UU.), dNTPs 2 mM (Promega, Madison, EE. UU.) y transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina 10 U Moloney (MMLV) (Promega, Madison, EE. UU.). La mezcla de reacción se incubó durante 1 h a 37°C. El ADNc se sometió a amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real usando partidores específicos para transcritos (Tabla 1) en un equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Las condiciones de amplificación fueron: 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s, alineamiento a 55°C durante 20 s y extensión a 72°C durante 20 s. La curva de disociación se llevó a cabo aumentando la temperatura de 70 a 90°C con 0,5°C en cada paso. La reacción se realizó usando SYBR Green Master Mix 2X (Bioline, Londres, Reino Unido), cebadores 0.4 μM , 10,5 μL de agua libre de ARNasa y 1 μL de ADNc en un volumen final de 25 μL . Los partidores específicos y las condiciones de amplificación se ajustaron para cada secuencia de ARN. El número relativo de copias de cada muestra se calculó mediante el método 2 $(-\Delta\Delta\text{C}(\text{T}))$ utilizando el software Rotor-Gene. Los niveles endógenos del ARN mensajero de β -actina se utilizaron para la normalización de la expresión de ARN. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

9. NF- κ B y Phospho MAPK array

Las células SCC143 se cultivaron hasta 90% de confluencia en placas de 10 cm, sometidas a depleción de suero durante 24 h. Las células se suspendieron en tampón de lisis de extracción contenido en cada Kit y se incubaron durante 20 min a 4°C. La concentración de proteína se determinó mediante el kit de ensayo de proteína BCA Pierce (Pierce, Rockford, IL, EE. UU.), usando 300 μg de proteína para cada condición. La detección de las diferentes proteínas en los lisados celulares se realizó mediante el uso de un array para evaluar niveles de proteínas de la vía NF- κ B humana (Proteome Profiler (R&D Systems, Minnesota, EE. UU.) y un array para evaluar activación de las vías MAPK/Pi3K (Proteome Profiler (R&D Systems, Minnesota, EE. UU.). Para la detección, se usó sustrato de peroxidasa de rábano picante (Millipore Corporation, EE. UU.). La exposición de las membranas se realizó en el sistema de imágenes ChemiDoc (Bio-Rad, California, EE. UU.). Para el análisis posterior semicuantitativo, se utilizó el software ImageJ versión 1.52a (National Institutes of Health, Maryland, EE. UU.). El dato

densitométrico de cada una de las marcas fue normalizado contra las marcas control ubicadas en los extremos de las matrices de ruta con posición exacta A1; A2 y A23; A24. Luego el gráfico fue construido con base en las veces de cambio con respecto a cada marca normalizada de la matriz correspondiente a las proteínas de las células SCC143 V. Los datos normalizados obtenidos de los extractos proteicos de las células SCC143 V fueron ajustados a un valor de 1.

10. Ensayos de reportero de Luciferasa y ensayos de activación de NF- κ B

El constructo pmir-GLO/PIR, el cual contiene el promotor PIR río abajo respecto del gen indicador de luciferasa y los mutantes fueron adquiridos en GeneScript Biotech Company. Para el desarrollo de las secuencias se utilizó el software editor de plásmidos ApE-A (M. Wayne Davis). Como base para cada construcción se utilizó un sistema reportero utilizando el vector de expresión pmiR-GLO (Promega, Madison, EE. UU.). El promotor PGK nativo se eliminó mediante digestión con BglII y ApaI y la región promotora PIR sintetizada (900 pb entre 4430 y 5329 en el cromosoma X) por GeneScript, se insertó río arriba del gen indicador de luciferasa de luciérnaga (*luc2*) se describe en la **figura 7**. La actividad de luciferasa de renilla se usó para normalizar la actividad de luciferasa de luciérnaga. El pHAGE NF- κ B-TA-LUC-UBC-GFP-W se adquirió del depositante Addgene (Darrell Kotton Lab) y se describe en la **figura 8**. Las células SCC143 se sembraron por triplicado en una placa de 24 pocillos a una confluencia del 70-80% y se transfectaron con 500 ng de plásmido indicador de luciferasa pmir-GLO o pHAGE con 2 μ L de lipofectamina 2000 (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EE. UU.) por pocillo. El medio de cultivo fue reemplazado por medio Opti-MEM sin suero. Después de 18 h de incubación, la mezcla de transfección se reemplazó por medio de cultivo completo durante 24 h. Las células se enjuagaron en PBS 1X y se cosecharon con tampón de lisis pasivo en un tubo nuevo sobre hielo. La actividad de luciferasa se midió utilizando el sistema de ensayo de indicador dual Luciferase® (Promega, Madison, EE. UU.), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para el ensayo de activación de NF- κ B, la placa de cultivo se dividió para medir la intensidad de fluorescencia del normalizador indicado por la proteína fluorescente verde (GFP) en un citómetro de flujo FACSCantoA.

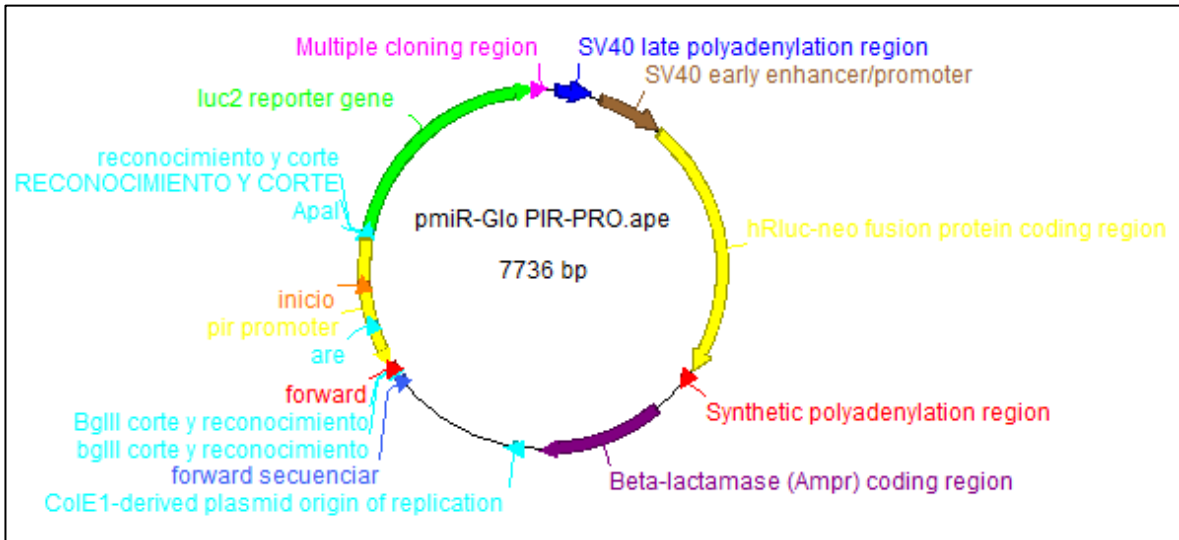


Figura 7: Vector pmiR-GLO PIR-PRO. Mapa del vector el cual contiene luciferasa y rio arriba el promotor y la región reguladora de PIR. Como normalizador de la actividad de luciferasa tiene renilla luciferasa y rio arriba tiene el promotor de SV40.

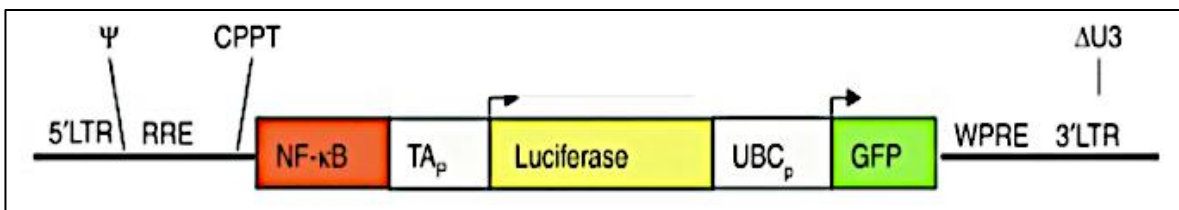


Figura 8: Vector pHAGE NF- κ B-TA-LUC-UBC-GFP-W. El vector contiene luciferasa y rio arriba el promotor mínimo de timidina quinasa de SV40 (TA_p) con una región reguladora que contiene cuatro sitios de unión de factores NF- κ B. Como normalizador de la actividad de luciferasa tiene la proteína fluorescente verde (GFP) y rio arriba tiene el promotor constitutivo de ubiquitina C (UBC_p).

11. Ensayos de inhibición farmacológica

Para los experimentos de inhibición, células SCC143 o cultivos organotípicos fueron depletados de suero durante 24 h y luego se incubaron con el respectivo inhibidor farmacológico, Gefitinib 100 μ M (inhibidor de EGFR) (Sigma, St Louis, EE. UU.), UO126 6,3 μ M (inhibidor de ERK) (Sigma, St Luis, EE. UU.) y LY294002 10 μ M (inhibidor de PI3K) (Sigma, St Luis, EE. UU.) durante 24 h o el tiempo definido para cada experimento.

Luego, las células se lavaron dos veces con PBS 1X (pH 7,4), se secaron y se lisaron con tampón RIPA 1X (Abcam, Cambridge, Reino Unido) que contenía cóctel de proteasa e inhibidor de fosfatasa (Roche, Basilea, Suiza).

12. Ensayos con ARN interferentes

Se sembraron 4×10^5 células SCC143 en placas de 6 cm. Posteriormente, las células fueron sometidas a depleción de suero durante 24 h. Los ARN de interferencia pequeños (ARNip) que se usaron fueron los de E7 de VPH16 y PIR (Santa Cruz biotechnology, Dallas, EE. UU.). Para cada ensayo se usó como control un ARNip de secuencia aleatoria (scrambled o SCR) (Ambion®). Las concentraciones usadas para cada interferencia fueron de 16 nM de ARNip. Para la transfección se usó lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, los tiempos de evaluación de la interferencia variaron entre las 24 y 48 h. Luego de la transfección, las células fueron cosechadas para los ensayos subsecuentes.

13. Inmunoprecipitación de Cromatina

Las células SCC143 transfectadas de manera estable con pLXSN y pLXSNE7 se cultivaron en placas de 10 cm hasta alcanzar una confluencia del 80%. Las células se incubaron con formaldehído al 1% a temperatura ambiente para provocar el crosslinking de ADN-proteína. Las células tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO) se incluyeron como control. Después de 2 min de incubación, se añadió glicina 0,4 M para detener la reacción. A continuación, las células tratadas se lisaron con un raspador y se cosecharon por centrifugación a 8.000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. Luego, se retiraron los sobrenadantes y los sedimentos se lavaron dos veces en tampón Triton X-100 (Tris 50 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 0,1%; NP-40 0,1%; SDS 0,01%) y se sometieron a tres pulsos de sonicación (1 min/pulso). Posteriormente, el volumen de cromatina sonicada se ajustó a 4 mL con tampón Triton - SDS 0,1% y luego, se eliminó por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min. La cromatina se almacenó en partes alícuotas de 800 μ L a -80° C. La inmunoprecipitación de NRF2, Pol II, c-Jun^{S73} y c-Fos^{T232} unida a la cromatina se realizó utilizando una mezcla compuesta por 80 μ L de inmunoglobulina G prebloqueada (IgG), perlas magnéticas, un

volumen igual de cromatina disuelto en tampón Triton y 3 μ L de anticuerpo específico. Antes de la inmunoprecipitación con perlas de IgG, el 10% de cada muestra se guardó como fracción control. La mezcla se incubó durante la noche a 4 ° C con un agitador rotatorio. Al día siguiente, las esferas se granularon por centrifugación a 12,000 RPM durante 1 min y 500 μ L de sobrenadante se lavaron cuatro veces en 400 μ L de tampón Triton y una vez con tampón PBS pH 7.4. Las suspensiones líquidas se transfirieron a tubos nuevos y los inmunocomplejos se incubaron durante toda la noche a 85°C en 125 μ L de tampón de elución (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, SDS al 1%, DTT al 2,5%). El ADN libre se purificó de la solución mediante extracción con fenol-cloroformo. Después de la precipitación mediante la adición de acetato de sodio 3 M y etanol frío, el ADN se lavó en etanol al 70% y se secó durante 20 min usando un sistema de rotación Speedvac. Finalmente, el ADN purificado se suspendió en 12 μ L de tampón TE (Tris-Cl 10 mM; EDTA 1 mM) para análisis de PCR. Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando el sistema RotorGene 6000 con una denaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C y 2 min a 72°C y luego 1 ciclo de 4 min a 72°C para la elongación final. Para el análisis mediante qPCR se utilizaron partidores que abarcan los elementos de respuesta antioxidante (ARE) (Tabla1).

Región	F 5'-3'	R 5'-3'	Amplicon(bp)
PIR	TCAAATTGGACCCAGGA GCC	TCCAAGCACTGCTGTGTG AT	131
E7 HPV16	CAATATTGTAATGGGCT CTGTCC	ATTTGCAACCAGAGACA ACTGAT	120
ARE CHIP	GTGAGCATCTCTTCCCG GCA	TGACCGCCAGCATTCCCT CA	347
β -actin	AGCGAGCATCCCCAAA G	GGGCACGAAGGCTCATC A	289

Tabla 1: Secuencia de los partidores utilizados.

14. Ensayo de migración celular

Para el ensayo de migración tridimensional, el lado inferior de una cámara transwell (Corning, Nueva York, EE. UU.) se revistió con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fibronectina y se incubó durante la noche a 4°C. Se sembraron un total de 15.000 células SCC143 en medio no suplementado dentro de la cámara superior, y se añadieron 500 μL de medio completo a la placa. Se permitió que las células migraran durante 7 h y luego se fijaron y tiñeron con solución de cristal violeta/metanol 0,5%. Las células que no migraron se eliminaron con un algodón de algodón. Las células migradas se contaron en ocho campos para cada experimento con el objetivo 40X. El conteo y la lectura de las migraciones fueron analizadas por observadores independientes y de manera ciega.

15. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos y la elaboración de gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism V.6 (GraphPad Software Inc.). La comparación de medias entre dos grupos se realizó mediante una prueba de Mann Whitney, mientras que las comparaciones entre múltiples grupos se realizaron mediante ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Tukey. Un valor de p menor o igual a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

IX. Resultados

Objetivo específico 1:

Evaluar la activación de la vía PIR/NF- κ B por la oncoproteína E7 de VPH16 en células orales humanas.

Racional: Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que la proteína Pirin, un sensor de estrés oxidativo y activador de NF- κ B [74], es regulada positivamente por las oncoproteínas E6 y E7 de VPH16 en algunos modelos celulares [79]. Sin embargo, el mayor incremento en los niveles de Pirin ocurrió solo en presencia de la oncoproteína E7. No se conoce el mecanismo mediante el cual la oncoproteína E7 promueve un incremento de los niveles de Pirin y subsecuente activación de NF- κ B. Por otro lado, la activación o inhibición de esta vía mediada por VPH y las oncoproteínas virales, muestra datos previos contradictorios [80, 81]. Esta tesis propuso que la oncoproteína E7 de VPH16 promueve la activación de la vía NF- κ B a través de promover un incremento en los niveles de la proteína Pirin [74].

Resultados:

Las células SCC143 (tumores de piso de boca) fueron transducidas con los vectores pLXSNE7 de VPH16 o pLXSN vacío, y posteriormente expuestas al medio de selección conteniendo 0,3 mg/mL de geneticina (**Fig 9**). El pool de colonias formadas y recolectadas para cada situación experimental fue denominado SCC143/E7 y SSC143/V (control). A continuación, se evaluó los niveles de transcritos y proteína E7 a través de RT-PCR y Western Blot (WB), respectivamente. Se observó la presencia de transcritos y proteína E7 de VPH16 solo en las células SCC143/E7 (**Fig 10A**). Además, se realizó inmunofluorescencia indirecta (IFI) para evaluar si la población de células transducidas con E7 expresaban esta oncoproteína viral. Mediante esta técnica se confirmó que solo las células SCC143/E7 expresaban E7 (**Fig 10B**). Posteriormente, se evaluó la actividad biológica de la oncoproteína E7 mediante el análisis de cambios en los niveles de la proteína del retinoblastoma (pRb) y de Pirin. En efecto, se observó una disminución significativa de los niveles de pRb y un aumento significativo de la proteína Pirin (**Fig**

10C). Además, se observó un incremento de transcritos de PIR en células SCC143/E7 en relación con células SCC143/V (**Fig 10D**) y mediante IFI para la proteína Pirin se observó que en células SCC143/E7 hay un aumento en la fluorescencia con respecto de células SCC143/V (**Fig 10E**). Seguidamente, se realizó un ensayo de pérdida de función a través del uso de ARNip para E7, previamente chequeado en su funcionalidad (**Fig 11A**), para analizar los niveles de Pirin mediante IFI. Se observó una disminución estadísticamente significativa de Pirin con respecto al control ARNip de secuencia aleatoria (SCR), en células SCC143/E7 (**Fig 11B**). En resumen, los datos obtenidos sugieren que E7 de VPH16 induce un incremento de los transcritos de PIR y consecuentemente un aumento en los niveles de la proteína Pirin en células tumorales orales.

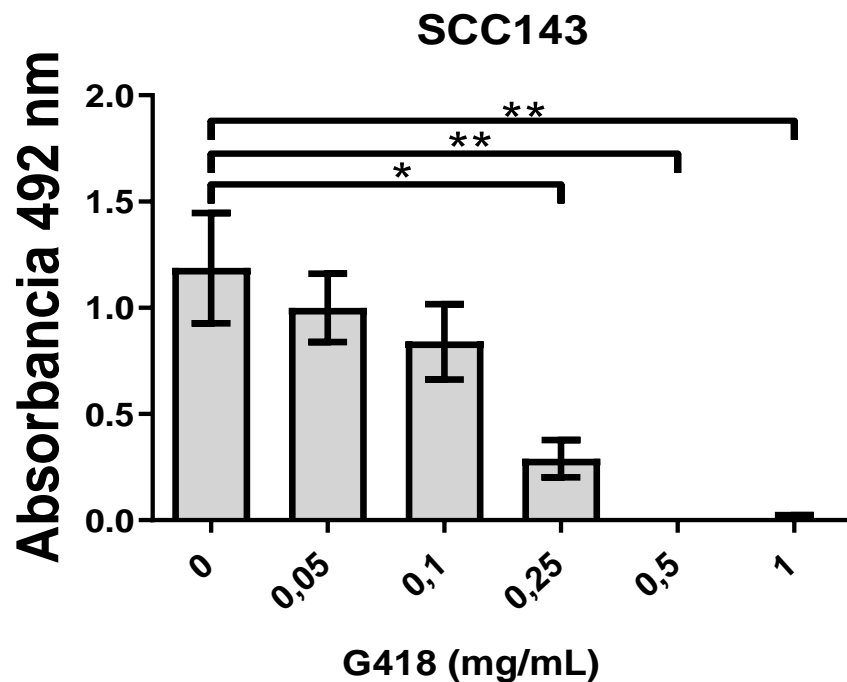


Figura 9. Efecto de geneticina (G418) sobre la viabilidad celular. Células SCC143 fueron expuestas a distintas concentraciones de G418. Su viabilidad fue medida mediante MTS a los 7 días de tratamiento. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. * $p<0.05$ and ** $p<0.01$.

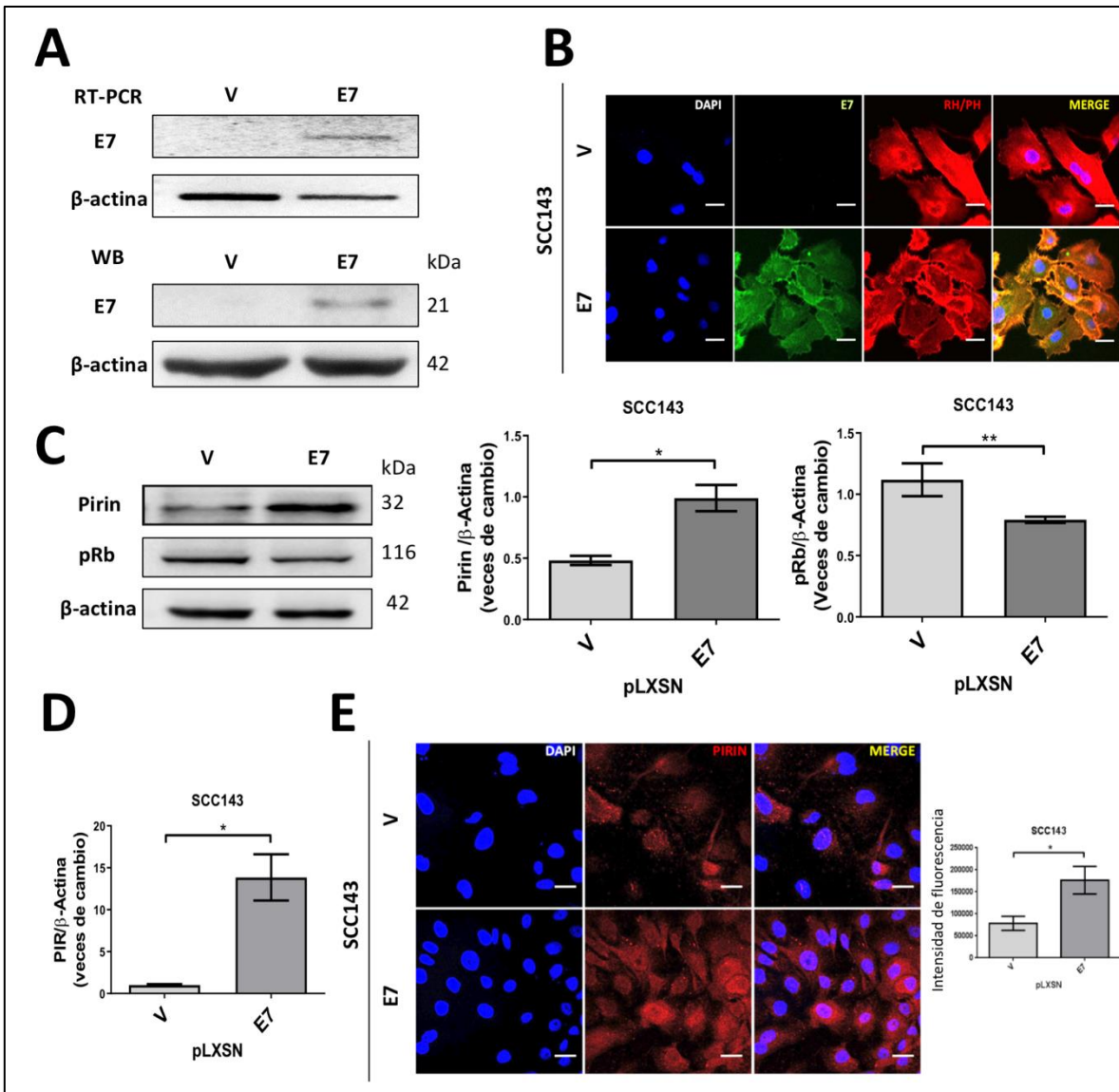


Figura 10. La expresión de E7 de VPH16 regula positivamente los transcritos y los niveles de proteína de PIR. (A) RT-PCR y WB fueron realizados para comprobar los transcritos y niveles de proteína de E7 y β -actina, respectivamente. (B) Inmunofluorescencia indirecta (IFI) revela la expresión de E7 en células SCC143/E7 y no en células SCC143/V. (C) WB para evaluar los niveles de proteína Pirin y pRb en las células SCC143/E7 y SCC143/V usando β -actina como control de carga. Los gráficos representan análisis densitométricos de tres WB independientes para cada proteína normalizados contra β -actina. (D) RT-qPCR fueron realizados para el transcrito de PIR normalizado contra el transcrito de β -actina. (E) IFI revela el aumento de Pirin en células SCC143/E7 el grafico representa el análisis de la fluorescencia. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Rodamina faloidina (Rh/Ph). Escala de la barra 10 μ m.

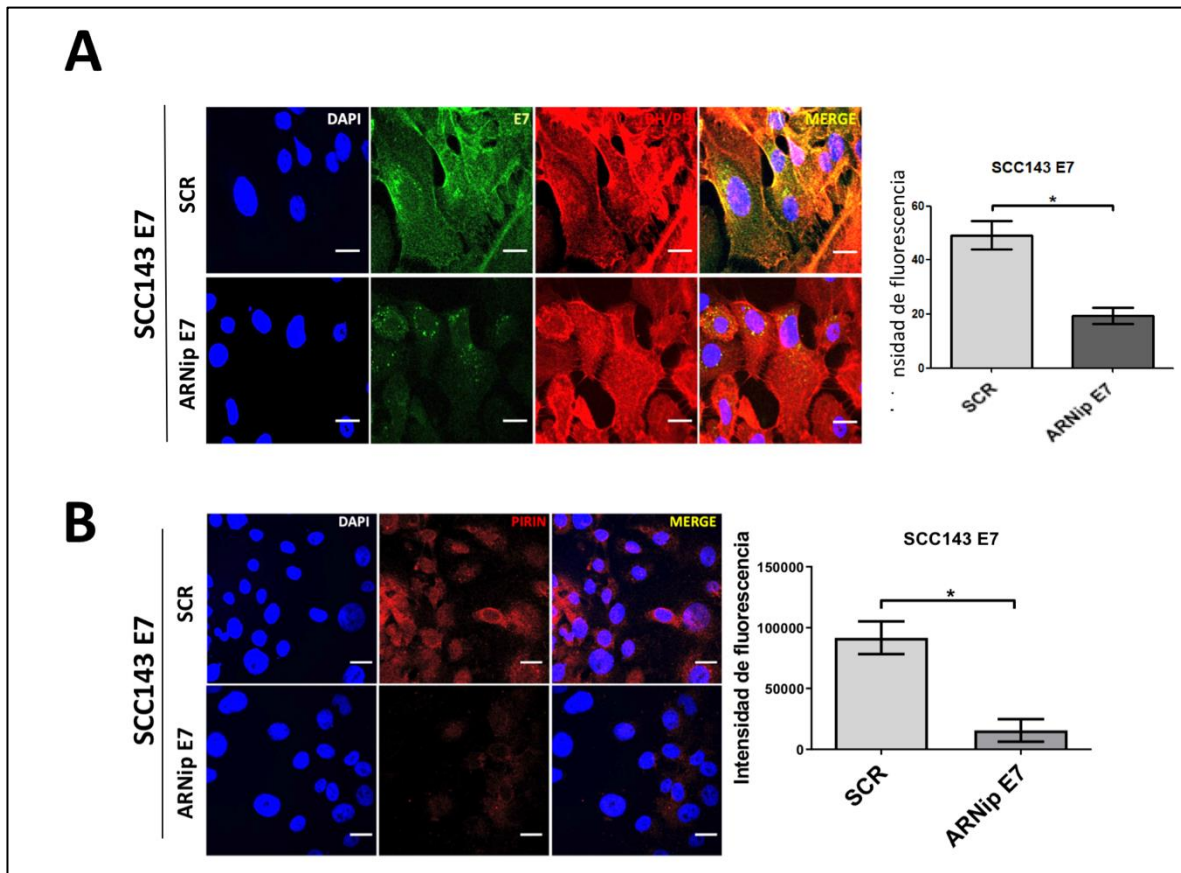


Figura 11. Ensayo de interferencia de E7 de VPH16 analizando los niveles de Pirin. (A) IFI para detectar la proteína E7 en células SCC143/E7 previamente transfectadas con ARNip de secuencia aleatoria (SCR) y ARNip E7. (B) IFI para detectar la proteína Pirin en células SCC143/E7 previamente transfectadas con ARNip de secuencia aleatoria (SCR) y ARNip E7. A la derecha se observa el gráfico de intensidad de fluorescencia. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$. Rodamina faloidina (Rh/Ph). Escala de la barra 5 μm para (A) 10 μm para (B).

Para evaluar si la regulación de la expresión del gen PIR mediada por E7 de VPH16 es dependiente de su activación transcripcional, se realizó la construcción del vector pmir-GLO Dual Luc con el promotor de PIR río arriba del marco de lectura abierto de LUC2 (luciferasa), el cual fue denominado pmir-GLO/pPIR. En los ensayos de luciferasa, se observó que células SCC143/E7 tienen mayor actividad que células SCC143/V, demostrando que E7 de VPH16 está involucrada en la activación transcripcional del oncogén PIR (**Fig 12A**). A través de ensayos de co-transfección con el vector pmir-

GLO/pPIR y ARN de interferencia de E7 (ARNip E7), se determinó que E7 es relevante en promover la transcripción de PIR, ya que en presencia del interferente de E7 se observa una disminución significativa en la actividad de luciferasa (**Fig 12B**). Para determinar cuáles son los factores de transcripción relevantes en la activación del promotor de PIR, que es mediada por E7, se realizaron en primera instancia, cuatro mutantes de sitios de unión a factores de transcripción que están relacionadas a la actividad del promotor de PIR. Lo anterior fue realizado con mutaciones puntuales en los sitios de unión a factores de transcripción relevantes en la actividad del promotor de PIR [75] y fueron diseñadas mediante el programa PROMO 3.0 (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3). Las mutantes previamente mencionadas fueron realizadas sobre los sitios de unión a E2F1 y los elementos de respuesta antioxidante (ARE) como se muestra en la **Figura 12C**. Se observó que la mutante relevante en promover activación significativa del promotor en presencia de E7, es el sitio ARE, donde se une el factor transcripción NRF2 (**Fig 12C**). Seguidamente, mediante IFI se analizaron los niveles de NRF2 en células SCC143/V y SCC143/E7, en las cuales se observó un aumento de esta proteína en el citoplasma y en el núcleo de las células que expresan E7 (**Fig 13A**). Finalmente, y con el fin de establecer puntualmente que el factor NRF2 es el responsable en el aumento de la actividad del promotor de PIR, se realizó un ensayo de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP). Para realizar el ensayo ChIP, se tuvo especial consideración en analizar las proteínas c-Jun y c-Fos, componentes del factor de transcripción AP1, puesto que existe un sitio de unión de elementos de respuesta a ésteres de forbol (TRE) muy cercano al sitio ARE. En ese sentido, los resultados del ensayo ChIP muestran que el reclutamiento de NRF2 y ARN polimerasa II en el promotor de PIR en presencia de E7, se incrementa aproximadamente 3,5 veces respecto del control. Los resultados observados con c-Jun y c-Fos (unión a sitio TRE) indican que E7 no regula positivamente su reclutamiento en el promotor de PIR (**Fig 13B**). Tomados en conjunto, los datos obtenidos sugieren que E7 induce la activación transcripcional del promotor de PIR mediado por la unión del factor de transcripción NRF2.

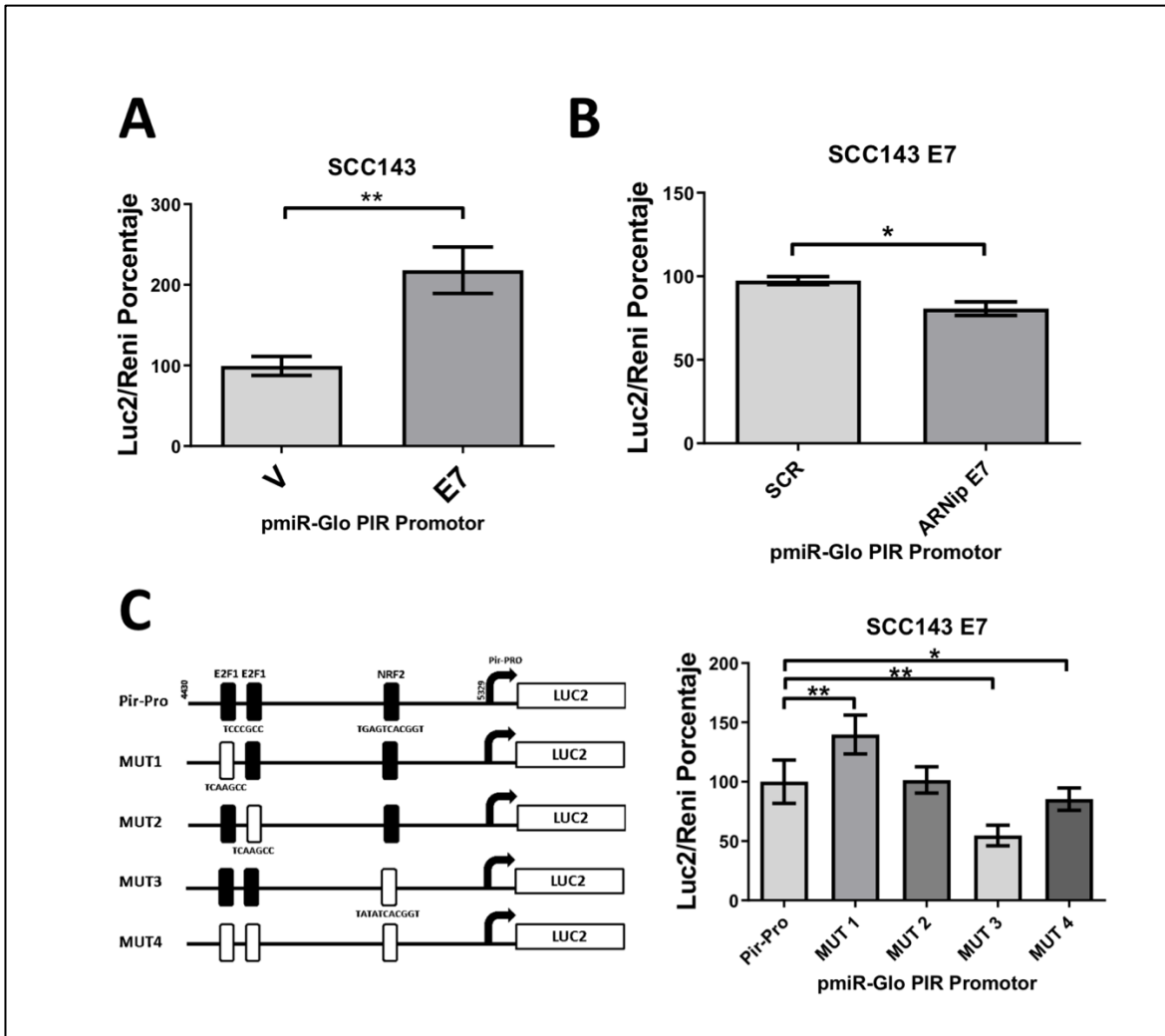


Figura 12. La proteína E7 de VPH16 regula la actividad del promotor de PIR. (A) La actividad de luciferasa se midió en las células SCC143/V y SCC143/E7 previamente transfectadas con el vector pmiR-GLO PIR-PRO por 18 h. (B) La actividad de luciferasa se midió en las células SCC143/E7 previamente co-transfectadas con el Interferente control (SCR) o ARNip E7 más el vector pmiR-GLO PIR-PRO por 18 h. En ambos casos se midió la actividad de Renilla como normalizador. (C) En la parte derecha se pueden observar los vectores con las diferentes mutaciones en el promotor de PIR, MUT1 sitio de unión a E2F1 distante, MUT2 sitio de unión a E2F1 proximal, MUT3 sitio de unión a NRF2 y MUT4 incluye las tres mutantes anteriores. El grafico muestra la actividad de cada promotor midiendo la actividad de luciferasa en células SCC143/E7. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

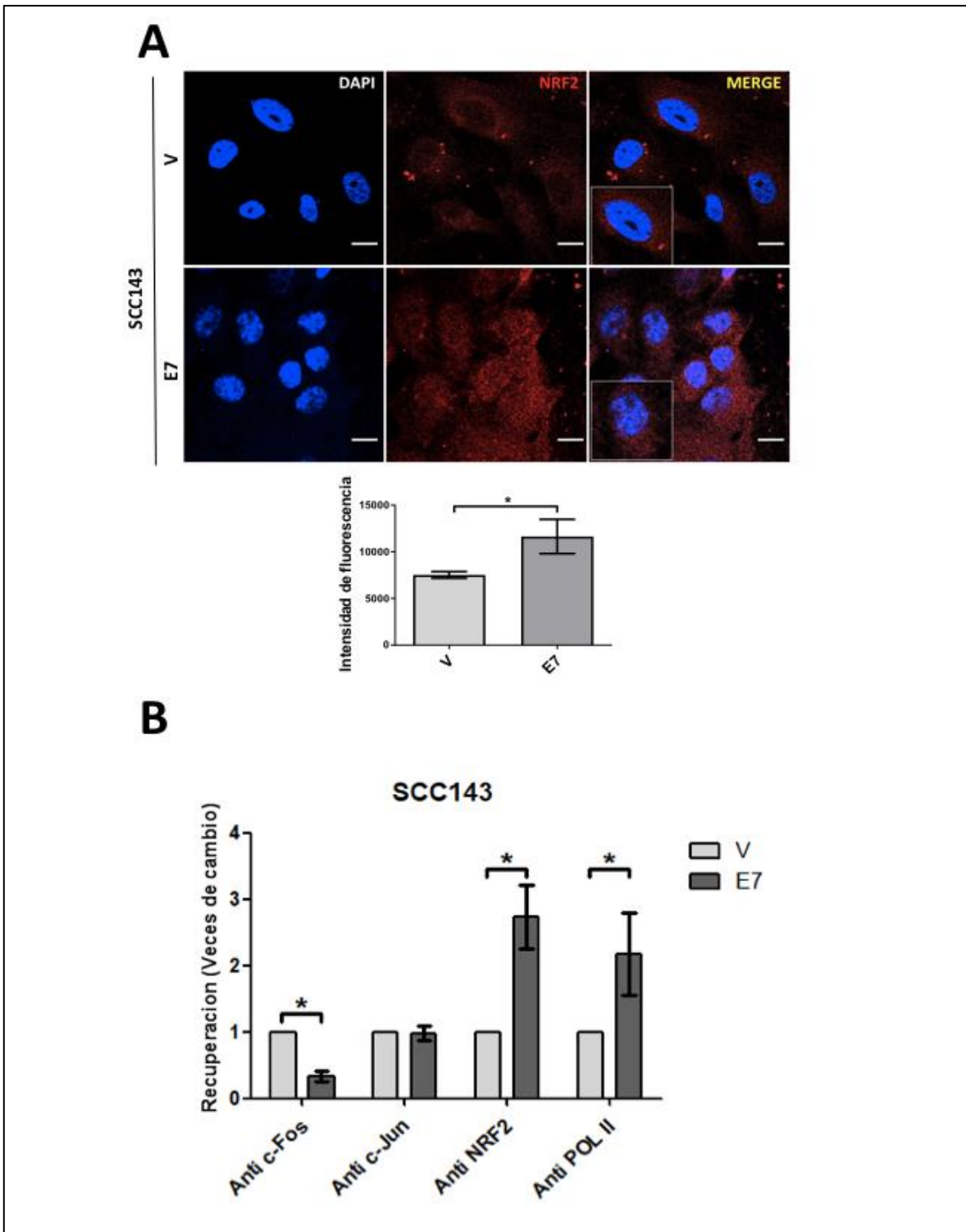


Figura 13. NRF2 es regulado positivamente y reclutado en el promotor de PIR con E7 de VPH16. (A) IFI revela el aumento de NRF2 en células SCC143/E7 el grafico representa el análisis de la fluorescencia. (B) Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Los datos son representativos de 3 experimentos independientes * $p < 0,05$. Escala de la barra 5 μm .

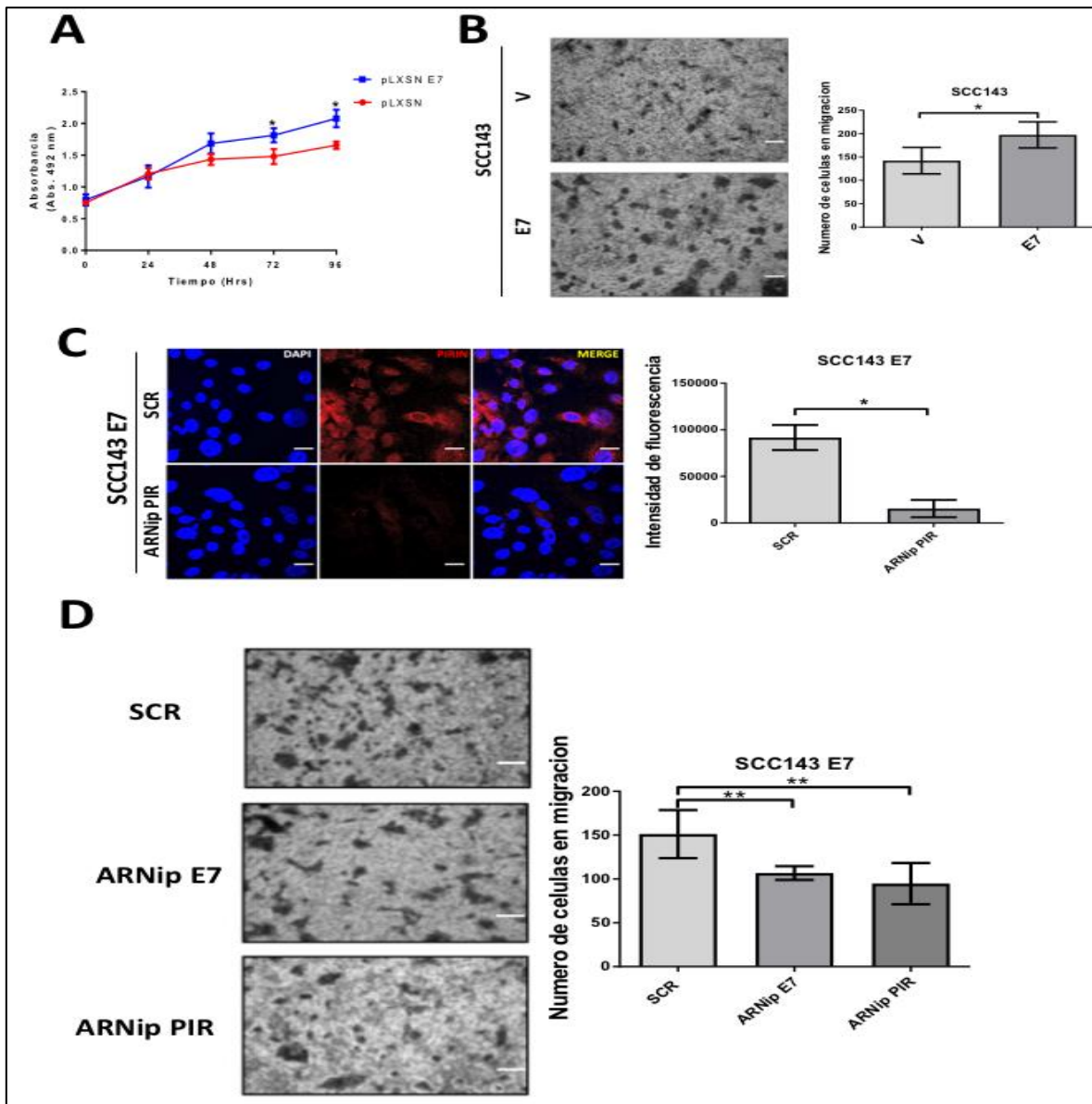


Figura 14. La expresión de E7 de VPH16 induce cambios fenotípicos en células orales. (A) Ensayo de viabilidad usando MTS en células SCC143/E7 y SCC143/V desde 0 a 96 h post-siembr. (B) Ensayo de migración durante 7 h mediante transwells previamente tratados con fibronectina. (C) IFI para detectar la proteína Pirin en las células SCC143/E7 previamente transfectadas con ARNip de secuencia aleatoria (SCR) y ARNip PIR a la derecha se observa el grafico de la intensidad de fluorescencia. (D) Migración de células SCC143/E7 previamente co-transfectadas con el Interferente control (SCR), ARNip E7 y ARNip PIR. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Escala de la barra 5 μ m.

Por otra parte, se evaluaron cambios fenotípicos asociados a la presencia de E7 de VPH16 en células orales SCC143. Los ensayos mediante MTS mostraron diferencias significativas en la viabilidad de las células SCC143/E7 a 72 y 96 h, en comparación al control (**Fig 14A**). Estos resultados demuestran que E7 es capaz de incrementar la viabilidad de las células tumorales orales. Para determinar los cambios relacionados con las capacidades migratorias de las células, se realizó el ensayo de migración en transwells. Mediante este ensayo se observó que las células SCC143/E7 tienen mayor capacidad migratoria que las células SCC143/V (**Fig 14B**). Para determinar el rol desempeñado por E7 y PIR en la migración de las células tumorales orales, se realizó el ensayo de migración en células SCC143/E7 previamente transfectadas con interferentes de E7 o PIR (**Fig 14D**). Para demostrar la funcionalidad del interferente de PIR se evaluaron los niveles de Pirin mediante IFI, en presencia de los respectivos ARN interferentes (**Fig 14C**). Mediante el uso de ARNip para E7 y PIR se observó una disminución estadísticamente significativa de células migratorias con respecto al control ARNip de secuencia aleatoria (SCR), en células SCC143/E7. Estos resultados sugieren que E7 y PIR tienen relevancia en la regulación de las capacidades migratorias de células SSC143.

Para evaluar la activación de la vía NF- κ B, se diseñó el vector pHAGE/NF- κ B (reportero de la actividad de NF- κ B), el cual fue transfectado en células SCC143/E7 y SCC143/V. Se observó un aumento significativo en la actividad de luciferasa (normalizada contra GFP) en las células SCC143/E7 respecto del control (**Fig 15A**). Estos resultados sugieren que la oncoproteína E7 de VPH16, regula positivamente la vía NF- κ B. Para evaluar el rol de E7 y de Pirin en la activación de NF- κ B, se realizaron ensayos de luciferasa co-transfectando células SCC143/E7 con pHAGE y un ARN de interferencia (ARNip) para E7, ARNip para PIR o un control aleatorio (Scr). Se observó que la activación inducida por E7 disminuye de forma similar en presencia de los ARNip E7 y ARNip PIR, demostrando que E7 y PIR promueven activación de NF- κ B en células orales (**Fig 15B**). Además, para evaluar niveles de proteínas relevantes de la vía NF- κ B que pueden ser reguladas por E7 de VPH16, se realizó un ensayo proteómico mediante el array de proteínas *Proteome Profiler Human NF- κ B Pathway Array RYD* (**Fig 16A**). Se

observó que, en presencia de E7, se incrementan los niveles de proteínas relacionadas a NF- κ B en comparación al control. Específicamente, las proteínas IRF5, IRF8, p-P55^{S529}, C-REL (proteína relacionada con activación) e I κ B (proteína de auto regulación NF- κ B) presentaban una mayor regulación positiva y las proteínas IL-18 Ra, NF- κ B2 y CD40 presentaban una mayor regulación negativa (Fig 17A).

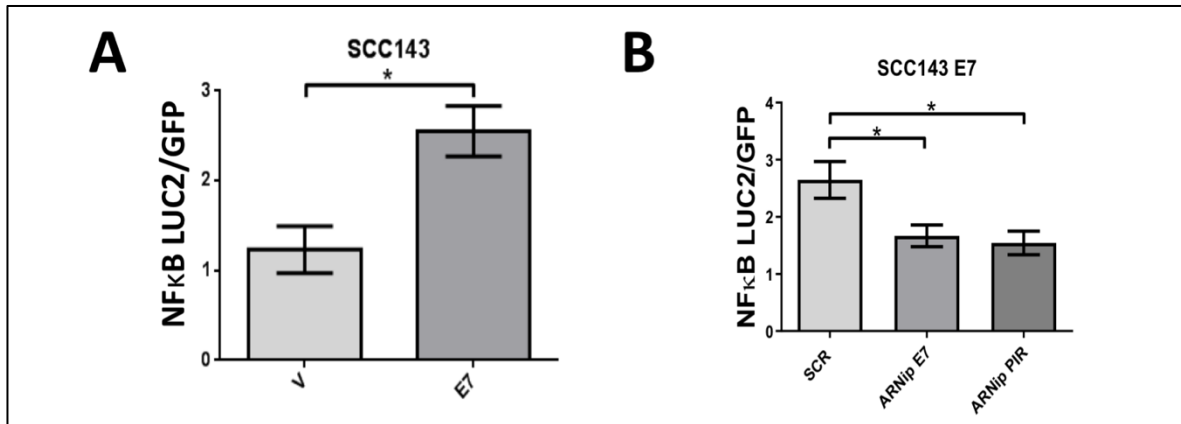


Figura 15. La proteína E7 de VPH16 induce la activación de NF- κ B en células tumorales orales. (A) La actividad de luciferasa normalizada con GFP se evaluó en células SCC143/E7 y SCC143/V transfectadas con el vector reportero pHAGE/NF- κ B. (B) Actividad de luciferasa normalizada con GFP en células SCC143/E7 cotransfectadas con pHAGE/NF- κ B y ARNip E7 o ARNip PIR. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes * p<0,05.

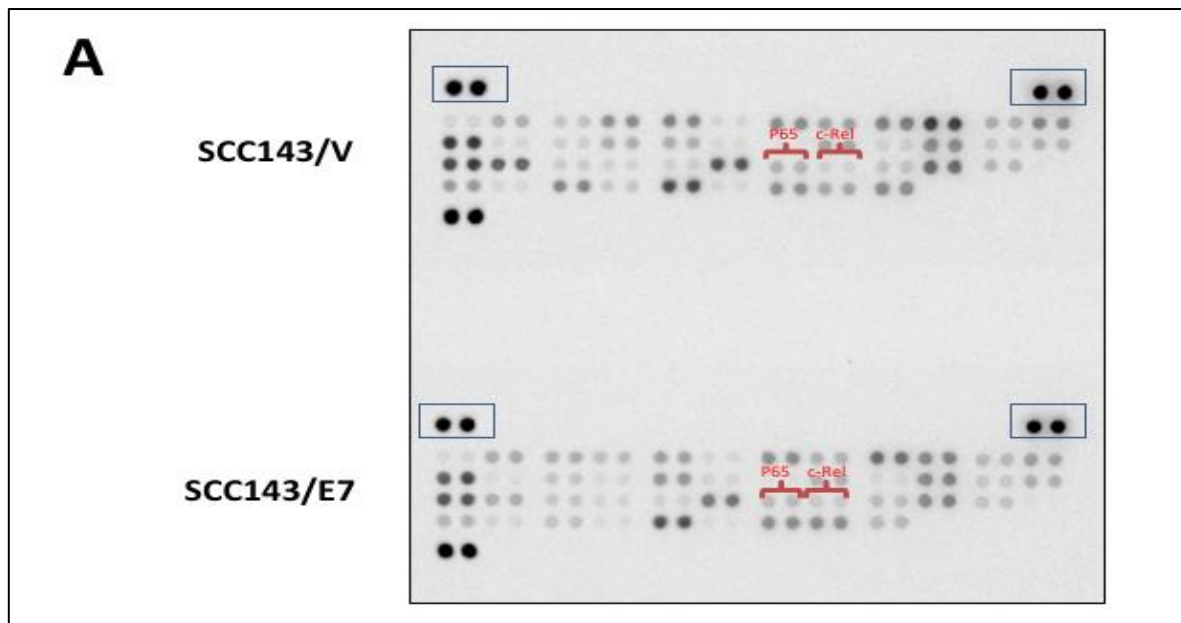


Figura 16. Membranas array NF- κ B. (A) Array NF- κ B en las condiciones V y E7 expuesto 250 segundos.

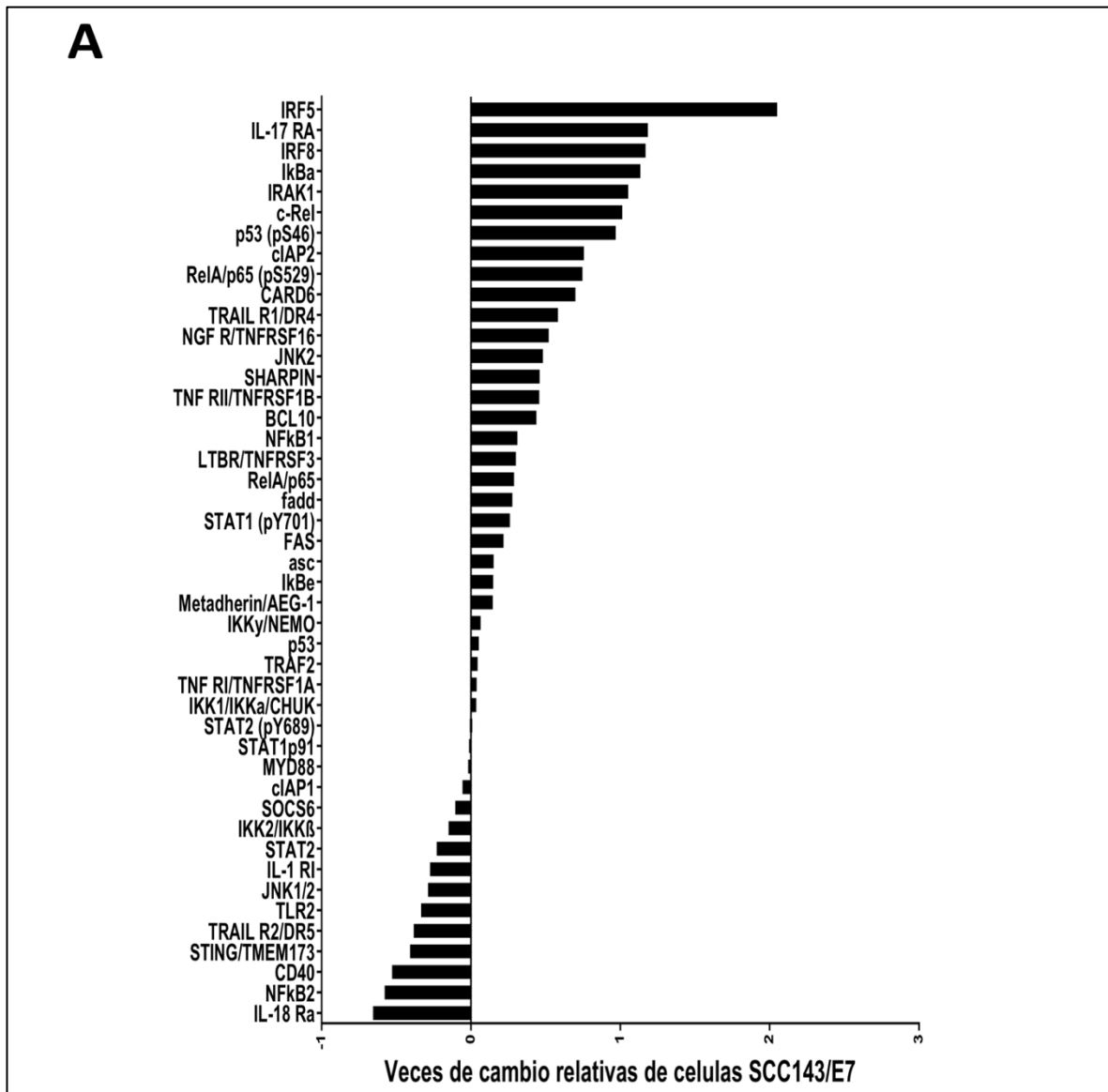


Figura 17. La expresión de E7 de VPH16 induce cambios en las proteínas de la vía NF-κB en las células orales. A) Gráficos de array de proteínas de la vía NF-κB comparando células SCC143/V y SCC143/E7. Los datos fueron graficados en referencia al cambio ocurrido en presencia de E7 comparadas al control con vector vacío.

Para caracterizar la activación de la vía NF-κB mediada por E7 de VPH16, se evaluaron los niveles de proteínas relevantes activadas en esta vía. En presencia de E7, se observó disminución de los niveles nucleares y citoplasmáticos de la proteína p65^{S536}. Lo anterior sugiere que la activación mediada por E7 no es mediada por p65^{S536} (**Fig 18A**). Finalmente, se observó un aumento significativo en los niveles nucleares de Pirin, C-Rel

y p65^{S529} en células SCC143/E7 (**Fig 18B**). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que E7 de VPH16 induce la activación de la vía NF- κ B a través de un mecanismo de señalización mediado por Pirin, C-REL y p65^{S529}.

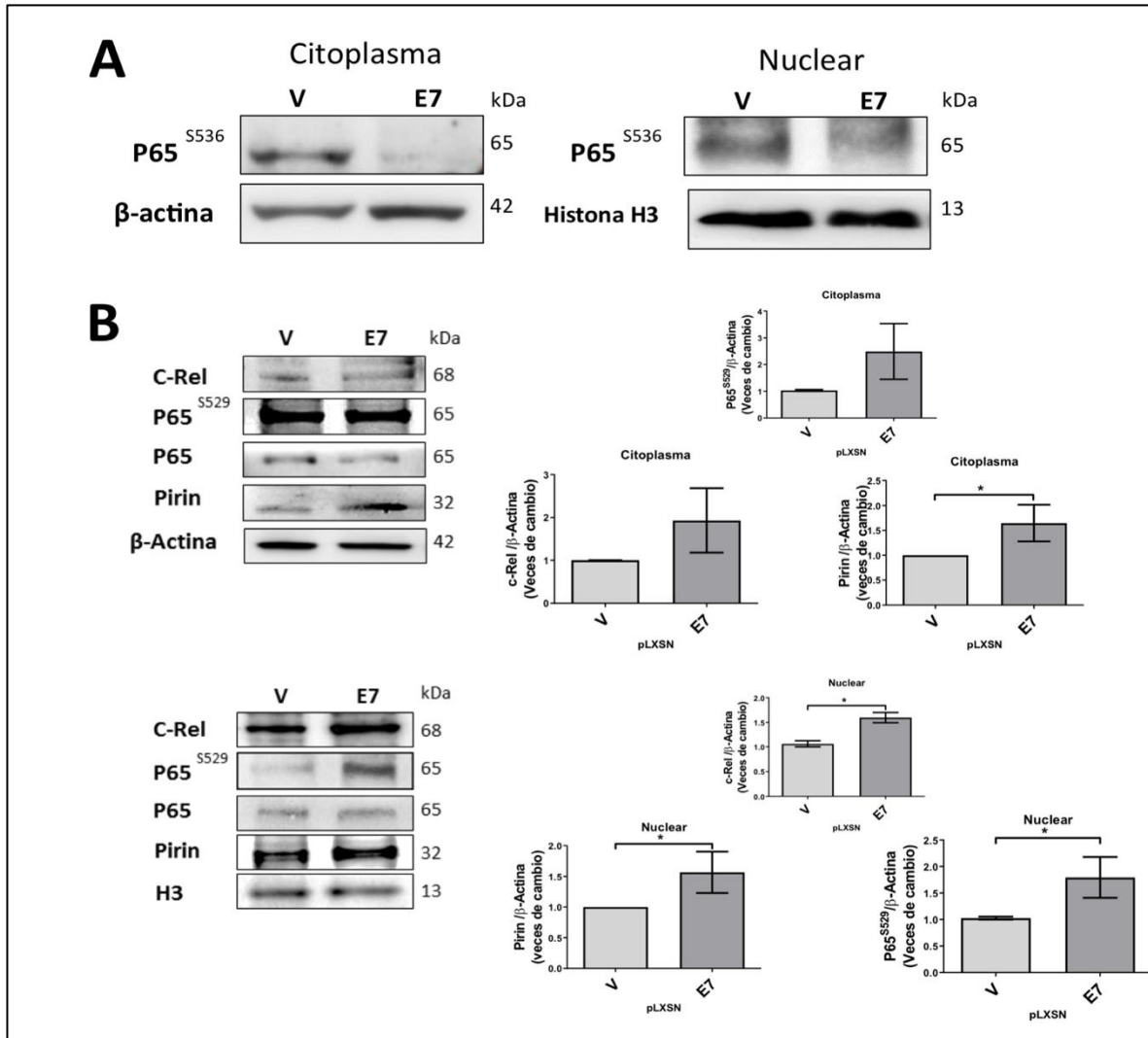


Figura 18. Los niveles de p65^{S529} y C-Rel aumentan en presencia de la proteína E7 de VPH16 en células tumorales orales. (A) WB de las fracciones nuclear y citoplasmática fueron realizados para comprobar los niveles de p65^{S536}, se usó como control de carga β -actina e Histona H3 en las fracciones nuclear y citoplasmática, respectivamente. (B) WB de las fracciones nuclear y citoplasmática fueron realizados para comprobar los niveles de Pirin, p65^{S529} y C-Rel, se usó β -actina como control de carga en células SCC143 transducidas con pLXSN Vacío o pLXSN E7. Los gráficos representan análisis densitométricos de tres WB independientes para cada proteína normalizado contra β -actina. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes * $p < 0,05$.

En resumen, la oncoproteína E7 de VPH16 es capaz de activar la vía PIR/NF- κ B en células orales humanas, en primer lugar, activando la transcripción de PIR por medio de NRF2, para aumentar significativamente los niveles de Pirin. Mediante el Array de la vía NF- κ B, se demostró que existen un gran número de proteínas relacionadas con la vía reguladas positivamente, en especial se observó un aumento de los factores de transcripción c-Rel y p65^{S529} dando cuenta de la regulación mediada por E7.

Objetivo específico 2:

Evaluar la activación de la vía EGFR/MAPK-PI3K por la oncoproteína E7 de VPH16 en células orales humanas.

Racional: En este objetivo se ha evaluado si la oncoproteína E7 induce aumento de los niveles de EGFR y su activación basal, promoviendo activación de las vías MAPKs y PI3K [82, 83]. Nuestro Laboratorio ha establecido previamente que la oncoproteína E7 de VPH16 regula positivamente PIR y que esto es mediado, al menos en parte, a través de la activación de EGFR [79]. Sin embargo, no se conoce la vía de señalización que permite la regulación de PIR mediada por E7.

Resultados:

Para el segundo objetivo se analizaron diferentes proteínas activadas en la vía de señalización EGFR/MAPK, potencialmente regulada por la oncoproteína E7 de VPH16. Se realizaron experimentos para evaluar niveles de EGFR fosforilado y total, en presencia de E7. Para la forma activa del receptor, se usó un anticuerpo específico contra el sitio de fosforilación tirosina 1173. Sobre la base de lo antes planteado, se observó que EGFR estaba regulado positivamente en presencia de E7 al igual que su forma activa EGFR^{Y1173} (**Fig 19A**). Sin embargo, dado que los niveles de EGFR total aumentaron en presencia de E7, no es posible determinar aún si hay un incremento real de EGFR^{Y1173}. Además, se evaluaron los niveles de la proteína anfiregulina (AREG), un ligando de alta afinidad por EGFR [63]. Mediante WB, se observa que los niveles de AREG están regulados positivamente en células SCC143/E7 (**Fig 19B**). No obstante, se requieren experimentos adicionales para determinar que E7 induce la activación de EGFR en células SCC143. Teniendo en consideración el incremento en los niveles de EGFR, se realizó un ensayo fosfoproteómico para evaluar activación de las vías MAPK y PI3K en presencia de E7 de VPH16 (*Proteome Profiler Human Phospho-MAPK Array kit RYD*) (**Fig 20A**). Se determinó que las proteínas fosforiladas reguladas positivamente en presencia de E7 de VPH16 son Akt1, P70, GSK3B, TOR, P38a, P38b, RSK3, p53, RSK2, CREB y GSK3A. En cuanto a las proteínas fosforiladas reguladas negativamente, se encontraron JNK, ERK y P38g (**Fig 21A**). Adicionalmente, mediante WB se analizaron

los niveles de proteínas involucradas en las vías MAPK y PI3K confirmando los datos obtenidos mediante el array de proteínas (**Fig 21B**). Los resultados obtenidos sugieren que la vía EGFR/PI3K/AKT es activada en presencia de E7 de VPH16 en células SSC143.

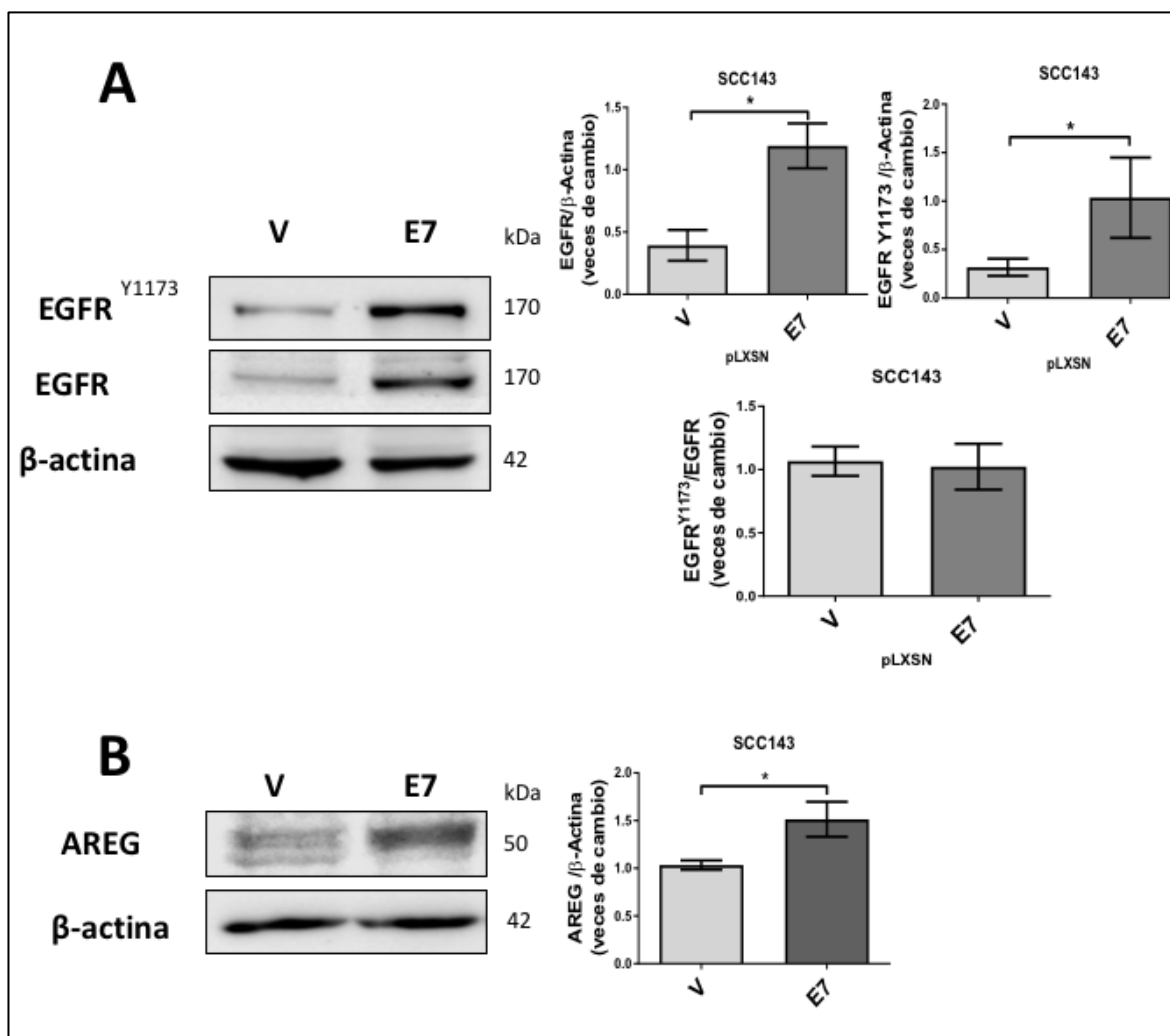


Figura 19. La expresión de E7 de VPH16 induce un incremento en los niveles de EGFR y activación de la vía PI3K/AKT en células orales. (A) WB realizado para comprobar los niveles de EGFR total, EGFR^{Y1173} y β -actina usado como control de carga en las células SSC143/E7 y SSC143/V. Los gráficos representan el análisis densitométrico de tres ensayos independientes para cada proteína normalizado mediante β -actina. (B) Niveles de la proteína AREG mediante WB. El gráfico representa los análisis densitométrico de tres WB independientes normalizado mediante β -actina. Los datos fueron graficados comparando los niveles de las fosfoproteínas en presencia de E7 y controles. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes * $p < 0,05$.

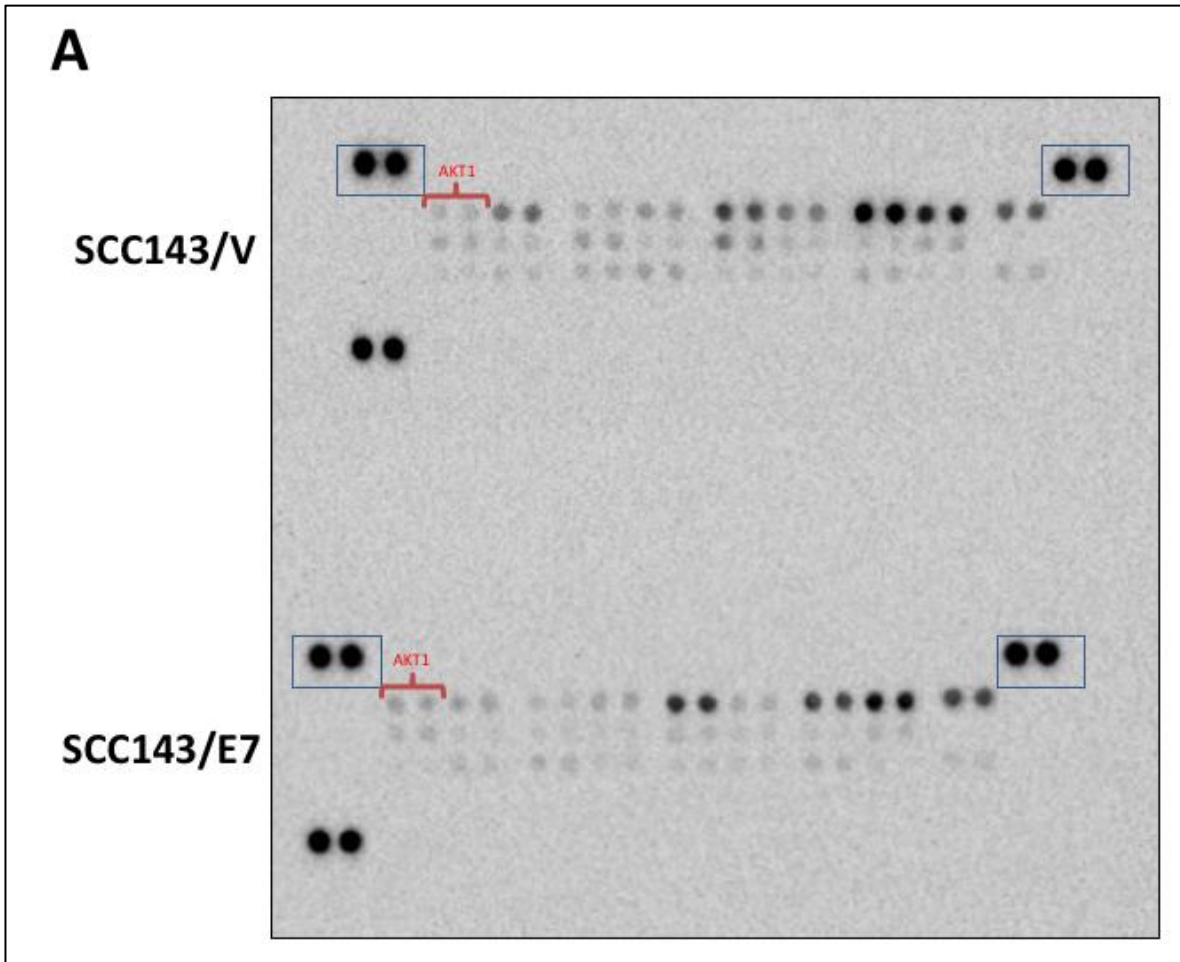


Figura 20. Membranas array MAPK/PI3K (A) Array MAPK/PI3K en las condiciones de V y E7 expuesto durante 250 segundos.

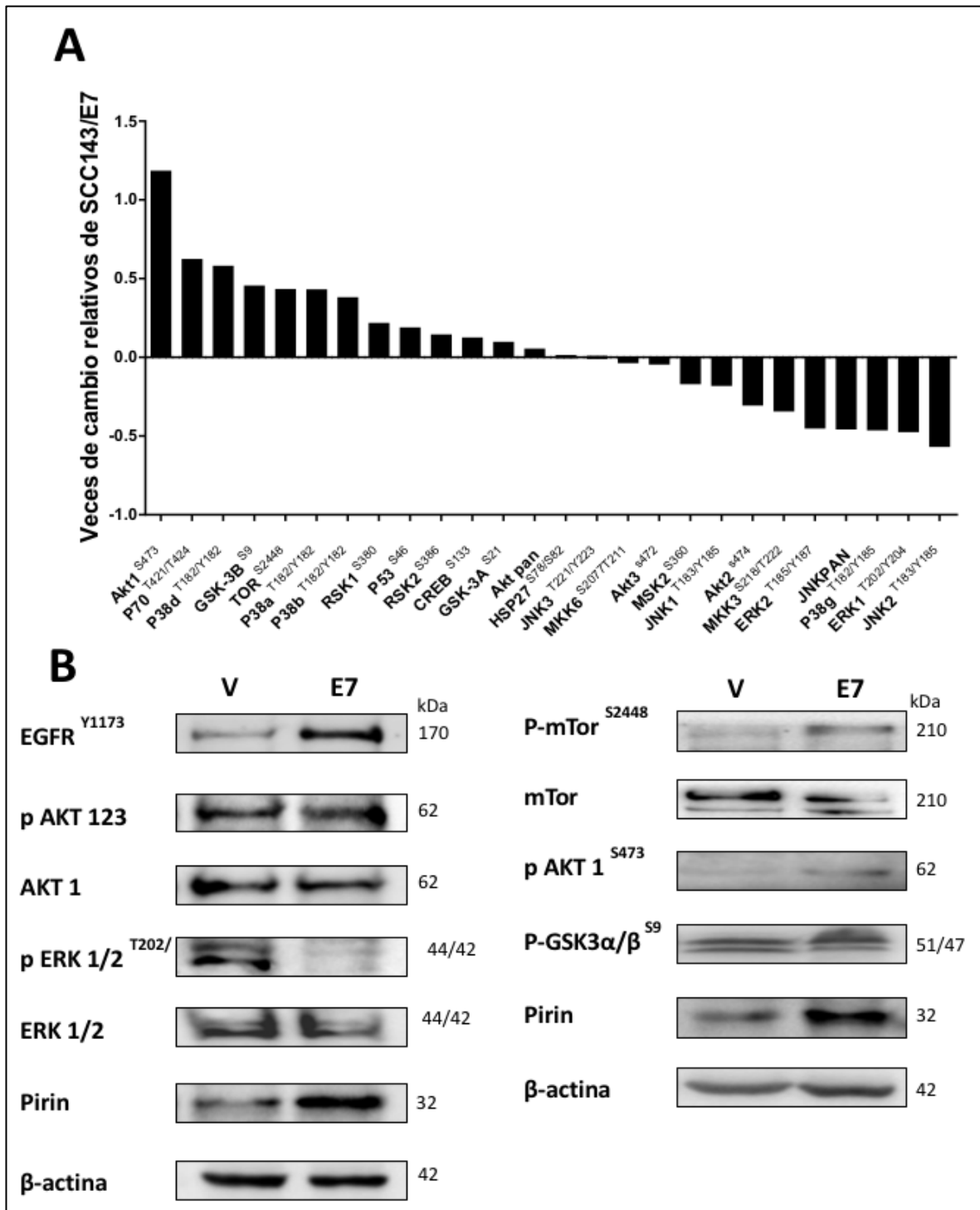


Figura 21. La expresión de E7 de VPH16 induce cambios en las proteínas de las vías MAPK y PI3K en las células orales. (A) Array de proteínas de las vías MAPK y AKT comparando células SCC143/V y SCC143/E7. (B) WB fueron realizados para comprobar los niveles de un pool de proteínas involucradas con las vías MAPK y AKT, se usó como control de carga β -actina en las células transducidas con pLXSN Vacío y pLXSN E7.

Para caracterizar el rol de la vía EGFR/PI3K/AKT en la regulación de PIR mediada por E7 de VPH16, se realizaron ensayos con inhibidores farmacológicos. En primera instancia, se usaron los inhibidores Gefitinib (inhibidor de EGFR) y LY294002 (inhibidor de PI3K) durante 24 h. Además, se usó el inhibidor U2016 (Inhibidor de ERK). La inhibición de EGFR con Gefitinib se tradujo en una disminución, aunque no significativa, de los niveles de la proteína Pirin. Por otro lado, la inhibición de PI3K/AKT y ERK se tradujo en una disminución significativa en los niveles de Pirin (**Fig 22A**). En cuanto al inhibidor de ERK, se observó que indujo una disminución en los niveles de Pirin, lo cual se debe a que inhibe indirectamente a AKT1 fosforilado, puesto que ERK es regulado negativamente en presencia de E7, como se observa en el ensayo fosfoproteómico. Seguidamente, para evaluar el rol de EGFR en la señalización de PIR, se realizó un ensayo tiempo-respuesta de 0 a 24 h de exposición a Gefitinib (**Fig 22B**). Los datos obtenidos muestran disminución de los niveles de Pirin desde las 3 a las 24 h de exposición a esta droga. Para confirmar que los cambios en los niveles de Pirin son mediados por la vía PI3K/AKT, se realizó un ensayo de tiempo-respuesta de 3 a 24 h (**Fig 22C**). El ensayo tiempo-respuesta muestra una disminución de los niveles de Pirin desde las 3 a las 24 h posteriores a la exposición con LY294002. Además, los datos obtenidos mediante ChIP muestran una disminución en el reclutamiento de NRF2 y ARN Pol II en el promotor de PIR cuando las células son incubadas con LY294002 por 24 h en comparación al control con DMSO (**Fig 22D**). Finalmente, con el objetivo de confirmar el rol de la vía PI3K para promover la activación de NF- κ B, células SCC143/E7 fueron tratadas con el inhibidor LY294002 durante 12 y 24 h (**Fig 22E**). Se observó que la actividad del reportero NF- κ B disminuye en presencia del mencionado inhibidor, confirmando que la vía PI3K/AKT está involucrada en la activación de NF- κ B mediada por E7. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que E7 de VPH16 promueve el aumento de los niveles de proteína EGFR con la consecuente activación de la vía PI3K/AKT, la cual está involucrada en el aumento de los niveles de Pirin mediado por reclutamiento de NRF2 en su región promotora, lo cual se traduce en incremento de la actividad de NF- κ B.

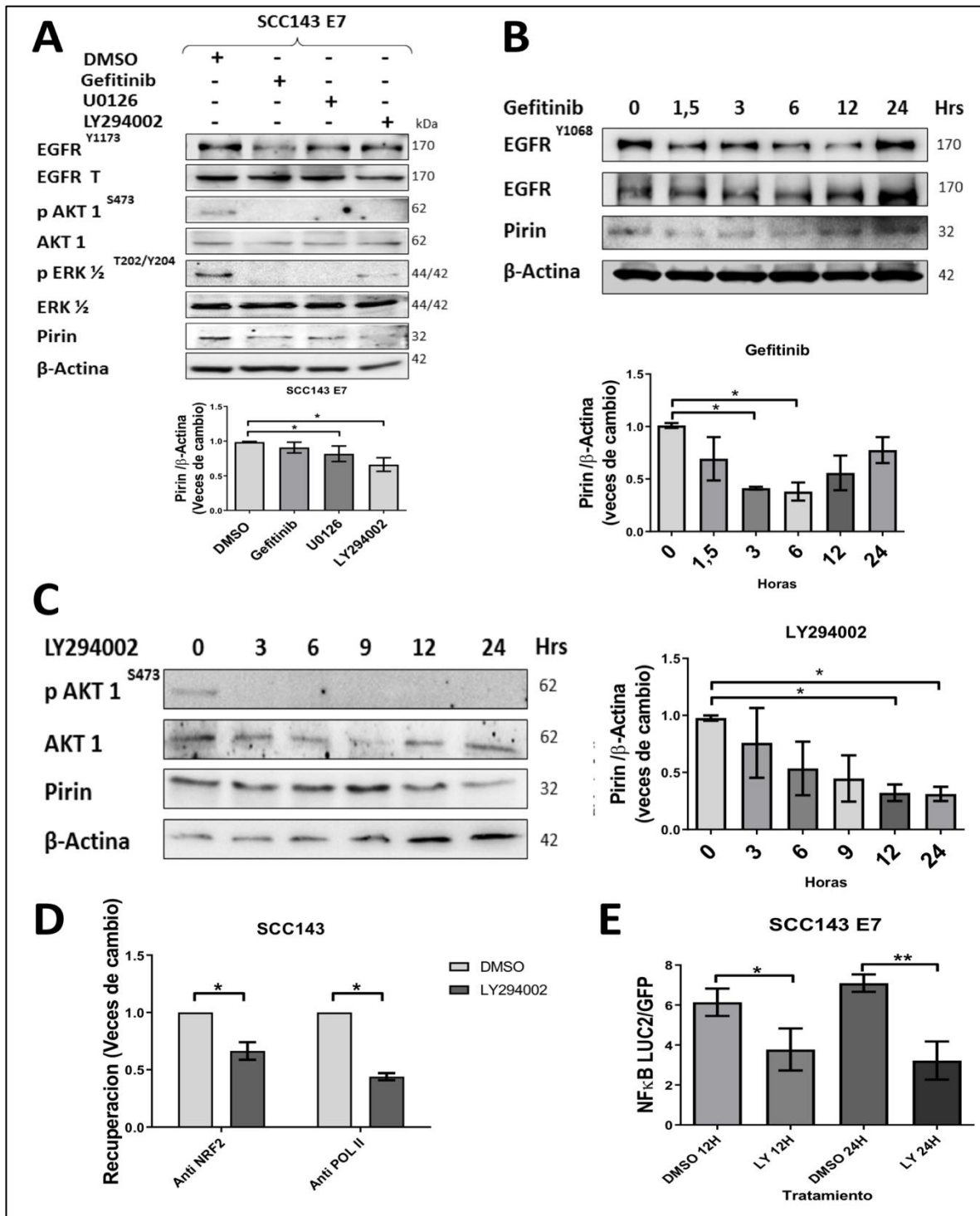


Figura 22. EGFR y la vía PI3K/AKT son importantes en la regulación de los niveles de Pirin inducidos por E7 de VPH16. (A) WB fueron realizados con extractos de proteínas de células SCC143/E7 previamente expuestas a inhibidores de EGFR, ERK y PI3K por 24 h. Se analizaron los niveles de EGFR total, EGFR^{Y1173}, AKT1, p-AKT1, ERK, p-ERK, Pirin y β-actina usado como control de carga. Los gráficos representan los análisis densitométricos de tres WB

independientes para Pirin normalizado mediante β -actina. (B) Ensayo tiempo-respuesta a Gefitinib mediante exposición por 1,5 a 24 h en células SCC143/E7. Se analizaron los niveles de EGFR total, EGFR^{Y1068}, Pirin y β -actina usado como control de carga. (C) Ensayo tiempo-respuesta a LY294002 mediante exposición por 3 a 24 h en células SCC143/E7. Se analizaron los niveles de AKT1 total, p-AKT1, Pirin y β -actina usado como control de carga. (D) CHIP en células SCC143/E7 tratadas con LY294002 o el control DMSO por 24 h (E) La actividad de luciferasa normalizada con GFP se evaluó en células SCC143/E7 transfectadas con el vector reportero pHAGE/NF- κ B y tratadas con LY294002 o el control DMSO por 12 y 24 h. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Objetivo específico 3:

Asociar la vía EGFR/MAPK-PI3K activada por la oncoproteína E7 de VPH-16 con la activación de la vía PIR/NF- κ B en cultivos primarios orales humanos.

Racional: La oncoproteína E7 de VPH-16 tiene la capacidad de regular las proteínas Pirin, AKT1 y EGFR (19-27-29-30). Sin embargo, no hay claridad como estas proteínas se relacionan en sus correspondientes vías EGFR/ PI3K y PIR/NF- κ B. Este objetivo busca explicar en parte como ambas vías pueden asociarse en un contexto de cultivos organotípicos, dada la importancia de la maduración del epitelio en el ciclo de vida del virus.

Resultados:

Por problemas de crecimiento de los cultivos primarios orales humanos (HOK), el tercer objetivo fue llevado a cabo usando la línea celular OKF6-TERT2 (oral no tumoral de piso de boca) y mediante cultivos primarios PHK (queratinocitos humanos de prepucio). Los modelos mencionados anteriormente fueron transducidos con los vectores pLXSNE7 de VPH16 o pLXSN vacío, y posteriormente expuestas al medio de selección con geneticina para generar células establemente transducidas. Cabe destacar que dada la importancia que tiene la diferenciación del epitelio en la biología de VPH, se determinó analizar el objetivo 3 en un contexto de cultivos organotípicos (epitelio estratificado *in vitro*). En primera instancia, se evaluó la funcionalidad de la oncoproteína E7 analizando los niveles de las proteínas EGFR, EGFR^{Y1173}, EGFR^{Y1068}, AKT1, AKT1^{S473}, pRb y Pirin en cultivos organotípicos preparados con células orales OKF6-TERT2 expresando la mencionada oncoproteína viral. En efecto, se observó un incremento significativo de la proteína Pirin, EGFR, EGFR^{Y1173}, EGFR^{Y1068} y AKT1^{S473} en aquellos cultivos de OKF6-TERT2 expresando E7. Respecto a la proteína pRb, se observó una disminución con respecto al control (**Fig 23A**). Además, se evaluaron los niveles de Pirin en los cultivos organotípicos de OKF6-TERT2 mediante IFI. Se observó que en los cultivos organotípicos que expresaban E7, hay un aumento significativo en los niveles de Pirin con respecto a los cultivos control (**Fig 23B**). Seguidamente, se determinaron los niveles de AKT1^{S473} en cultivos organotípicos de células OKF6-TERT2 mediante IFI. Se observó un aumento significativo en los niveles de AKT1^{S473} con

relación al control (**Fig 23C**). Respecto a los cultivos organotípicos realizados con queratinocitos primarios de prepucio, se observó un aumento significativo en los niveles de Pirin en presencia de E7 respecto al control (vector vacío). Además, se detectó una disminución significativa de Pirin en aquellos cultivos organotípicos que expresaban la mutante E7 Δ 21-24 (mutación en el sitio de unión a pRb) (**Fig 24A**). Tomados en conjunto, estos hallazgos sugieren que E7 de VPH16 puede regular las proteínas como EGFR, AKT activo y Pirin en un contexto de cultivos organotípicos y que el sitio de unión a pRb es crítico en dicha regulación.

Para determinar el rol de la vía EGFR/PI3K/AKT1 en la regulación de Pirin inducida por E7 en cultivos organotípicos, se realizaron ensayos con inhibidores farmacológicos. Los tratamientos fueron realizados según los tiempos establecidos en el objetivo anterior y se usaron los inhibidores Gefitinib y LY294002. Para el ensayo realizado en los cultivos organotípicos de OKF6-TERT2 se pudo observar disminución de Pirin y AKT1^{S473} después de 3 h de exposición a Gefitinib (**Fig 25A**). Por otro lado, se observó disminución en los niveles de Pirin y AKT1^{S473} luego de exponer los cultivos a LY294002 por tiempos de 12 y 24 h (**Fig 25B**). Seguidamente, cuando los cultivos organotípicos de células PHK expresando E7 fueron expuestos a 10 μ M LY294002 por 24 h, se detectó una disminución de los niveles de Pirin respecto al control (**Fig 25C**). Además, se evaluaron los niveles de NRF2 en cultivos 2D de células OKF6-TERT2/V y OKF6-TERT2/E7. Se observó un incremento de los niveles de NRF2 en las células expresando E7 respecto del control (**Fig 25D**). Finalmente, se evaluaron los niveles de las proteínas c-Rel y p65^{S529} en los cultivos organotípicos de OKF6-TERT2 E7 expuestos a 10 μ M LY294002. Con respecto a lo anterior se detectó una disminución de c-Rel y p65^{S529} demostrando la importancia de la vía PI3K/AKT1 en la activación de la vía NF- κ B (**Fig 26**). Tomados en conjunto, estos datos permiten establecer que la vía EGFR/PI3K/AKT1 es esencial en la regulación de Pirin mediada por E7 de VPH16 en un contexto de cultivos organotípicos y que la expresión de E7 puede regular positivamente NRF2.

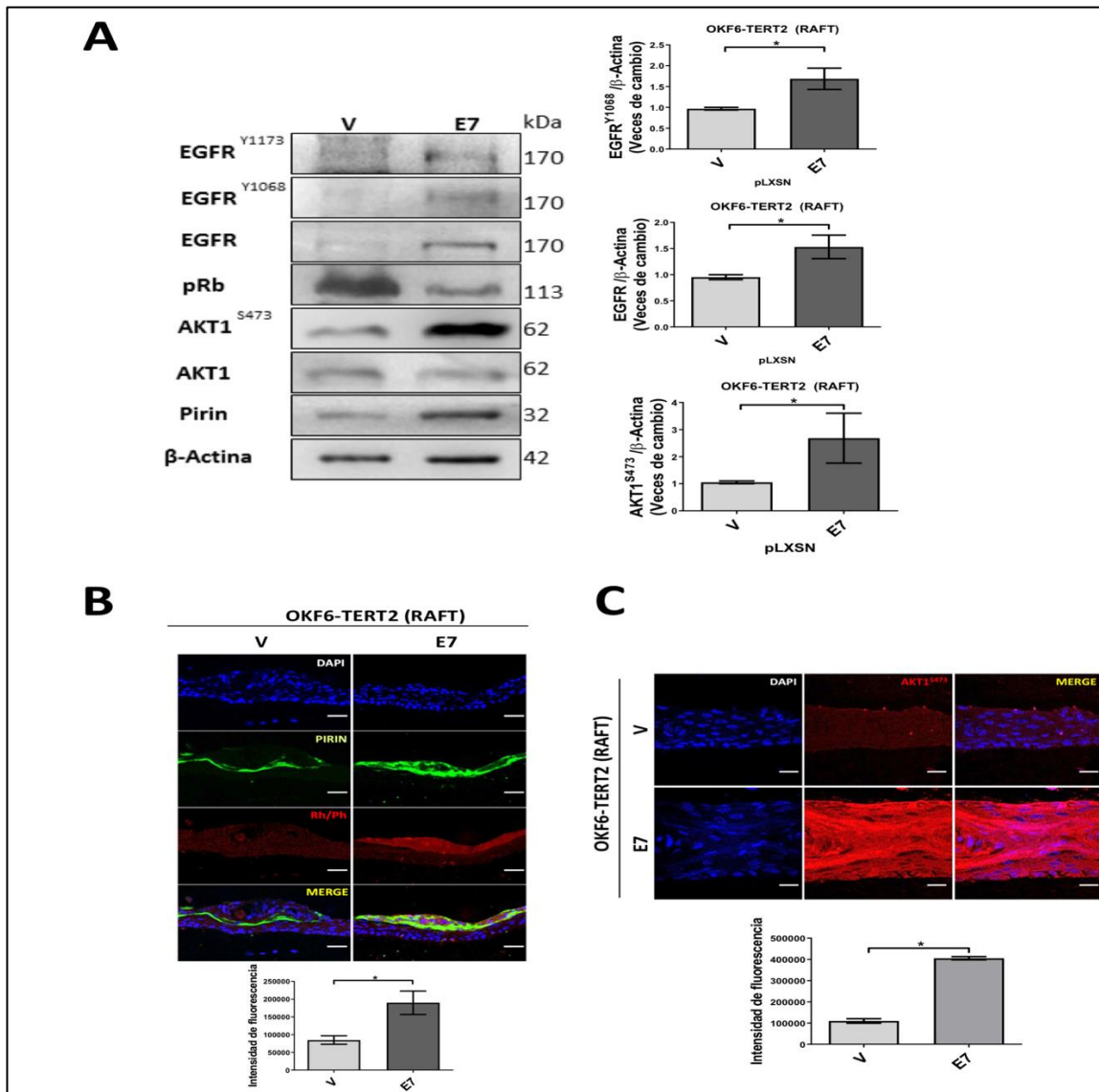


Figura 23. La expresión de E7 de VPH16 induce un incremento en los niveles de Pirin, EGFR y activación de la vía PI3K/AKT en cultivos organotípicos orales y de queratinocitos primarios. (A) WB fueron realizados con extractos de proteínas de cultivos organotípicos de células OKF6-TERT2, se analizaron los niveles de EGFR total, EGFR^{Y1173}, EGFR^{Y1068}, AKT1, p-AKT1^{S473}, pRb, Pirin y β -actina usado como control de carga. (B) IFI revela el aumento de Pirin en los organotípicos OKF6-TERT2 E7, el grafico representa el análisis de la fluorescencia. (C) IFI revela el aumento de AKT1^{S473} en los organotípicos OKF6-TERT2 E7, el grafico representa el análisis de la fluorescencia. (D) IFI realizada en PHK expresando E7, E7 Δ 21-24 y el control con el vector vacío, el grafico representa el análisis de la fluorescencia. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes * $p < 0,05$. Escala de la barra 35 μ m.

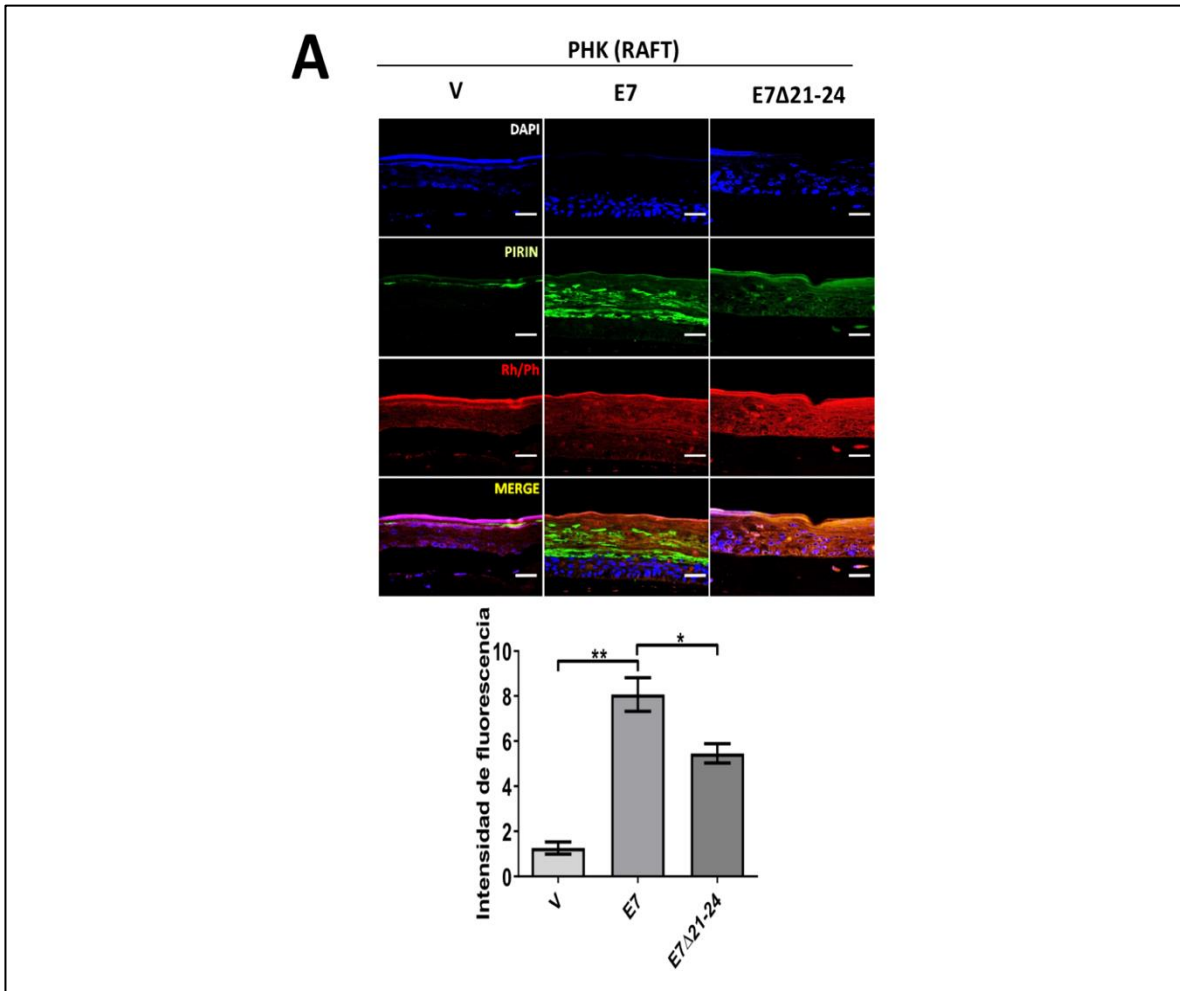


Figura 24. El dominio de E7 Δ 21-24 (mutación en el sitio de unión a pRb) es relevante en la regulación de la expresión de Pirin. (A) IFI realizada en PHK expresando E7, E7 Δ 21-24 y el control con el vector vacío; el grafico representa el análisis de la fluorescencia. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Escala de la barra 35 μm .

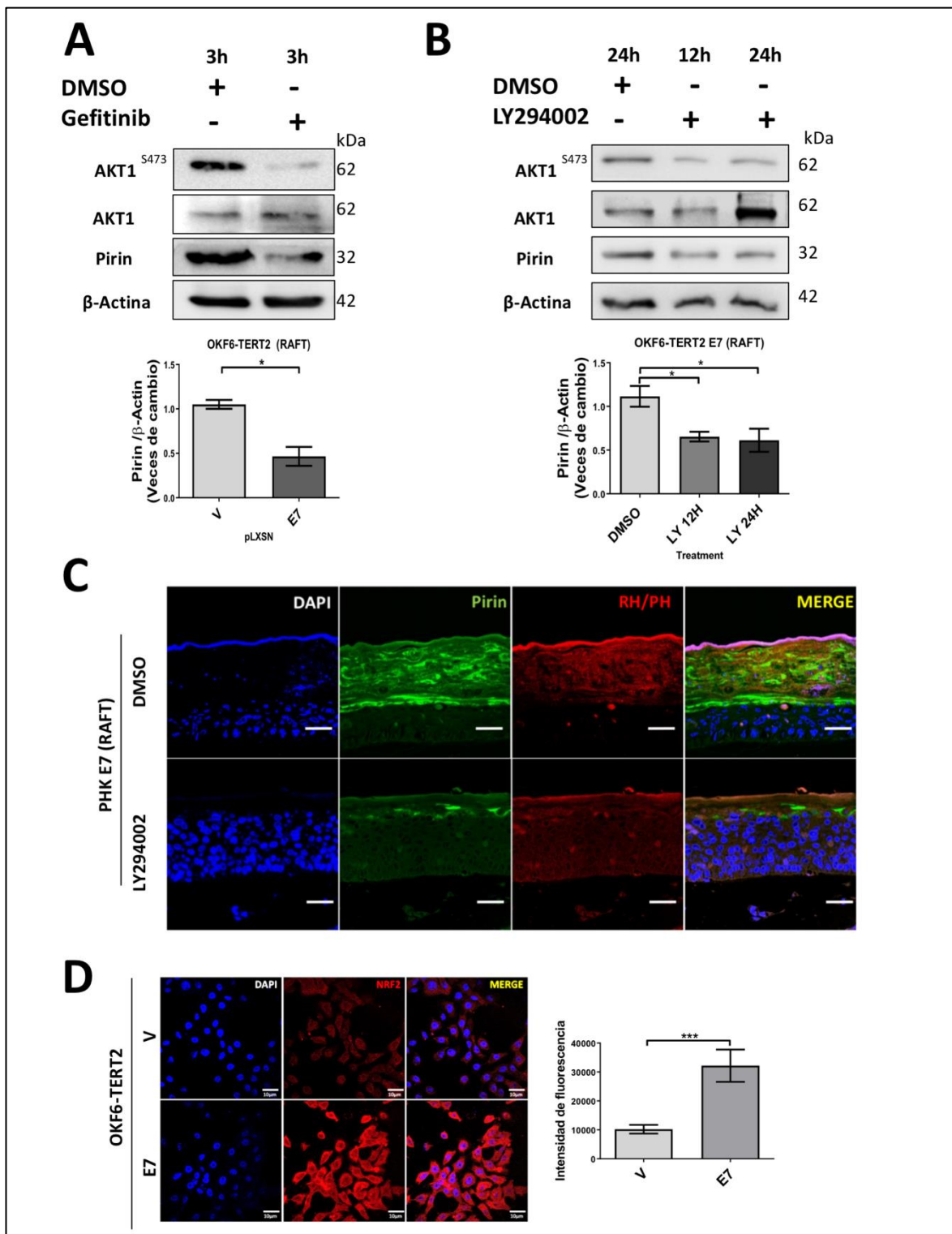


Figura 25. Los niveles de Pirin regulados por E7 son dependientes de EGFR/PI3K/AKT1 en los cultivos organotípicos. (A) Ensayo realizado con Gefitinib mediante exposición por 3 h en Raft OKF6-TERT2 E7. Se analizaron mediante WB los niveles

de AKT1 total, p-AKT1, Pirin y β -actina usado como control de carga. (B) Ensayo realizado con LY294002 mediante exposición por 12 y 24 h en Raft OKF6-TERT2 E7. Se analizaron mediante WB los niveles de AKT1 total, p-AKT1, Pirin y β -actina usado como control de carga. (C) IFI para observar los niveles de Pirin realizada en los RAFT PHK/E7 expuestos a LY294002 por 24 h y el control DMSO. (D) IFI revela el aumento de NRF2 en células OKF6-TERT2/E7. el grafico representa el análisis de la fluorescencia. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Escala de la barra 35 μm para (C) y 10 μm para (D).

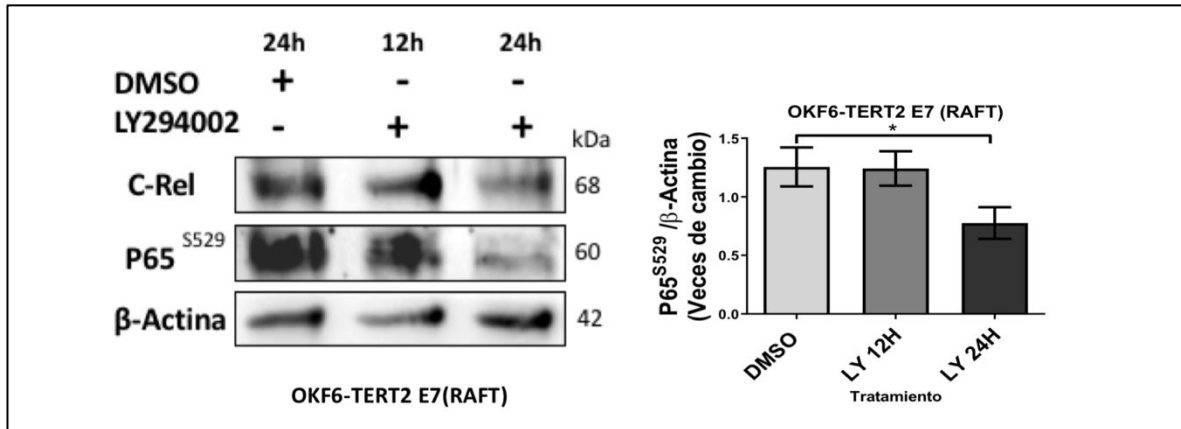


Figura 26. Los niveles de c-Rel y p65^{S529} regulados por E7 son dependientes de PI3K/AKT1 en los cultivos organotípicos. (A) Ensayo realizado con LY294002 mediante exposición por 12 y 24 h en Raft OKF6-TERT2 E7. Se analizaron mediante WB los niveles de c-Rel y P65^{S529} y β -actina usado como control de carga. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes * $p < 0,05$.

X. Discusión

La oncoproteína E7 de VPH16 tiene la capacidad de inducir diferentes cambios moleculares y fenotípicos en la célula, entre ellos la capacidad de inducir la degradación de pRb. Sin embargo, ratones *knock-out* para pRb no recapitulan totalmente las alteraciones moleculares inducidas por E7 [84], lo cual sugiere funciones adicionales para esta oncoproteína viral. En este sentido, existen mecanismos poco caracterizados que pueden participar en el desarrollo y progresión de las diferentes neoplasias asociadas a VPH. Por ejemplo, las oncoproteínas de VPH están involucradas en la inducción de estrés oxidativo. Dentro de los mecanismos mencionados anteriormente y que han sido estudiados, sobresale la vía de señalización NF- κ B. Sin embargo, no todos los componentes de esta vía han sido caracterizados. Una proteína poco estudiada en este aspecto es Pirin, la cual funciona como coactivador transcripcional y sensor de estrés oxidativo. Datos previos de laboratorio han indicado que las oncoproteínas E6 y E7 de VPH16 promueven un incremento de los niveles de Pirin en células epiteliales de cuello uterino y orales [77]. Además, el incremento es significativamente mayor en presencia de E7. Por tal motivo, esta tesis se ha enfocado en esta oncoproteína viral. Los datos sugieren que E7 promueve la activación de la vía EGFR/MAPK-PI3K lo cual, a su vez, se traduce en incremento de los niveles de Pirin y activación de la vía PIR/NF- κ B. Para comprender como la vía PIR/NF- κ B es activada por E7 de VPH16 en células epiteliales orales, células tumorales de piso de boca fueron transducidas con un vector retroviral para la expresión de la oncoproteína E7 de VPH16. Los resultados han indicado que E7 regula positivamente los niveles de PIR. En este contexto, se observa que E7 (VPH16), expresada ectópicamente, regula positivamente los niveles de transcritos de PIR (aproximadamente 8 veces más) y Pirin (aumenta el doble) en relación con el control. Estos resultados están en concordancia a lo previamente reportado en otros modelos celulares cervicales y orales [79]. Las diferencias detectadas entre los niveles de transcritos de PIR y proteína Pirin, pueden deberse a mecanismos de regulación post-transcripcional o post-traduccionales. Sin embargo, el aumento de PIR es consistente a lo reportado previamente [77], y este aumento se produce en la mayoría de las células que expresan E7, lo cual fue objetivado mediante

IFI. Con la ayuda del microscopio confocal se observó una localización subcelular de Pirin nuclear y citoplasmática en las células tumorales orales (SCC143) con la diferencia que las que expresaban E7 tenían un aumento significativo de la señal. Cabe señalar que Pirin citoplasmático de las células que expresaban E7 tenía una ubicación perinuclear por su cercanía con el núcleo y fue el que presentó un mayor aumento. Un reporte previo sugiere que Pirin citoplasmático puede usarse como un marcador de la progresión del melanoma [85].

Los datos encontrados en esta tesis sugieren que la oncoproteína E7 es capaz de inducir cambios en la activación transcripcional del promotor de PIR. Para probar esto, se realizó la construcción de un vector reportero conteniendo el promotor de PIR (pmir-GLO/pPIR) e incluyendo un segmento regulatorio de 940 pares de bases. La **Figura 12** muestra que E7 de VPH16 está involucrada en la regulación transcripcional de PIR, aumentando en un 200% la actividad de su promotor. Por el contrario, el *knock-down* de E7 mediante un ARNip, se tradujo en una disminución significativa en la actividad del promotor de PIR. Además, para la identificación de factores de transcripción involucrados en la activación del promotor de PIR, se han realizado mutantes de sitios de unión a factores de transcripción presentes en la región reguladora del promotor de PIR, como NRF2 y E2F1, los cuales presentan afinidad por los elementos de respuesta antioxidante (sitios ARE) y sitios de unión a E2F1 en el ADN, respectivamente. De hecho, el factor de transcripción E2F está estrechamente relacionado con la expresión de la oncoproteína E7. En ese sentido, el mecanismo de regulación es el mediado por la unión de E7 a pRb para inducir su posterior degradación y liberación de factor de transcripción E2F [50]. Por otra parte, no existen reportes que relacionen VPH y NRF2. Sin embargo, se ha sugerido que NRF2 puede ser un biomarcador de progresión de cáncer de cuello uterino, neoplasia que tiene casi un 100% de prevalencia de VPH [86]. Además, este factor de transcripción es mencionado como principal regulador de la actividad del promotor de PIR y por ende fue planteado como posible regulador mediador en esta investigación [75]. En ese sentido, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que el sitio de unión ARE es relevante en la actividad del promotor de PIR y no así los sitios de unión a E2F1. Por los motivos señalados anteriormente y con el objetivo de determinar la unión de NRF2 al ADN, se llevó a cabo un ensayo ChIP. En

efecto, se pudo observar que NRF2 y ARN Polimerasa II son reclutados en el promotor de PIR, en presencia de E7. Sin embargo, no se pueden descartar otros intermediarios involucrados en el incremento en la actividad del promotor de PIR. Además, se observó un aumento de los niveles nucleares y citoplasmáticos de NRF2 en las células que expresaban E7 por ende este factor de transcripción puede estar actuando como regulador de la actividad transcripcional de PIR en las células orales que expresaban ectópicamente E7.

En esta tesis se han observado cambios fenotípicos en las células SCC143/E7, entre ellos el incremento en la proliferación celular (**Figura 14**) a las 72 y 96 h post siembra. Lo anterior permite determinar el tiempo óptimo de trabajo para evitar resultados sesgados, debido a cambios en la proliferación celular. Con respecto a la migración celular, se observaron diferencias significativas en las células SCC143/E7 visualizado mediante transwells (**Figura 14B**). Estos cambios en la migración fueron revertidos mediante el uso de ARN interferentes específicos de E7 o PIR (**Figura 14D**). Estos datos están en concordancia con lo reportado previamente por Charette ST et al. 2007, en modelo de queratinocitos de prepucio humano. Además, los autores detectaron que la migración inducida por E7 es mediada por la vía PI3K [60]. No cabe duda de que la capacidad migratoria celular involucra la activación de diferentes vías de señalización. En esta tesis se evaluó la vía PIR/NF- κ B y en primera instancia, para determinar la relevancia de esta vía, se utilizó el vector reportero de luciferasa pHAGE. Este vector se caracteriza por tener 4 sitios de unión al factor de transcripción NF- κ B [87]. En el experimento de actividad de Luciferasa inducida por NF- κ B se observa que en las células orales se duplica la actividad cuando se expresa ectópicamente E7 de VPH16 (Fig. 13A). Sobre la base de lo señalado anteriormente, algunos autores dan cuenta de un aumento en la activación de NF- κ B en células VPH positivas [81], pero existen otros autores que sugieren la inactivación de la vía en presencia de las oncoproteínas virales por lo que aún no existe consenso con respecto a la relación entre VPH y NF- κ B [80]. Esta controversia puede deberse a diferentes factores que no son evaluados de igual forma, teniendo en cuenta que la señalización de NF- κ B es bastante compleja y que existen diferentes efectores en la vía, como por ejemplo las proteínas REL y las NF- κ B.

Otro factor que incide en la actividad de NF- κ B es el proceso tumoral (inicio, promoción y progresión) que se está evaluando en cada estudio. En el contexto mencionado anteriormente, se puede observar bastante heterogeneidad en las investigaciones con respecto a la evaluación de desarrollo y progresión tumoral. En este aspecto se suman otros factores como el estado físico del genoma viral, ya sea integrado al genoma hospedero o episomal. Por los motivos anteriormente mencionados, esta tesis se enfocó en la actividad de NF- κ B promovida por E7 durante la progresión tumoral de queratinocitos orales.

Hay evidencia que indica que el incremento en la expresión y activación de Pirin es mediado por factores que inducen estrés oxidativo [73]. Esta proteína, en su estado reducido e inactivo, posee un sitio de unión a ion ferroso Fe²⁺ (control alostérico). En cambio, en su estado oxidado y activo está unida a iones Fe³⁺ en el núcleo de la célula [74] pudiendo funcionar como co-regulador transcripcional en interacciones entre la proteína Rel-A (p65) y el ADN [74]. En esta tesis, mediante una aproximación proteómica, se observó que proteínas de la vía NF- κ B son reguladas en presencia de E7 de VPH16. Aquellas proteínas reguladas positivamente son C-Rel, I κ B, fosfo Rel-A Serina 529, entre otras (**Figura 17**). Teniendo en cuenta que todas las proteínas anteriormente mencionadas están relacionadas con activación se realizaron WB con los extractos nucleares y citoplasmáticos para evaluar las proteínas p-p65^{S536} (Rel-A), C-Rel y p-P65^{S529}. En primera instancia, se evaluó la proteína p-p65^{S536} (Rel-A) relacionada con la activación de la vía canónica de NF- κ B y se pudo observar que esta ruta está regulada negativamente en presencia de E7 (**Figura 18A**). Sin embargo, las proteínas c-Rel y p-p65^{S529}, efectores de la vía NF- κ B, son reguladas positivamente en presencia de E7 (**Figura 18B**). Con relación a lo anterior, dentro de las rutas no canónicas de NF- κ B, tenemos las llamadas atípicas, las cuales son reguladas por receptores tipo tirosina quinasa como EGFR. En ese sentido, las rutas atípicas pueden ser relevantes en el contexto de células VPH positivas [88, 89]. Según el análisis proteómico de la vía NF- κ B, IRF5 fue la proteína con una mayor regulación positiva. Esta proteína se caracteriza por inducir la respuesta a interferón, que puede ser regulada con IRF8, la cual a su vez es regulada positivamente por E7. En ambos casos,

aún no se reportan posibles interacciones con las oncoproteínas de VPH [90]. Con respecto a las proteínas reguladas negativamente se observó que el receptor de interleucina 8 (IL-18 Ra) fue el con mayor regulación negativa en presencia de E7, este receptor se ha visto asociado a actividad citotóxica induciendo el reclutamiento de células natural killer (NK) [91]. En adición la regulación negativa de este receptor trae consigo una disminución de la respuesta a interferón mejorando así la evasión del virus ante el sistema inmune. En el mismo sentido se detectó a la proteína NF- κ B2 regulada negativamente, ya previamente en modelos de cáncer cérvico-uterino se detectaron niveles aumentados de esta proteína, los cuales se relacionaban con la expresión de E6/E7 de VPH-AR[92]. Sin embargo, en los resultados del array se observa una regulación negativa de los niveles del precursor NF- κ B2. En ese sentido es probable que aumente el procesamiento proteolítico de la proteína y se produzca una mayor cantidad de p52. En resumen, con los datos obtenidos se puede proponer que E7 induce la expresión de PIR de una manera dependiente de NRF2, lo que se traduce en aumento de los niveles de Pirin. Además, Pirin promueve la activación de NF- κ B dependiente de c-Rel y p65, los cuales son regulados por E7 de VPH de alto riesgo.

En el 2001, Akerman y col. reportaron que E7 de VPH16 regulaba positivamente los niveles de EGFR en queratinocitos de prepucio [93]. Sin embargo, poco se ha indagado con respecto a las vías de señalización involucradas. En esta tesis se observó que células orales que expresan E7, incrementan tres veces los niveles de EGFR total respecto a los niveles basales. Esto trae como consecuencia un aumento de los niveles de EGFR^{Y1173}. Por lo tanto, no se puede establecer que el aumento de EGFR^{Y1173} se debe a activación inducida por fosforilación. He y colaboradores reportaron aumento del ligando AREG en células que expresan ectópicamente las oncoproteínas virales. Esta proteína es importante en la activación de EGFR [63]. En esta tesis se observó que los niveles de AREG son regulados positivamente en presencia de E7, lo cual va en línea a lo previamente reportado. Sin embargo, en esta tesis no se comprobó que AREG actúa directamente como ligando del receptor de crecimiento epidermal, lo cual esta previamente reportado por otros autores [63]. No obstante, determinar los niveles de AREG es rescatable debido a un posible mecanismo de activación de las vías dependiente de EGFR. Por lo antes planteado y mediante el uso de un ensayo

fosfoproteómico para la vía MAPK/PI3K, se detectó que las vías AKT1 y P38 son activadas en aquellas células que expresan E7 de VPH16. Efectivamente, los resultados del array muestran que AKT1^{S473} es la proteína cuyos niveles aumentan más del doble respecto al control. Además, todas las proteínas relacionadas a esta fosforilación de AKT1 se regulan positivamente, entre ellas p-P70 s6 quinasa, p-CREB, p-GSK3b y p-MTOR, las cuales son parte de la señalización inducida por AKT1. Además, se observó que P38 Alfa, Beta y Delta son reguladas positivamente a los menos 30% en células SCC143/E7 que en células SCC143/V. En resumen, en células que expresan E7, se regulan positivamente los niveles de EGFR total y Anfiregulina. Además, en el array MAPK, se encontró que las vías que se activan son AKT1 y P38.

Sydnei W y Scott V demostraron que E7 regulaba negativamente la vía AKT y posteriormente p-P70 s6 quinasa y p-MTOR en queratinocitos humanos de prepucio [94]. Las diferencias en los modelos celulares de estudio podrían explicar los resultados encontrados en esta tesis. Con respecto a lo anterior, las discrepancias entre los autores y esta investigación son el modelo de trabajo, el uso de drogas como mitomicina para sincronizar las células y el uso del genoma completo de VPH en estado físico episomal. Sin embargo, otros autores sugieren que E7 de VPH de alto riesgo está relacionado con la activación de la vía PI3K/AKT [95, 96]. Sobre la base de lo antes planteado, en los ensayos mediante inhibidores farmacológicos, se pudo observar que EGFR y PI3K/AKT1 están involucrados en la regulación de Pirin inducida E7. Específicamente en la **Figura 22A** se puede apreciar que a 24 h de exposición a inhibidores específicos de ERK y PIK3 hay una disminución significativa de los niveles de Pirin, pero con el inhibidor U0126 específico de ERK, se observa inhibición inespecífica de AKT1. Seguidamente, mediante el array MAPK, se detecta que la proteína fosforilada ERK estaba regulada negativamente en presencia de E7, lo que indica la escasa o nula participación de la ruta ERK en la regulación de los niveles de Pirin. En cuanto al inhibidor LY294002 específico de PI3K, fue capaz de disminuir los niveles de Pirin y de la forma activa de AKT1. Con respecto a lo anterior, cabe destacar que AKT1^{S473} es regulado por E7, como se observó en las **Figuras 21A, 21B, 23A y 23C**. Por lo tanto, la vía canónica de PI3K/AKT1 es fundamental en la regulación de Pirin inducida por E7. Seguidamente, los cambios inducidos por Gefitinib (inhibidor específico de EGFR) a 24

h no fueron suficientes para cambiar significativamente los niveles de Pirin, de modo que se realizó un ensayo tiempo-respuesta para descartar a EGFR en la señalización de Pirin. En el ensayo de tiempo-respuesta con Gefitinib se aprecia como al inhibir EGFR, a tiempos cortos, los niveles de Pirin disminuyen a las 3 y 6 h de exposición. Luego, para determinar la función de la vía PI3K/AKT1, se realizó un ensayo tiempo-respuesta, en el cual se observó una disminución progresiva de Pirin de una manera dependiente del tiempo con el inhibidor LY294002. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se analizó el rol de la vía PI3K/AKT sobre NRF2 y en su actividad como regulador transcripcional de PIR. Previamente, un conjunto de estudios ha observado la capacidad de la vía PI3K/AKT de regular los niveles de NRF2 [97-99]. En ese contexto se menciona que GSK3 β , un componente de la vía PI3K/AKT, cumple función regulatoria en los niveles de NRF2. Esta regulación involucra la fosforilación inducida de GSK3 β por AKT1 para la posterior liberación de NRF2 del complejo GSK3 β -CULIN3 que lo marca para su degradación [100]. De esta forma, la activación de la vía PI3K/AKT1 por E7 de VPH16, implica incremento de los niveles de NRF2. Tomados en conjunto, estos resultados permiten establecer que la vía EGFR/PI3K/AKT1/NRF2 es relevante en promover un incremento de los niveles de Pirin de una manera dependiente de E7 de HPV16.

Usando LY294002, se demostró que esta droga puede inhibir la activación de la vía NF- κ B en células tumorales orales revelando que la vía PI3K/AKT1 regula la señalización de NF- κ B (**Figura 22E y 26**). Sin embargo, lo mencionado anteriormente fue la base para apoyar la conexión entre las vías mencionadas anteriormente. Cabe señalar que Dong Bai y col. dieron a conocer que Akt constitutivamente activo, estimula la actividad de IKK (quinasa de los inhibidores- κ B). El complejo IKK luego fosforila a la proteína I κ B y la subunidad p65/RelA, lo que induce una activación mejorada del factor de transcripción NF- κ B [101]. Puntualmente en esta tesis se evaluaron dos efectores de NF- κ B como lo son c-Rel y pP65^{S529} que en este caso ambos son regulados positivamente en presencia de E7 de VPH16. Con respecto al efector p65^{S529}, se reportó que es activado por AKT y que puede proporcionar funciones de supervivencia celular [102]. A nivel molecular es importante señalar que los factores de transcripción de la vía NF- κ B, así como otros, dependen de la capacidad de unirse correctamente y con alta afinidad al ADN. En este sentido, se ha demostrado que Pirin puede funcionar como

cofactor transcripcional de p65 mejorando su afinidad por el ADN [74]. Previamente Gustin J y col. observaron que al usar LY294002 (inhibidor de la vía PI3K/AKT), hay disminución significativa de la unión de NF- κ B al ADN en diferentes modelos celulares [103]. En cuanto a los resultados observados en los cultivos organotípicos, se encontró que Pirin, EGFR, EGFR^{Y1173}, EGFR^{Y1068} y AKT1^{S473} están regulados positivamente en presencia de E7 de VPH16, lo que está de acuerdo con los resultados del objetivo 1 y 2 realizados en cultivos 2D. Seguidamente, los resultados expuestos en la **Figura 24** sugirieron que el sitio de unión a pRb es relevante en la regulación de Pirin. Lo anterior concuerda con lo publicado por Mengues C y colaboradores que demuestran que el sitio de unión a pRb de E7 es capaz de regular la activación de AKT [96]. Además, se observó que la vía EGFR/PI3K/AKT regula los niveles de Pirin en aquellos cultivos organotípicos que expresan E7 (**Figuras 25A, B y C**). Estos resultados permiten establecer una conexión entre PIR/NF- κ B y la vía EGFR/MAPK-PI3K. Finalmente, se propone un modelo para explicar los resultados obtenidos en esta tesis (**Figura 27**).

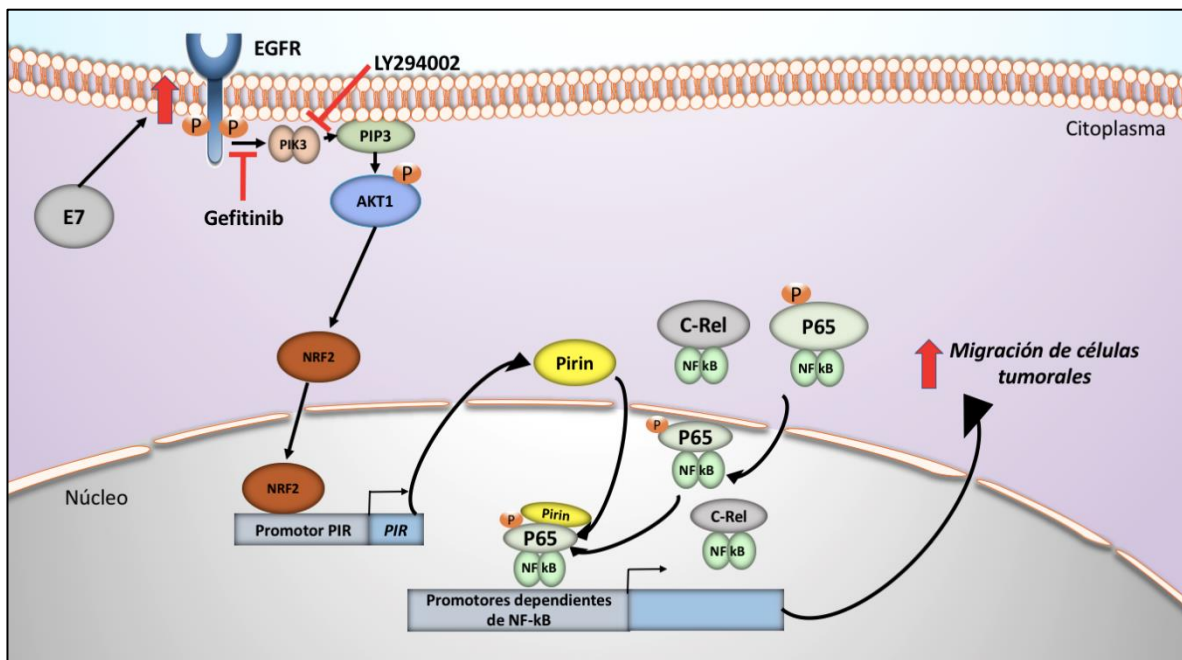


Figura 27. Modelo de los resultados de la tesis.

XI. Conclusiones

Los resultados de esta tesis realizada en un modelo de queratinocitos orales sugieren las siguientes conclusiones:

- 1.- Los transcritos de PIR y los niveles de Pirin son regulados positivamente en presencia de la oncoproteína E7 de VPH16 en células orales tumorales y no tumorales. Particularmente, el sitio de unión a pRb presente en E7, es esencial para su efecto sobre Pirin.
- 2.- E7 de VPH 16 es capaz de regular la activación transcripcional del promotor de PIR a través del reclutamiento del factor NRF2
- 3.- E7 de VPH16 regula la activación de NF- κ B a través de p65, Pirin y c-Rel.
- 4.- E7 de VPH16 induce un incremento en los niveles de EGFR y activación de la vía PI3K/AKT1^{S473}.

Como conclusión general, los datos obtenidos en la presente tesis sugieren que E7 induce activación de la vía EGFR/PI3K/AKT1/NRF2 lo cual a su vez lleva a activación de PIR/NF- κ B promoviendo la migración de células tumorales epiteliales orales.

XII. Bibliografía

1. Leemans, C.R., P.J.F. Snijders, and R.H. Brakenhoff, *The molecular landscape of head and neck cancer*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(5): p. 269-282.
2. Ferlay, J., et al., *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods*. Int J Cancer, 2019. **144**(8): p. 1941-1953.
3. Montero, P.H. and S.G. Patel, *Cancer of the oral cavity*. Surg Oncol Clin N Am, 2015. **24**(3): p. 491-508.
4. Weinberg, A.S., C.A. Ogle, and E.K. Shim, *Metastatic cutaneous squamous cell carcinoma: an update*. Dermatol Surg, 2007. **33**(8): p. 885-99.
5. Rivera, C., *Essentials of oral cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(9): p. 11884-94.
6. Patel, S.G. and J.P. Shah, *TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(4): p. 242-58; quiz 261-2, 264.
7. Dhull, A.K., et al., *Major Risk Factors in Head and Neck Cancer: A Retrospective Analysis of 12-Year Experiences*. World J Oncol, 2018. **9**(3): p. 80-84.
8. Fehrman, F. and L.A. Laimins, *Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation*. Oncogene, 2003. **22**(33): p. 5201-7.
9. Butz, K. and F. Hoppe-Seyler, *Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region*. J Virol, 1993. **67**(11): p. 6476-86.
10. Awua, A.K., et al., *Unique LCR variations among lineages of HPV16, 18 and 45 isolates from women with normal cervical cytology in Ghana*. Virol J, 2017. **14**(1): p. 85.
11. Volpini, L.P.B., et al., *The high prevalence of HPV and HPV16 European variants in cervical and anal samples of HIV-seropositive women with normal Pap test results*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0176422.
12. de Sanjose, S., et al., *Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2007. **7**(7): p. 453-9.
13. Rodriguez-Alvarez, M.I., et al., *Prevalence and Risk Factors of Human Papillomavirus in Male Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Int J Environ Res Public Health, 2018. **15**(10).
14. Brianti, P., E. De Flaminio, and S.R. Mercuri, *Review of HPV-related diseases and cancers*. New Microbiol, 2017. **40**(2).
15. Doorbar, J., et al., *Human papillomavirus molecular biology and disease association*. Rev Med Virol, 2015. **25 Suppl 1**: p. 2-23.
16. de Sanjose, S., M. Brotons, and M.A. Pavon, *The natural history of human papillomavirus infection*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2018. **47**: p. 2-13.
17. Balanda, M., et al., *Prevalence of human papillomavirus infection among women presenting for cervical cancer screening in Chile, 2014-2015*. Med Microbiol Immunol, 2016. **205**(6): p. 585-594.

18. Lizano-Soberón, L.-S.y., *Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina*. Cancerologia 1, 2006: p. 31-35.
19. Egawa, N., et al., *Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia*. Viruses, 2015. **7**(7): p. 3863-90.
20. Rashid, K.A., J.N. Stern, and A.R. Ahmed, *Identification of an epitope within human integrin alpha 6 subunit for the binding of autoantibody and its role in basement membrane separation in oral pemphigoid*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1968-77.
21. Johnson, K.M., et al., *Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus*. J Virol, 2009. **83**(5): p. 2067-74.
22. Schelhaas, M., et al., *Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis*. PLoS Pathog, 2012. **8**(4): p. e1002657.
23. Bousarghin, L., et al., *Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells*. J Virol, 2003. **77**(6): p. 3846-50.
24. Abban, C.Y., N.A. Bradbury, and P.I. Meneses, *HPV16 and BPV1 infection can be blocked by the dynamin inhibitor dynasore*. Am J Ther, 2008. **15**(4): p. 304-11.
25. Broniarczyk, J., et al., *Human papillomavirus infection requires the TSG101 component of the ESCRT machinery*. Virology, 2014. **460-461**: p. 83-90.
26. Aksoy, P., E.Y. Gottschalk, and P.I. Meneses, *HPV entry into cells*. Mutat Res Rev Mutat Res, 2017. **772**: p. 13-22.
27. Schneider, M.A., et al., *Identification of the dynein light chains required for human papillomavirus infection*. Cell Microbiol, 2011. **13**(1): p. 32-46.
28. Lipovsky, A., et al., *Genome-wide siRNA screen identifies the retromer as a cellular entry factor for human papillomavirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(18): p. 7452-7.
29. McBride, A.A., *Replication and partitioning of papillomavirus genomes*. Adv Virus Res, 2008. **72**: p. 155-205.
30. Graham, S.V., *Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies*. Future Microbiol, 2010. **5**(10): p. 1493-506.
31. Frazer, I.H., *Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(1): p. 46-54.
32. Bergvall, M., T. Melendy, and J. Archambault, *The E1 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 35-56.
33. McBride, A.A., *The papillomavirus E2 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 57-79.
34. DeSmet, M., et al., *The Replicative Consequences of Papillomavirus E2 Protein Binding to the Origin Replication Factor ORC2*. PLoS Pathog, 2016. **12**(10): p. e1005934.
35. Dominguez-Catzin, V., et al., *HPV16-E2 protein modifies self-renewal and differentiation rate in progenitor cells of human immortalized keratinocytes*. Virol J, 2017. **14**(1): p. 65.
36. DiMaio, D. and L.M. Petti, *The E5 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 99-114.

37. Maufort, J.P., et al., *A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis*. *Cancer Res*, 2010. **70**(7): p. 2924-31.
38. Venuti, A., et al., *Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions*. *Mol Cancer*, 2011. **10**: p. 140.
39. Vande Pol, S.B. and A.J. Klingelutz, *Papillomavirus E6 oncoproteins*. *Virology*, 2013. **445**(1-2): p. 115-37.
40. Roman, A. and K. Munger, *The papillomavirus E7 proteins*. *Virology*, 2013. **445**(1-2): p. 138-68.
41. Buck, C.B., P.M. Day, and B.L. Trus, *The papillomavirus major capsid protein L1*. *Virology*, 2013. **445**(1-2): p. 169-74.
42. Day, P.M., et al., *Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by L2 cross-neutralizing and L1 type-specific antibodies*. *Journal of Virology*, 2008. **82**(9): p. 4638-4646.
43. zur Hausen, H., *Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account*. *Virology*, 2009. **384**(2): p. 260-5.
44. Schiffman, M., et al., *Carcinogenic human papillomavirus infection*. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. **2**: p. 16086.
45. Tang, Y., et al., *Epidemiology and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in Southwest China: a cross-sectional five years study in non-vaccinated women*. *Virol J*, 2017. **14**(1): p. 84.
46. Tota, J.E., et al., *Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: Implications for prevention strategies*. *Preventive Medicine*, 2011. **53**, **Supplement 1**(0): p. S12-S21.
47. Christensen, N.D., *HPV disease transmission protection and control*. *Microb Cell*, 2016. **3**(9): p. 476-490.
48. Werness, B.A., A.J. Levine, and P.M. Howley, *Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53*. *Science*, 1990. **248**(4951): p. 76-9.
49. Dyson, N., et al., *Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins*. *J Virol*, 1992. **66**(12): p. 6893-902.
50. zur Hausen, H., *Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis*. *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(9): p. 690-8.
51. Tsakogiannis, D., et al., *Sites of disruption within E1 and E2 genes of HPV16 and association with cervical dysplasia*. *J Med Virol*, 2015. **87**(11): p. 1973-80.
52. Arias-Pulido, H., et al., *Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer*. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**(5): p. 1755-62.
53. Niebler, M., et al., *Post-translational control of IL-1beta via the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein: a novel mechanism of innate immune escape mediated by the E3-ubiquitin ligase E6-AP and p53*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(8): p. e1003536.
54. Lin, H.P., Y.P. Wang, and C.P. Chiang, *Expression of p53, MDM2, p21, heat shock protein 70, and HPV 16/18 E6 proteins in oral verrucous carcinoma and oral verrucous hyperplasia*. *Head Neck*, 2011. **33**(3): p. 334-40.

55. 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.
56. Mittal, S. and L. Banks, *Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation*. Mutat Res, 2017. **772**: p. 23-35.
57. Aguayo, F., et al., *Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile*. Br J Cancer, 2007. **97**(1): p. 85-91.
58. Moody, C.A. and L.A. Laimins, *Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(8): p. 550-60.
59. Tomaic, V., *Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites*. Cancers (Basel), 2016. **8**(10).
60. Charette, S.T. and D.J. McCance, *The E7 protein from human papillomavirus type 16 enhances keratinocyte migration in an Akt-dependent manner*. Oncogene, 2007. **26**(52): p. 7386-90.
61. Walker, J., et al., *Expression of human papillomavirus type 16 E7 is sufficient to significantly increase expression of angiogenic factors but is not sufficient to induce endothelial cell migration*. Virology, 2011. **410**(2): p. 283-90.
62. Rampias, T., et al., *Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(3): p. 433-43.
63. He, C., et al., *The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression*. EMBO Mol Med, 2015. **7**(11): p. 1426-49.
64. Liu, F., et al., *ERK Signaling Pathway Is Involved in HPV-16 E6 but not E7 Oncoprotein-Induced HIF-1alpha Protein Accumulation in NSCLC Cells*. Oncol Res, 2016. **23**(3): p. 109-18.
65. Gillison, M.L., et al., *Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(6): p. 407-20.
66. Reyes, M., et al., *Human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas from Chilean patients*. Exp Mol Pathol, 2015. **99**(1): p. 95-9.
67. Oeckinghaus, A. and S. Ghosh, *The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(4): p. a000034.
68. Dolcet, X., et al., *NF-kB in development and progression of human cancer*. Virchows Arch, 2005. **446**(5): p. 475-82.
69. Tak, P.P. and G.S. Firestein, *NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 7-11.
70. Chen, Z., B. Yan, and C. Van Waes, *The Role of the NF-kappaB Transcriptome and Proteome as Biomarkers in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinomas*. Biomark Med, 2008. **2**(4): p. 409-426.
71. Bindhu, O.S., et al., *High expression levels of nuclear factor kappa B and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2006. **28**(10): p. 916-25.
72. Havard, L., et al., *Differential production of cytokines and activation of NF-kappaB in HPV-transformed keratinocytes*. Virology, 2002. **298**(2): p. 271-85.

73. Gelbman, B.D., et al., *Upregulation of pirin expression by chronic cigarette smoking is associated with bronchial epithelial cell apoptosis*. *Respir Res*, 2007. **8**: p. 10.
74. Liu, F., et al., *Pirin is an iron-dependent redox regulator of NF-kappaB*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(24): p. 9722-7.
75. Brzoska, K., T.M. Stepkowski, and M. Kruszewski, *Basal PIR expression in HeLa cells is driven by NRF2 via evolutionary conserved antioxidant response element*. *Mol Cell Biochem*, 2014. **389**(1-2): p. 99-111.
76. Miyazaki, I., et al., *A small-molecule inhibitor shows that pirin regulates migration of melanoma cells*. *Nat Chem Biol*, 2010. **6**(9): p. 667-73.
77. Carrillo, D., et al., *Upregulation of PIR gene expression induced by human papillomavirus E6 and E7 in epithelial oral and cervical cells*. *Open Biol*, 2017. **7**(11).
78. White, J.S., et al., *The influence of clinical and demographic risk factors on the establishment of head and neck squamous cell carcinoma cell lines*. *Oral Oncol*, 2007. **43**(7): p. 701-12.
79. Carrillo D, M.J., Huerta H, Leal G, Corvalán A, León O, Urzúa U, Boccardo E, Tapia J, Aguayo F., *High-risk human papillomavirus E6- and E7-dependent PIR gene up-regulation in oral and cervical cancer cells*. *Open Biology*, 2017.
80. Vandermark, E.R., et al., *Human papillomavirus type 16 E6 and E 7 proteins alter NF-kB in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF-kB promotes cell growth and immortalization*. *Virology*, 2012. **425**(1): p. 53-60.
81. Branca, M., et al., *Upregulation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus or disease outcome in cervical cancer*. *Diagn Cytopathol*, 2006. **34**(8): p. 555-63.
82. Wang, Z., et al., *Butein induction of HO-1 by p38 MAPK/Nrf2 pathway in adipocytes attenuates high-fat diet induced adipose hypertrophy in mice*. *Eur J Pharmacol*, 2017. **799**: p. 201-210.
83. Hubner, R.H., et al., *Coordinate control of expression of Nrf2-modulated genes in the human small airway epithelium is highly responsive to cigarette smoking*. *Mol Med*, 2009. **15**(7-8): p. 203-19.
84. Balsitis, S., et al., *Examination of the pRb-dependent and pRb-independent functions of E7 in vivo*. *J Virol*, 2005. **79**(17): p. 11392-402.
85. Licciulli, S., et al., *Pirin delocalization in melanoma progression identified by high content immuno-detection based approaches*. *BMC Cell Biol*, 2010. **11**: p. 5.
86. Ma, J.Q., et al., *Functional Role of NRF2 in Cervical Carcinogenesis*. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0133876.
87. Wilson, A.A., et al., *Lentiviral delivery of RNAi for in vivo lineage-specific modulation of gene expression in mouse lung macrophages*. *Mol Ther*, 2013. **21**(4): p. 825-33.
88. Sittampalam GS, C.N., Brimacombe K, et al., editors. , *Trask OJ Jr. Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) Translocation Assay Development and Validation for High Content Screening*. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD). Vol. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available 2012 Oct 1. .

89. Schuster, M., et al., *Atypical IκB proteins - nuclear modulators of NF-κB signaling*. Cell Commun Signal, 2013. **11**(1): p. 23.
90. Stehlik, C., et al., *CARD6 is a modulator of NF-κB activation by Nod1- and Cardiak-mediated pathways*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 31941-9.
91. Matsui, K., H. Tsutsui, and K. Nakanishi, *Pathophysiological roles for IL-18 in inflammatory arthritis*. Expert Opin Ther Targets, 2003. **7**(6): p. 701-24.
92. Havard, L., et al., *High levels of p105 (NFκB1) and p100 (NFκB2) proteins in HPV16-transformed keratinocytes: role of E6 and E7 oncoproteins*. Virology, 2005. **331**(2): p. 357-66.
93. Akerman, G.S., et al., *Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cooperate to increase epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels, overcoming mechanisms by which excessive EGFR signaling shortens the life span of normal human keratinocytes*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3837-43.
94. Strickland, S.W. and S. Vande Pol, *The Human Papillomavirus 16 E7 Oncoprotein Attenuates AKT Signaling To Promote Internal Ribosome Entry Site-Dependent Translation and Expression of c-MYC*. J Virol, 2016. **90**(12): p. 5611-5621.
95. Pim, D., et al., *Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A*. Oncogene, 2005. **24**(53): p. 7830-8.
96. Menges, C.W., et al., *Human papillomavirus type 16 E7 up-regulates AKT activity through the retinoblastoma protein*. Cancer Res, 2006. **66**(11): p. 5555-9.
97. Yun, S.M., Y.S. Kim, and D.Y. Hur, *LMP1 and 2A Induce the Expression of Nrf2 Through Akt Signaling Pathway in Epstein-Barr Virus-Transformed B Cells*. Transl Oncol, 2019. **12**(5): p. 775-783.
98. Li, Y., et al., *Involvement of the PI3K/Akt/Nrf2 Signaling Pathway in Resveratrol-Mediated Reversal of Drug Resistance in HL-60/ADR Cells*. Nutr Cancer, 2019. **71**(6): p. 1007-1018.
99. Reddy, N.M., et al., *PI3K-AKT Signaling via Nrf2 Protects against Hyperoxia-Induced Acute Lung Injury, but Promotes Inflammation Post-Injury Independent of Nrf2 in Mice*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0129676.
100. Rojo, A.I., M.R. Sagarra, and A. Cuadrado, *GSK-3β down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress*. J Neurochem, 2008. **105**(1): p. 192-202.
101. Bai, D., L. Ueno, and P.K. Vogt, *Akt-mediated regulation of NFκB and the essentialness of NFκB for the oncogenicity of PI3K and Akt*. Int J Cancer, 2009. **125**(12): p. 2863-70.
102. Madrid, L.V., et al., *Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-κB through utilization of the IκB kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 18934-40.
103. Gustin, J.A., et al., *Cell type-specific expression of the IκB kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF-κB activation*. J Biol Chem, 2004. **279**(3): p. 1615-20.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/342947367>

Human Papillomavirus 16 E7 Promotes EGFR/PI3K/AKT1/NRF2 Signaling Pathway Contributing to PIR/NF- κ B Activation in Oral Cancer Cells

Article in *Cancers* · June 2020

DOI: 10.3390/cancers12071904

CITATION

1

READS

59

15 authors, including:



Diego Carrillo-Beltrán
University of Chile

68 PUBLICATIONS 56 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Juan P. Muñoz
University of Tarapacá

89 PUBLICATIONS 114 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Nahir Guerrero
University of Santiago, Chile

4 PUBLICATIONS 5 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Rancés Blanco
University of Chile

55 PUBLICATIONS 387 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:







N-Glycolyl GM3 [View project](#)



Molecular mechanisms controlling immune response in Inflammatory bowel disease [View project](#)

Article

Human Papillomavirus 16 E7 Promotes EGFR/PI3K/AKT1/NRF2 Signaling Pathway Contributing to PIR/NF- κ B Activation in Oral Cancer Cells

Diego Carrillo-Beltrán ¹, Juan P. Muñoz ², Nahir Guerrero-Vásquez ¹, Rancés Blanco ¹, Oscar León ³, Vanesca de Souza Lino ⁴, Julio C. Tapia ⁵ , Edio Maldonado ⁵, Karen Dubois-Camacho ⁶, Marcela A. Hermoso ⁶, Alejandro H. Corvalán ^{7,8} , Gloria M. Calaf ^{2,9}, Enrique Boccardo ^{4,*}  and Francisco Aguayo ^{1,8,*} 

- ¹ Laboratorio de Oncovirología, Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago 8380000, Chile; diegoeb17@hotmail.com (D.C.-B.); nahir.alejandra@hotmail.com (N.G.-V.); rancesblanco1976@gmail.com (R.B.)
- ² Instituto de Alta Investigación, Universidad de Tarapaca, Arica 1000000, Chile; jp_182_mb@hotmail.com (J.P.M.); gmc24@cumc.columbia.edu (G.M.C.)
- ³ Departamento de Acuicultura y Recursos Agroalimentarios, Universidad de Los Lagos, Osorno 933, Chile; oscar.leon@uchile.cl
- ⁴ Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo 05508-900, Brazil; vanesca_lino@hotmail.com
- ⁵ Programa Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago 8380000, Chile; jtapia@med.uchile.cl (J.C.T.); emaldona@med.uchile.cl (E.M.)
- ⁶ Innate Immunity Laboratory, Immunology Program, Instituto de Ciencias biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago 8380000, Chile; kdubois@gmail.com (K.D.-C.); mhermoso@med.uchile.cl (M.A.H.)
- ⁷ Hematology and Oncology Department, School of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago 8330024, Chile; acorvalan@uc.cl
- ⁸ Advanced Center for Chronic Diseases (ACCDiS), Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago 8330024, Chile
- ⁹ Center for Radiological Research, Columbia University Medical Center, New York, NY 10032, USA
- * Correspondence: eboccardo@usp.br (E.B.); faguayo@med.uchile.cl (F.A.)

Received: 22 May 2020; Accepted: 1 June 2020; Published: 15 July 2020



Abstract: A subset of oral carcinomas is etiologically related to high-risk human papillomavirus (HR-HPV) infection, with HPV16 being the most frequent HR-HPV type found in these carcinomas. The oncogenic role of HR-HPV is strongly dependent on the overexpression of E6 and E7 oncoproteins, which, in turn, induce p53 and pRb degradation, respectively. Additionally, it has been suggested that HR-HPV oncoproteins are involved in the regulation of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), inducing cancer progression and metastasis. Previously, we reported that HPV16 E7 oncoprotein promotes Pirin upregulation resulting in increased epithelial–mesenchymal transition (EMT) and cell migration, with Pirin being an oxidative stress sensor and activator of NF- κ B. In this study, we demonstrate the mechanism by which HPV16 E7-mediated Pirin overexpression occurs by promoting EGFR/PI3K/AKT1/NRF2 signaling, thus causing PIR/NF- κ B activation in oral tumor cells. Our results demonstrate a new mechanism by which E7 contributes to oral cancer progression, proposing PIR as a potential new therapeutic target.

Keywords: papillomavirus; pirin; NF- κ B; oncoprotein; oral; cancer

1. Introduction

Human papillomavirus (HPV) is a double-stranded DNA virus with approximately 8000 base pairs and exclusive epithelial tropism. HPV is the most common sexual infection found in the general population, affecting both women and men. Mucosal HPV types are classified according to their capacity to induce malignant transformation in high-risk HPV (HR-HPV) or low-risk HPV (LR-HPV). HR-HPVs are involved in the development of almost 100% of cervical carcinomas worldwide [1,2]. Additionally, these viruses are etiologically involved in the development of other anogenital tumors and head and neck cancers (HNCs), including oropharyngeal (OPCs) and oral carcinomas (OC) [3–5] with HPV16 being the most prevalent in HPV-associated carcinomas [6].

It is known that HR-HPV oncogenic potential is related to the overexpression of E6 and E7 proteins, which in turn, mediate the degradation of p53 and pRb tumor suppressor proteins, respectively [7,8]. However, a plethora of E6 and E7 activities independent of p53 and pRb have been described [9], one example being that both E6 and E7 are involved in chronic oxidative stress (OS), DNA damage and genomic instability in HNC cells [10]. Particularly, HR-HPV E7 accelerates the turnover of claspin, which is involved in the regulation of DNA damage signaling [11]; other partners of E7 include p21 [12] and p27 [13], participating in cell cycle arrest during epithelial differentiation. E7 also interacts with the so-called “pocket proteins”, such as p107 and p130, which positively regulate the cell cycle by joining to E2F4 and E2F5 proteins, respectively [14]. Additionally, HPV16 E7 has been involved in the regulation of EGFR/PI3K/AKT signaling pathway [15,16], controlling cell cycle, survival, metabolism, motility, and genomic instability [17]. In this respect, it has been reported that HPV16 E7 promotes cell migration and metastasis in an AKT-dependent manner [18]. Notably, it is estimated that approximately 50% of patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC), the most common histological type of OC, show lymph node metastasis at the moment of clinical diagnosis [19,20]. However, it remains unclear how HR-HPV is involved in OSCC progression and metastasis, with limited related studies regarding HR-HPV tumor progression in this anatomical region.

Previously, we reported that HPV16 E7 is involved in Pirin (encoded by *PIR* gene) overexpression, which is an OS sensor and activator of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) [21]. Upon NF- κ B activation, Pirin increases epithelial–mesenchymal transition (EMT) and cell migration in HeLa, a HR-HPV positive cell line [22]. The NF- κ B pathway is composed of homo or heterodimers of five proteins belonging to the REL oncogene family, these proteins being p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (Rel A), Rel B and c-Rel [23]. Accordingly, the NF- κ B pathway is recognized by its key role in inflammation and innate immune response, plus, it is related with tumor progression and increased cell migration [24]. However, conflicting data are found regarding the role of HR-HPV and viral oncogenes in NF- κ B activation. Moreover, although factors involved in such differences are unclear [25–27], it seems that NF- κ B is activated in a cell type-dependent manner [28]. Here, we addressed the role of signaling pathways involved in HPV16 E7-mediated PIR/NF- κ B activation and oral cell migration, finding that HPV16 E7 promotes the activation of the EGFR/PI3K/AKT/NRF2 signaling pathway, in turn stimulating PIR-mediated NF- κ B activation in oral cancer cells.

2. Results

2.1. HPV16 E7 Oncoprotein Upregulates the Levels of Pirin in Oral Cells

Floor of mouth squamous cell carcinoma (SCC143) cells were transduced with HPV16 pLXSNE7 or pLXSN (empty) vector. Cell colonies were pooled and named SCC143/E7 and SCC143/V, respectively. The levels of E7 transcripts and protein were evaluated by RT-PCR and Western blot, respectively. As expected, E7 transcripts and protein were detected in SCC143/E7 cells and were not detected in SCC143/V cells (Figure S1A,B). In addition, E7 protein was capable of promoting pRb downregulation and cell proliferation, demonstrating the functional activity of this oncoprotein. Moreover, amphiregulin (AREG) upregulation by E7 was confirmed, as previously reported [29] (Figure S1C,D).

We observed that PIR at mRNA and protein levels were significantly increased in SCC143/E7 cells compared with control cells, as shown in Figure 1A,C. In addition, E7 knockdown by siRNA showed a significant decrease in Pirin levels, demonstrated by immunofluorescence in SCC143/E7 cells (Figure 1D). The functionality of siRNA for PIR or E7 knockdown is shown Figure S1E,F. Next, we decided to analyze the behavior of Pirin in the presence of ectopic E7 expression in a more physiological context, consisting of stratified epithelia. Therefore, we confirmed that Pirin was positively regulated in organotypic raft cultures established from oral keratinocyte of floor of mouth (OKF6-TERT2) cells transduced with HPV16 pLXSNE7 (Figure 1E,F). In addition, the functionality of E7 was confirmed by pRb downregulation in the rafts (Figure S2A). Moreover, the same Pirin response was observed in organotypic raft cultures established from human foreskin keratinocytes (HFK) overexpressing HPV16 E7. In addition, Pirin was upregulated to a lesser extent in organotypic cultures established from cells that expressed the E7 Δ 21-24 mutant, revealing that the pRb-binding site is important for E7-mediated PIR upregulation (Figure 1G). Taken together, these data strongly suggest that HPV16 E7 promotes an increase in PIR transcripts and Pirin levels in oral epithelial cells. Moreover, they show that this effect is associated, at least in part, with the integrity of sequences in E7 required to induce pRb degradation.

2.2. HPV16 E7 Promotes NF- κ B Activation

In order to evaluate NF- κ B activation by E7, the pHAGE/NF- κ B vector (Figure 2A) containing consensus NF- κ B response elements was transfected in both SCC143/E7 and SCC143/V cells. We observed a significant increase in luciferase activity, normalized against green fluorescent protein (GFP) in SCC143/E7 cells when compared with control cells (Figure 2B). To confirm the role of E7 oncoprotein and Pirin in NF- κ B activation, SCC143/E7 cells were co-transfected with both pHAGE/NF- κ B vector and specific siRNAs for E7 or PIR knockdown. We observed a significant and similar decrease in NF- κ B activation when both E7 or PIR siRNAs were used, suggesting that both E7 and Pirin are involved in NF- κ B activation (Figure 2C). To determine which proteins are involved in NF- κ B signaling pathway activation in the presence of E7, we used a proteomic approach (Figure S3), observing that SCC143/E7 cells strongly expressed NF- κ B-associated proteins. IRF5, IRF8, p-p65^{S529}, c-Rel and I κ B among others were positively regulated in the presence of E7. On the contrary, JNK1/2, IL-18Ra, CD40 and NF- κ B2 (the non-canonical NF- κ B pathway) among others, were negatively regulated (Figure 2D and Figure S4A). For further NF- κ B characterization, the specific activation of NF- κ B proteins in SCC143/E7 cells was evaluated by Western blot, where, in the presence of E7, an increase in nuclear levels of c-Rel and p65^{S529} (Figure 2E) and a decrease in cytoplasmic and nuclear levels of p65^{S536} was observed (Figure S4B,C). Taken together, these data suggest that HPV16 E7 promotes a Pirin-dependent canonical NF- κ B activation by a mechanism mediated by c-Rel and p65^{S529}.

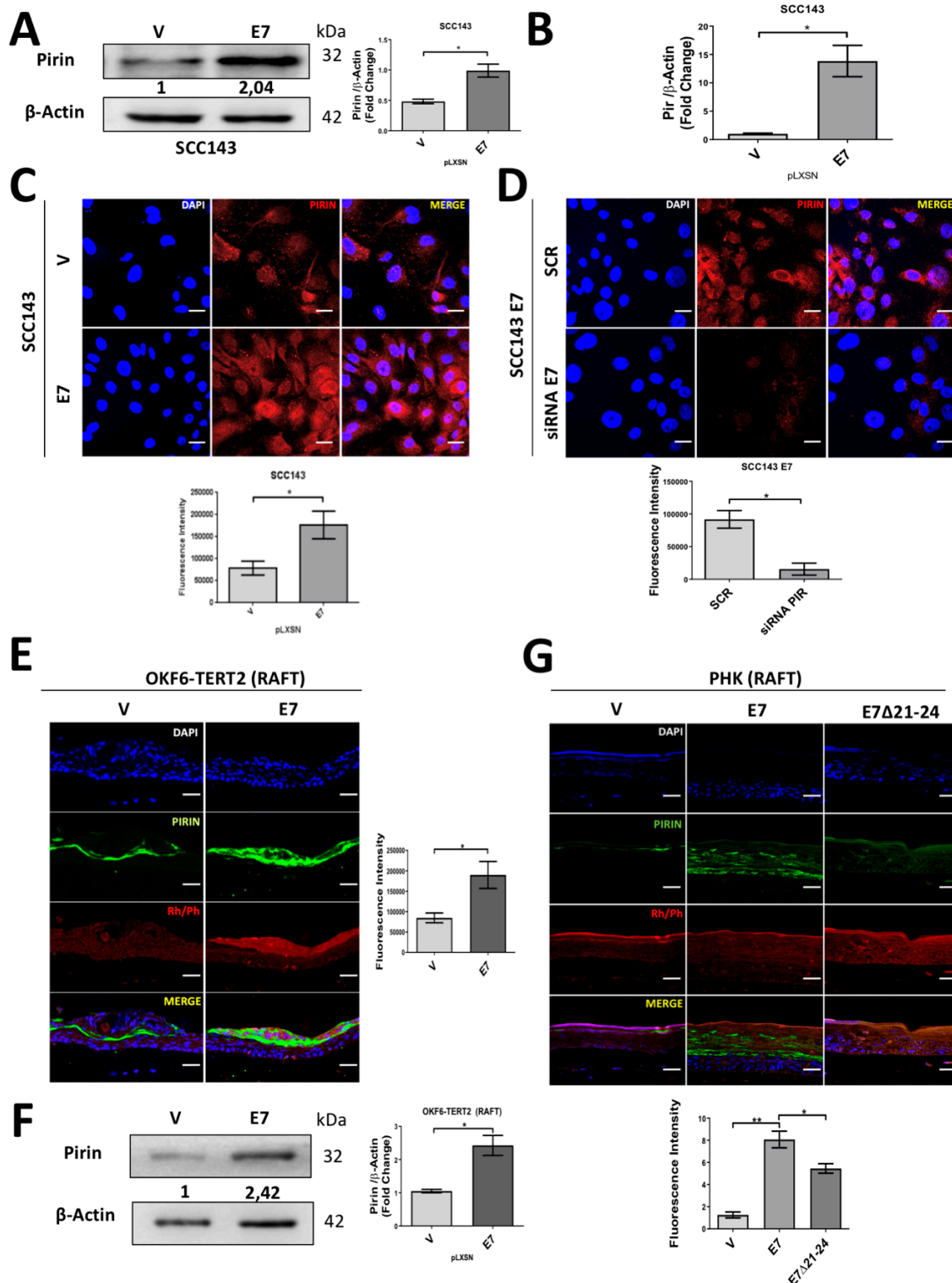


Figure 1. Human papilloma virus (HPV)16 E7 oncoprotein positively regulates the levels of Pirin protein in oral cells and foreskin keratinocytes. (A) Western blot to evaluate Pirin protein levels in SCC143/E7 and SCC143/V cells using β -actin as a loading control. The graphs represent a densitometric analysis of three independent Western blots for each protein normalized by β -actin. (B) RT-qPCR was performed for the normalized PIR transcript with the β -actin transcript. (C) Indirect immunofluorescence (IFI) reveals an increase in Pirin levels in SCC143/E7 cells. Scale bar: 10 μ m. (D) IFI performed on SCC143/E7 cells previously transfected with control siRNA (SCR) and E7 siRNA to evaluate Pirin protein. Scale bar: 10 μ m. (E) IFI performed on OKF6/TERT2 V and E7 oral organotypic raft culture cells to evaluate

Pirin protein. Scale bar: 35 μ m. (F) Western blot to evaluate Pirin protein levels in organotypic raft cultures established from OKF6/TERT2 V and OKF6/TERT2 E7 oral cells. (G) IFI performed in human foreskin keratinocytes (HFK)-expressing E7, E7 Δ 21-24 and the control with the empty vector; graph represents fluorescence analysis. Scale bar: 35 μ m. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM); average of three independent experiments, conducted in triplicate. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (Mann–Whitney test). Rhodamine Phalloidin (Rh/Ph).

2.3. HPV16 E7 Induces EGFR/PI3K/AKT1 Signaling for PIR/NF- κ B Activation

To further investigate the signaling pathways involved in Pirin-dependent NF- κ B activation by E7, we decided to analyze the activation state of MAPK and PI3K pathway components in cells expressing HPV16 E7. For this purpose, we used a phosphoproteomic approach to evaluate 27 phosphorylated MAPK and PI3K/AKT proteins (Figure S5). We observed that phosphorylated proteins positively regulated in the presence of HPV16 E7 were AKT1, P70, GSK3B, TOR, p38a, p38b, RSK3, p53, RSK2, CREB and GSK3A. Alternatively, the phosphorylated form of JNK, ERK and p38g proteins were negatively regulated (Figure 3A and Figure S6A). The observed increase in some specific phosphorylated proteins was confirmed by Western blot (Figure S6B). In addition, we detected increased levels of total and phosphorylated EGFR upon ectopic E7 expression (Figure 3B). In organotypic raft cultures established from OKF6-TERT2 oral cells, we confirmed that E7 expression was associated with increased EGFR and AKT1^{S473} proteins levels (Figure 3C,D). A similar increase in AKT1^{S473} levels was observed in organotypic cultures of PHK expressing wild type E7. However, this was not observed in rafts established from PHK transduced with E7 Δ 21-24 mutant, demonstrating the importance of the pRb-binding site in the regulation of AKT1 mediated by E7 (Figure S7A). Taken together, these results suggest that the EGFR/PI3K/AKT1 pathway is activated in the presence of HPV16 E7. In order to determine the role of this pathway during E7-mediated PIR/NF- κ B activation, pharmacologic inhibitors were used. Therefore, we used Gefitinib (EGFR inhibitor), LY294002 (PI3K inhibitor) and U0126 (ERK inhibitor) for 24 h. Although inhibition of EGFR, PI3K and ERK promoted a decrease in Pirin levels, the more significant decrease occurred when PI3K and ERK were inhibited (Figure 4A). It should be noted that an indirect inhibition of AKT1 was detected by using the U0126 inhibitor. To address the role of EGFR during PIR signaling, a time–response assay ranging between 0 and 24 h was carried out after Gefitinib exposure (Figure 4B). A significant decrease in Pirin levels after 3 h of Gefitinib exposure was observed. In order to confirm the role of PI3K/AKT1 pathway, a time–response assay between 0 and 24 h was carried out after LY294002 exposure. Under these conditions, we found a significant decrease in Pirin levels after 12 h of LY294002 exposure (Figure 4C). To evaluate the EGFR/PI3K/AKT1 signaling and PIR/NF- κ B activation by E7 in organotypic rafts, we used Gefitinib for 3 h and LY294002 for 12/24 h. We found a significant decrease in Pirin levels with both inhibitors in OKF6-TERT2 E7 organotypic rafts (Figure 4D,E). In addition, we observed a decrease in Pirin levels in PHK rafts treated with LY294002 at 24 h (Figure S7B). Finally, we observed a significant decrease in c-Rel and p65^{S529} levels and NF- κ B activation when using the inhibitor LY294002 for 12/24 h in organotypic OKF6/TERT2 E7 and SCC143/E7 cells, suggesting that PI3K/AKT signaling is involved in E7-induced NF- κ B activation (Figure 4F,G). These results reveal that HPV16 E7 promotes EGFR activation and PI3K/AKT1 signaling, which, in turn, promotes an increase in Pirin levels and canonical NF- κ B activation.

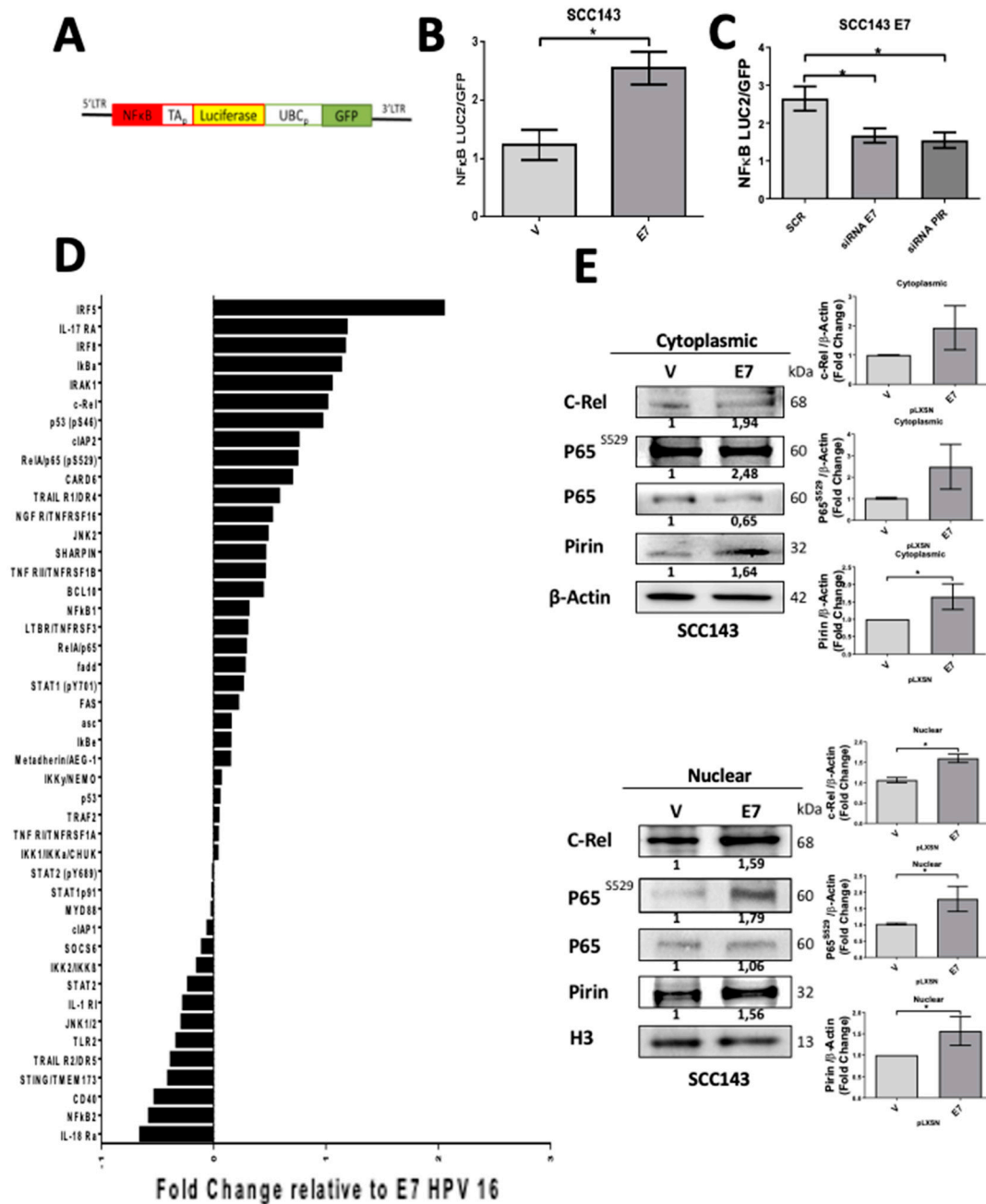


Figure 2. HPV16 HPV E7 promotes nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell (NF-κB) activation in oral cells. (A) pHAGE/NF-κB reporter vector map. (B) Luciferase activity normalized with GFP was evaluated in SCC143/E7 and SCC143/V cells transfected with the reporter vector pHAGE/NF-κB. (C) Luciferase activity normalized with GFP in SCC143/E7 cells co-transfected with pHAGE/NF-κB and siRNA for PIR or siRNA E7 knockdown and siRNA (SCR) as a control. (D) Protein array of NF-κB signaling pathway comparing the SCC143/V and SCC143/E7 cell extracts. Data were plotted in reference to the change that occurred in the presence of E7 compared to the empty vector control. (E) Western blot of nuclear and cytoplasmic protein fractions was performed to analyze the levels of Pirin, p65^{S529}, p65, and C-Rel. β-actin or H3 were used as a load control in SCC143 cells transduced with empty (pLXSN) or E7 constructs. The graphs represent a densitometric analysis of three independent Western blots (WBs) for each protein normalized against β-actin. Data are presented as the mean ± SEM; average of three independent experiments, conducted in triplicate. * *p* < 0.05 (Mann–Whitney test).

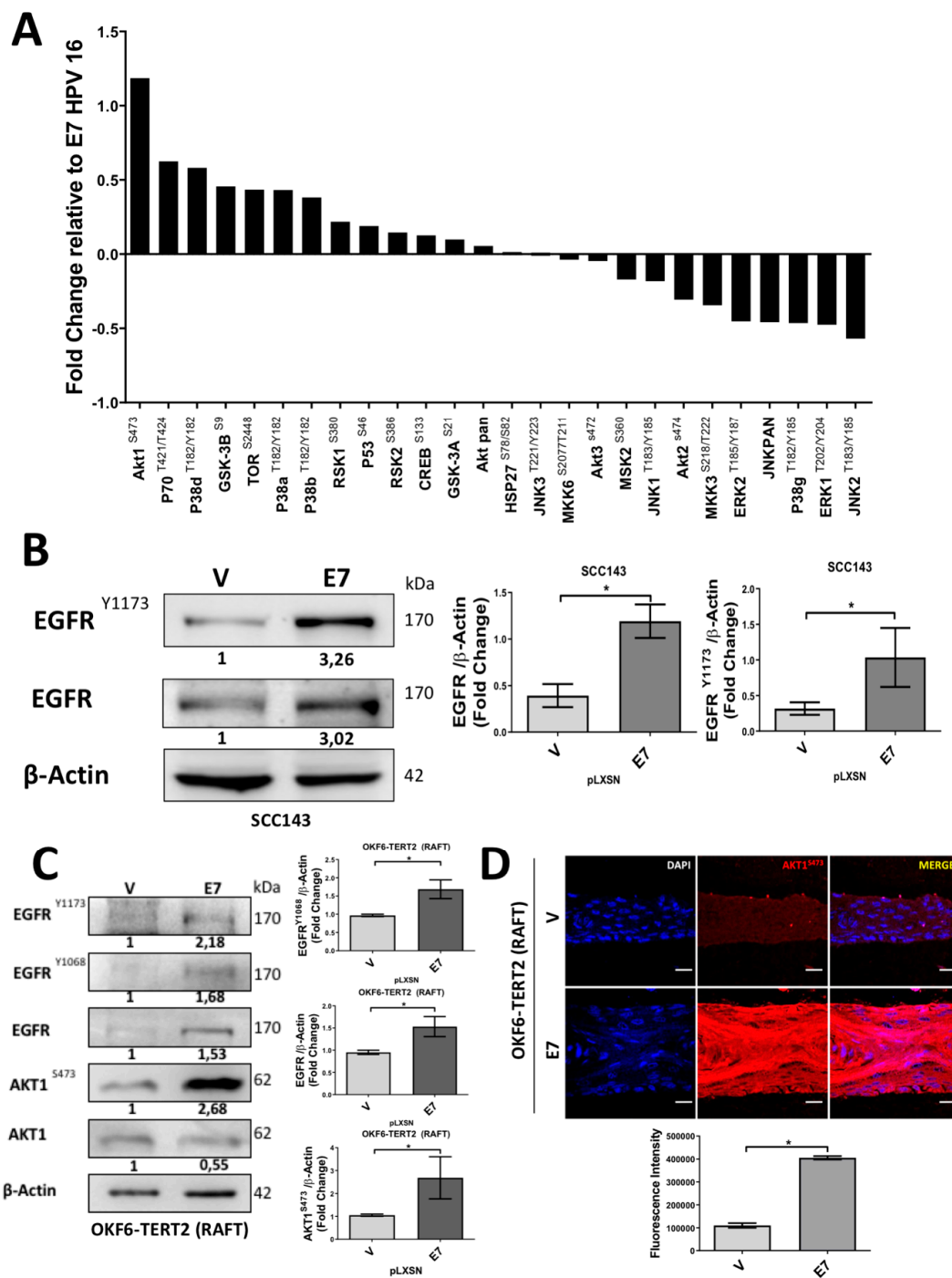


Figure 3. HPV16 HPV E7 protein induces EGFR/PI3K/AKT signaling. (A) Protein array of the MAPK and AKT pathways comparing the SCC143/V and SCC143/E7 cell extracts. Data were plotted in reference to the change that occurred in the presence of E7 compared to the empty vector control. (B) Western blot performed to check the levels of total EGFR, pEGFR^{Y1173} and β-actin used as load control in SSC143/E7 and SSC143/V cells. The graphs represent a densitometric analysis of three independent assays. (C) WBs were performed with protein extracts from OKF6-TERT2 cell organotypic cultures, the levels of total EGFR, pEGFR^{Y1173}, pEGFR^{Y1068}, AKT1, pAKT1^{S473}, pRb, Pirin and β-actin, used as load controls, were analyzed. (D) IFI reveals an increase in AKT1^{S473} in OKF6-TERT2 E7 organotypic cultures. The graph represents the fluorescence analysis. Scale bar: 15 μm. Data are presented as the mean ± SEM; average of three independent experiments, conducted in triplicate. * *p* < 0.05 (Mann–Whitney test).

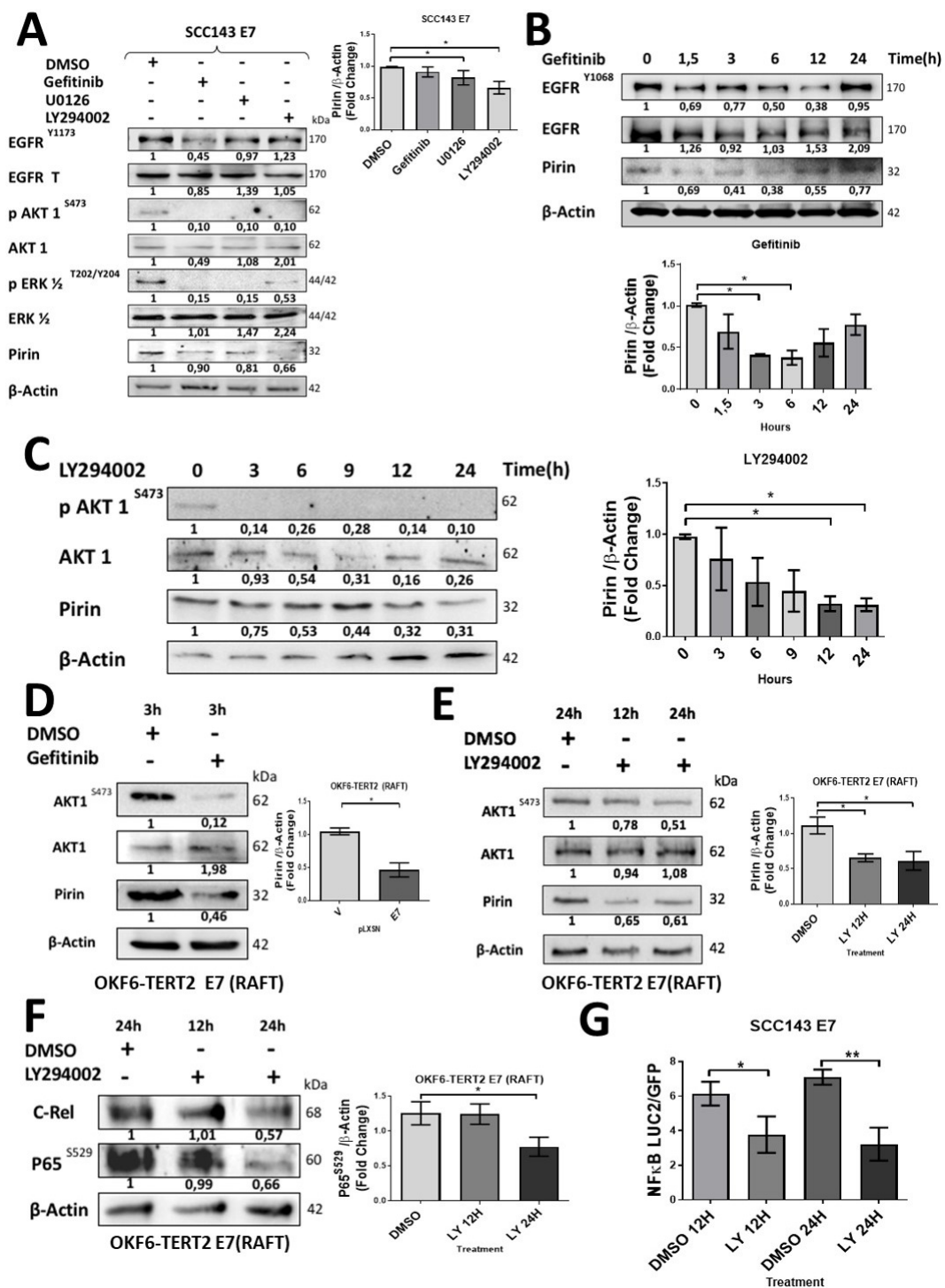


Figure 4. HPV16 HPV E7 induces EGFR/PI3K/AKT1 signaling for PIR/NF-kB activation in oral cells. (A) Western blot was performed with protein extracts from SCC143/E7 cells previously exposed to Gefitinib (EGFR), U0126 (ERK) and LY294002 (PI3K) inhibitors for 24 h. The levels of total EGFR, pEGFR^{Y1173}, AKT1, pAKT1, ERK, pERK, Pirin and β-actin used as load control were analyzed. The graphs represent a densitometric analysis of three independent WBs for Pirin normalized against β-actin. (B) Time-response assay by exposure to Gefitinib for 1.5 to 24 h in SCC143/E7 cells. The levels of total EGFR, pEGFR^{Y1068}, Pirin and β-actin used as load control were analyzed. The graph represents a densitometric analysis of three independent experiments. (C) Time-response assay by exposure to

10 μ M LY294002 for 3 to 24 h in SCC143/E7 cells. The levels of total AKT1, pAKT1, Pirin and β -actin used as load control were analyzed. The graph represents densitometric analysis of three independent experiments. (D) Western blot to evaluate AKT1, pAKT1, Pirin protein levels in organotypic raft cultures established from OKF6/TERT2 E7 oral cells treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) or Gefitinib for 3 h (β -actin used as load control were analyzed). (E) Western blot to evaluate AKT1, pAKT1, Pirin protein levels in OKF6/TERT2 E7 oral organotypic raft culture cells treated with DMSO or 10 μ M LY294002 for 12 or 24 h (β -actin used as load control were analyzed). (F) Western blot to evaluate c-Rel and p65^{S529} protein levels in organotypic raft cultures established from OKF6/TERT2 E7 oral cells treated with DMSO or 10 μ M LY294002 for 12 or 24 h (β -actin used as load control were analyzed) (G) Luciferase activity normalized against GFP was evaluated in SCC143/E7 cells transfected with the reporter vector pHAGE/NF- κ B treated with DMSO or 10 μ M LY294002 for 12 or 24 h. Data are presented as the mean \pm SEM; average of three independent experiments, conducted in triplicate. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (ANOVA test). LY294002 (LY).

2.4. HPV16 E7 Activates PIR-Promoter through NRF2 Transcription Factor in Oral Cells

In order to evaluate the E7-dependant transcriptional activation of PIR, we developed a construct in which the PIR promoter (−341 nt to +559 nt) was inserted upstream of the firefly luciferase reporter gene (luc2) open reading frame (pmiR-GLO/pPIR). After cell transfection with the pmiR-GLO/pPIR construct, we observed that SCC143/E7 cells showed a significant increase in luciferase activity when compared with SCC143/V cells (Figure 5A). Moreover, by using an interfering RNA for E7 knockdown or LY294002 inhibitor for 12 h, we observed a significant decrease in luciferase activity, suggesting that E7 and PI3K/AKT are involved in transcriptional activation of the PIR gene promoter (Figure 5B,C). To determine relevant transcription factors potentially involved in the E7-mediated PIR promoter activation, four mutants in the PIR promoter region were synthesized by using the PROMO 3.0 software. Considering that the E2F family of factors are released by E7-induced degradation of pRb and NRF2 is involved in the regulation of PIR transcript levels [30], we constructed E2F1- and NRF2 (antioxidant response elements (ARE))-binding site mutants in the PIR promoter, as shown in Figure 5D. We verified that the ARE site allowing NRF2 binding is relevant for inducing E7-mediated PIR promoter activation (Figure 5D, right). Then, establishing, in a timely manner, that the NRF2 factor is responsible for increasing PIR promoter activity, a chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was performed. We analyzed the c-Jun and c-Fos proteins components of the AP1 transcription factor, since there is a 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) response element (TRE) site very close to the ARE site. In addition, AP1 is a recognized transcription factor potentially regulated by the PI3K/AKT pathway. Accordingly, ChIP test results showed that the recruitment of NRF2/RNA Pol II into the PIR promoter in the presence of E7 is increased approximately 3.5-fold in respect to the control. In addition, c-Jun and c-Fos were not significantly recruited into the PIR promoter in the presence of E7 (Figure 5E). Moreover, a decrease in the recruitment of NRF2/RNA Pol II in the PIR promoter was shown when the cells were incubated with LY294002 inhibitor for 24 h (Figure 5F). Finally, a significant increase in NRF2 levels was observed in OKF6-TERT2 and SCC143 cells expressing E7 (Figure 5G). Taken together, these data demonstrate that HPV16 E7 oncoprotein promotes NRF2 transcription factor recruitment to the ARE site into the PIR promoter in oral cancer cells.

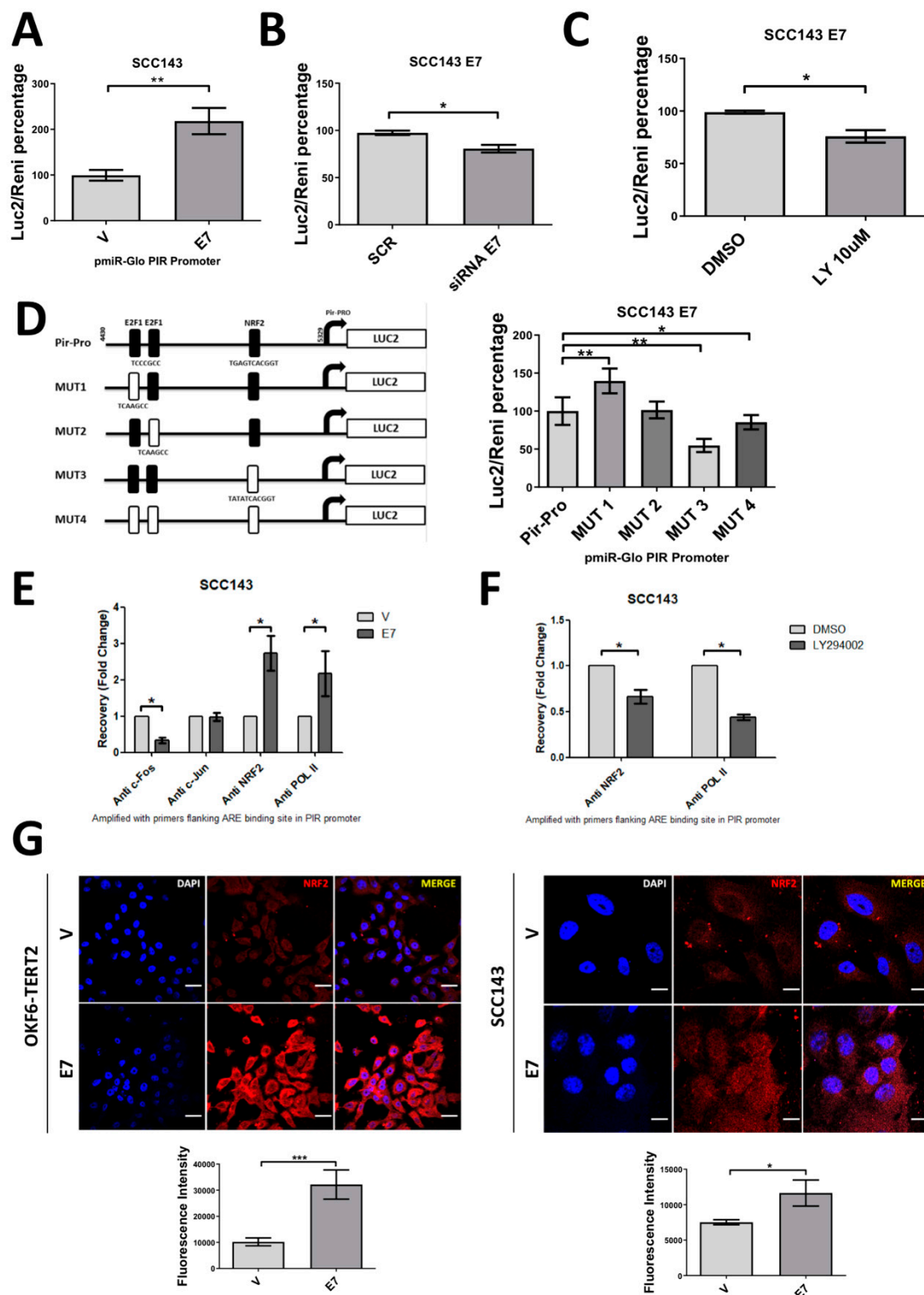


Figure 5. HPV16 HPV E7 promotes PIR-Promoter activation through NRF2 transcription factor in oral cells. (A) Luciferase activity was measured in SCC143/V and SCC143/E7 cells previously transfected with pmiR-GLO/pPIR vector for 18 h (Renilla activity was used as a normalizer). (B) Luciferase activity was measured in SCC143/E7 cells previously co-transfected with pmiR-GLO/pPIR vector and a scrambled

siRNA (SCR) or siRNA E7. Luciferase activity was measured 18 h post-transfection. (C) Luciferase activity was measured in SCC143/E7 cells previously transfected with pmiR-GLO/pPIR vector and treated with 10 μ M LY294002 for 12 h (Renilla activity was used as normalizer). (D) The PIR promoter was mutated as indicated in the map; each mutant was cloned into the pmiR-GLO vector and designated as 1, 2, 3 and 4. Luciferase activity was measured in each of the mutants in SCC143/E7 cells (Renilla activity was used as normalizer). (E) ChIP assay performed in SCC143/E7 and SCC143/V cells, precipitation was performed by using c-Jun, c-Fos, NRF2 and RNA Pol II antibodies. (F) ChIP performed in SCC143/E7 cells treated with DMSO or 10 μ M LY294002 for 12 h; precipitation was performed with NRF2 and RNA Pol II antibodies. (G) IFI reveals the increase in NRF2 in oral cells expressing HPV16 E7. Scale bar: 10 μ m for OKF6-TERT2 cells and 5 μ m for SCC143 cells. Data are presented as the mean \pm SEM; average of three independent experiments, conducted in triplicate. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (ANOVA test).

2.5. HPV16 E7-Mediated Pirin Overexpression Positively Regulates Cell Migration and Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT)

To evaluate the consequences of E7-mediated Pirin overexpression, we studied migration and EMT in oral cells, finding that HPV16 E7 expression significantly increased transmigration in SCC143 cells and OKF6-TERT2 (Figure 6A and Figure S8A). Evaluating the role of E7, p65 and Pirin in increased cell migration, a transwell assay was carried out in SCC143/E7 and squamous cell carcinoma of the oral lateral tongue (SCC47) (HPV16-positive cell line) cells previously transfected with a siRNA for E7, p65 or PIR knockdown, with the functionality of corresponding siRNA shown in Figures S1E and S1F. We observed a significant decrease in cell migration after E7, p65 and PIR knockdown when compared with those cells transfected with a scrambled sequence (Figure 6B,C and Figure S8B). To further confirm the role of Pirin overexpression, SCC143 oral cells were transfected with pcDNA 3.1+C–eGFP and pcDNA 3.1+C–eGFP–PIR. We confirmed ectopic expression of eGFP and eGFP–Pirin protein by Western blot (Figure 6D). Moreover, endogenous Pirin levels were evaluated by Western blot, observing similar levels in both conditions (eGFP and eGFP–Pirin), indicating that there are no differences in basal protein expression (Figure S2B). Consecutively, a significant increase in cell transmigration was observed in the presence of Pirin overexpression related to the control (Figure 6E). Finally, levels of EMT biomarkers such as E-cadherin and N-cadherin were evaluated, observing a significant decrease in E-cadherin and a significant increase in N-cadherin proteins in cells overexpressing Pirin with respect to the control (Figure 6F). These results suggest that both E7 and PIR are involved in the increased transmigration ability and EMT of oral epithelial cells.

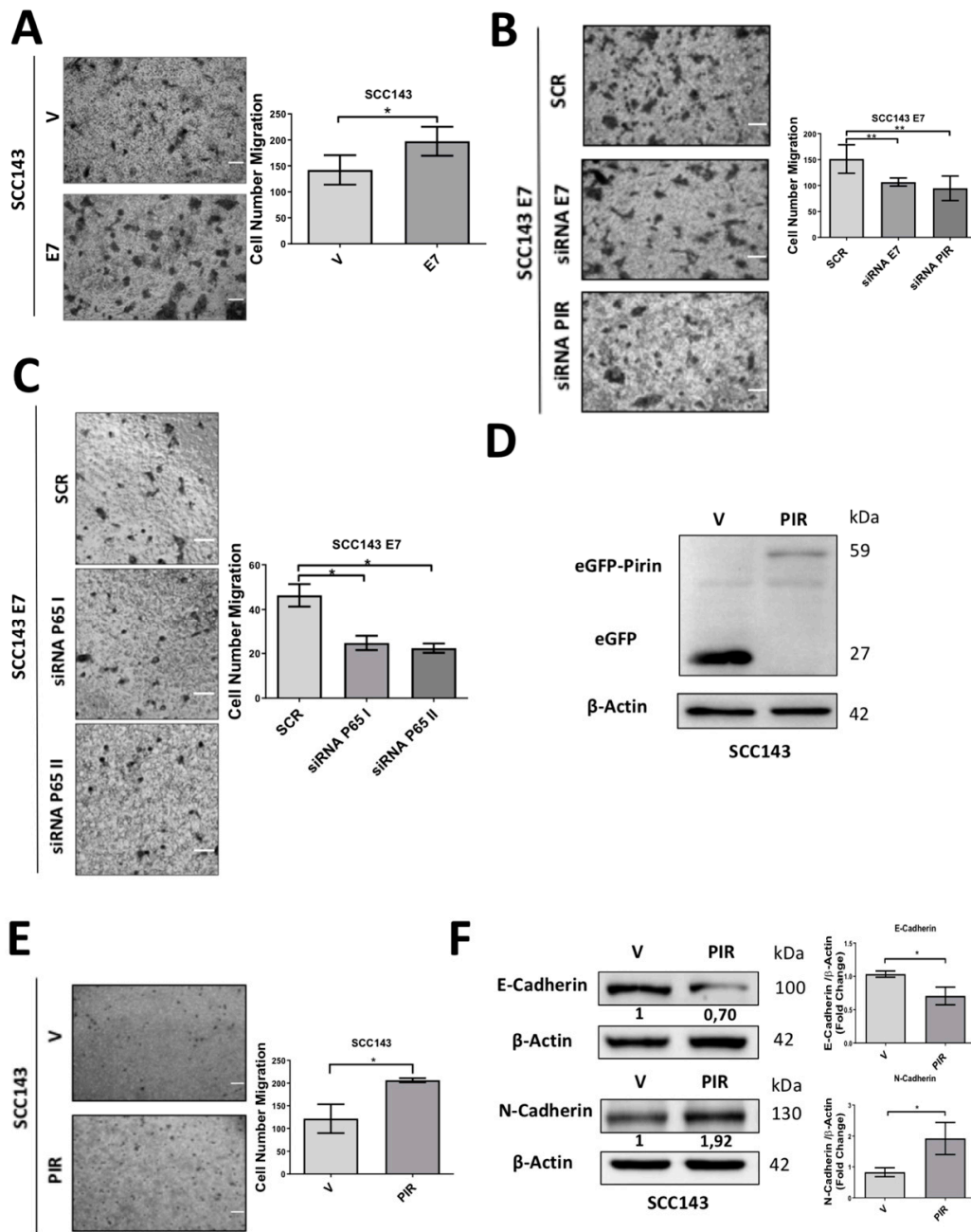


Figure 6. HPV16 E7 expression and PIR induces migration of oral cells. (A) A migration assay in SCC143/E7 and SCC143/V cells was carried out for 7 h using fibronectin pretreated transwells, scale bar 25 μ m. (B) A migration assay performed on SCC143/E7 cells previously transfected with control siRNA (SCR), siRNA PIR or HPV16 siRNA E7 was carried out for 7 h using fibronectin pretreated transwells, scale bar 25 μ m. (C) A migration assay performed on SCC143/E7 cells previously transfected with control siRNA (SCR) and siRNA I-II p53 was carried out for 7 h using fibronectin pretreated transwells, scale bar 25 μ m. (D) Western blot against eGFP performed for V corresponding to the empty vector (pcDNA 3.1–eGFP) and PIR corresponding to the vector containing the PIR sequence linked to eGFP (pcDNA 3.1–eGFP–PIR) transfected in SCC143 oral cell. (E) A migration assay in SCC143 V (pcDNA 3.1–eGFP) and SCC143 PIR (pcDNA 3.1–eGFP–PIR) cells was carried out for 7 h using fibronectin pretreated transwells. Scale bar: 40 μ m. (F) Analysis of E-cadherin and N-cadherin protein levels, which were normalized with the expression of β -actin. The graphs represent a densitometric analysis of three independent assays. Data are presented as the mean \pm SEM; average of three independent experiments, conducted in triplicate. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (Mann–Whitney test).

3. Discussion

It has been widely reported that HPV oncoproteins promote DNA damage and OS involved in cancer initiation and progression [31–33]. However, the role of E7 oncoprotein in oral cancer progression has not been sufficiently addressed, although it is critical for immortalization and cell transformation [34]. In fact, HR-HPV E7 promotes pRb degradation, an important event in virus-mediated carcinogenesis, which is remarkable as pRb knockout mice do not completely recapitulate HR-HPV E7-mediated alterations, suggesting additional E7 effects [35,36]. Additionally, we have reported that HPV16 E7 is involved in *PIR* positive regulation [21] and, interestingly, the translated protein, Pirin, harbors an Fe²⁺-binding site functioning as an OS sensor in NF- κ B activation and cancer progression, whose overexpression is mediated by factors promoting OS.

In the present study, we have addressed some mechanisms by which *PIR*/NF- κ B is activated by HPV16 E7 oncoprotein in oral epithelial tumor cells, finding that it positively regulates the levels of *PIR* transcripts and Pirin in 2D and 3D oral cell cultures. These results confirm those previously reported by us in other tumor epithelial cell lines including cervical cancer [21]. Next, we identified signaling pathways positively regulating Pirin, finding HPV16 E7 and Pirin involvement in NF- κ B activation, although controversy still exists regarding HPV oncoprotein effect on NF- κ B activation [25,37]. The canonical NF- κ B pathway is triggered by factors promoting I κ B degradation by the NF- κ B Essential Modulator (NEMO) and I κ B kinases (IKK1 and IKK2), leading to the nuclear translocation of the p50/RelA heterodimer [38]. Alternatively, the RelB/p52 NF- κ B complex is predominant in the non-canonical NF- κ B pathway and depends on inducible p100 processing rather than I κ B α degradation [39]. Prominent activators of NF- κ B signaling are tumor necrosis factor receptor (TNFR) family members, lipopolysaccharides (LPS) and EGFR [40,41], in fact, EGFR and NF- κ B are described as co-directional activation signaling pathways in some carcinomas, such as HNCs [42]. Once activated, NF- κ B regulates the expression of genes involved in different cellular events, including EMT and cancer progression, a process that is strongly related to E-cadherin downregulation and N-cadherin upregulation [43–45]. Pirin is relevant during NF- κ B signaling, working as transcriptional factor with Rel-A protein (p65) [46] and, importantly, Pirin has also been described as an EMT regulator by decreasing E-cadherin expression [22,47]. Data from the NF- κ B array demonstrates that IRF5, IL17 Ra and IRF8 were the most positively regulated proteins in the presence of E7, all were involved in interferon response regulation, although possible interactions with HPV oncoproteins have not been reported. Furthermore, we found that C-Rel, I κ B and p65^{S529}, among others, are positively regulated by HPV16 E7. Additionally, it is understood that HPV16 E7 positively regulates EGFR at RNA and protein level in foreskin keratinocytes [15] and, interestingly, we found that oral cells expressing E7 increased three times the total EGFR and pEGFR^{Y1173} levels. Moreover, amphiregulin (AREG), an EGFR ligand, was positively regulated upon E7 expression in oral cells, confirming that epithelial cells ectopically express HPV oncoproteins [29] and proposing EGFR signaling in E7-mediated effects in oral cells.

We also characterized signaling pathways involved in E7-mediated *PIR* upregulation, (using a MAPK/PI3K array) finding the activation of AKT1 and p38 in oral cells expressing HPV16 E7. In fact, AKT1^{S473}, p-p70 s6 kinase, p-CREB, p-GSK3b and p-mTOR levels were significantly increased in E7-expressing oral cells; moreover, alpha, beta and gamma p38 levels were upregulated by at least 30% compared to the control cells. Likewise, E7 involvement in PI3K/AKT1 activation and was relevant during the progression of cervical cancer [48], while, regarding the EGF pathway, Gefitinib incubation did not alter Pirin levels. However, a time–response analysis showed Pirin levels decreased at 3 and 6 h after Gefitinib exposure, and in determining the function of the PI3K/AKT1 pathway, Pirin decreased progressively using the LY294002 inhibitor, proposing EGFR and PI3K/AKT1 involvement in E7-induced *PIR* regulation. Moreover, LY294002 inhibition of the NF- κ B pathway in tumor and non-tumor oral cells demonstrates PI3K/AKT1 participation, although, constitutively, active Akt promotes κ B kinase inhibitor (IKK) activation [49]. As the IKK complex is phosphorylated by AKT1, promoting nuclear NF- κ B translocation (composed of c-Rel and p65^{S529}), our study confirmed positive regulation by HPV E7, while the effector p65^{S529} is activated by AKT and can provide cellular survival

properties [50]. Importantly, at the molecular level, NF- κ B pathway transcription factors, among others, are dependent on the ability/affinity to bind with DNA; therefore, theoretically, Pirin is a coregulator of NF- κ B, facilitating p65 binding to the κ B gene [46]. In another study, Gustin JA et al. [51] observed that LY294002 decreased NF- κ B binding to DNA in different cell models and, likewise, we demonstrated PI3K/AKT1's potential involvement in NF- κ B activation via E7, inducing *PIR* promoter transcription.

We also identified transcription factors involved in the activation of the *PIR* promoter. Two candidates were NRF2 and E2F1 transcription factors, which show an affinity for ARE- and E2F1 DNA-binding sites, respectively. In fact, the E2F transcription factor is related to E7 oncoprotein expression, pRb degradation and the release of E2F to promote cell cycle progression [52]. Alternatively, although no reports exist regarding HPV and NRF2, they are potential biomarkers for cervical cancer progression [53]. Interestingly, NRF2 is a master regulator of *PIR* promoter activity and has been raised as a possible mediator [30]. In fact, NRF2 and RNA Polymerase II were recruited to the *PIR* promoter, in the presence of E7; however, other intermediaries related to Pirin upregulation maybe involved. Previously, it has been reported that the PI3K/AKT1 pathway regulates NRF2 levels through glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3B) phosphorylation [54–56] for subsequent NRF2 release from the GSK3B–CULIN3 complex, targeting it for proteasome-mediated degradation [57]. Thus, by increasing the PI3K/AKT1 pathway activation by HPV16 E7, correspondingly, NRF2 levels are expected to increase.

Finally, we found that E7-mediated *PIR* overexpression is associated with increased oral epithelial cell migration, decreased E7, p65 or *PIR* knockdown, effects which are similarly seen with foreskin keratinocytes [18]. In summary, our study proposes that the activation of the EGFR/PI3K/AKT1/NRF2 pathway by HPV16 E7 leads to *PIR*/NF- κ B activation in tumor oral epithelial cells, resulting in an increased cell migration, with the possibility remaining that this mechanism is involved in other epithelial cell models (Figure 7). We believe that components of these signaling pathways constitute potential therapeutic targets of oral cancer associated to HR-HPV infection.

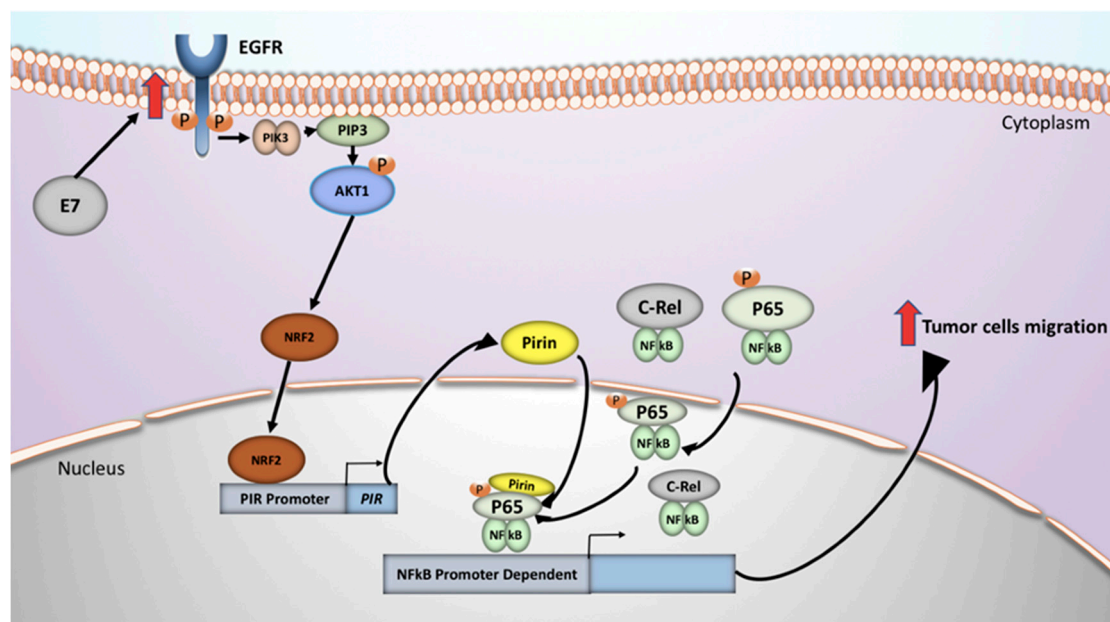


Figure 7. A proposed model of signaling pathways involved in HPV16 E7-mediated Pirin upregulation in oral epithelial cells.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Lines, Culture, Vectors, Transfections and Transductions

Floor of mouth squamous cell carcinoma (SCC143) and squamous cell carcinoma of the oral lateral tongue (SCC47) cells were obtained from the University of Pittsburgh [58]; PA317 (CRL-9078™) retrovirus packaging cells were obtained from ATCC®; keratinocyte of floor of mouth (OKF6-TERT2) and Primary Human Foreskin Keratinocytes (PHK) were kindly donated by Dr. Luisa Lina Villa (Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo (SP), Brazil). Cells were incubated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Fremont, CA, USA) with antibiotics (100 units/mL penicillin, 100 g/mL streptomycin) and maintained at 37 °C with 5% CO₂ atmosphere. For the subculture, cells were incubated with trypsin for 3–5 min and maintained with a new medium containing FBS (Hyclone, Fremont, CA, USA). Cells were periodically tested for mycoplasma contamination. For cell transductions, pLXSN and pLXSNHPV16E7 recombinant vectors were kindly donated by Dr. Massimo Tommasino, from the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France. Retroviral particles were obtained from PA317 packaging cells previously transfected with pLXSN or pLXSNHPV16E7 plasmids for 24 h at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂ with lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. SCC143 cells were stably transduced with retroviral particles and were then selected by 0.3 mg/mL Geneticin (GIBCO, Carlsbad, CA, USA). For Pirin overexpression, pcDNA 3.1+C-eGFP and pcDNA 3.1+C-eGFP-Pirin vectors were purchased from GenScript Biotech Corp. (Piscataway, NJ, USA).

4.2. Organotypic Raft Cultures

PHK and OKF6-TERT2 raft cultures were prepared as described elsewhere [59]. Raft cultures were allowed to differentiate for 14 days, the treatment with inhibitors was performed at 12 and 24 h. The rafts were then harvested, fixed in formalin and paraffin embedded.

4.3. Cell Viability Assay

Cells were cultured to 80–90% confluence in a 96-well flat-bottomed microtiter plate with DMEM 1× medium with 10% SFB and were treated with 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 and 1 mg/mL Geneticin (GIBCO, Carlsbad, CA, USA) for 7 days. Finally, 20 µL MTS (Promega Corporation, Madison, WI, USA) was added to each well, the plate was incubated for 3 h at 37 °C and absorbance was measured at 492 nm using a microplate reader (BioTek Instruments, Inc., headquartered in Winooski, VT, USA).

4.4. Luciferase and NF-κB Activation Assays

A pmiR-GLO construct containing the PIR promoter downstream from the luciferase reporter gene and mutants were purchased from GenScript Biotech Corp (Piscataway, USA). The ApE-A plasmid editor software was used (M. Wayne Davis). A reporter system was developed by using the expression vector pmiR-GLO (Promega, Madison, WI, USA). The native PGK promoter was deleted by *Bgl*II and *Apal* digestion and the synthesized PIR promoter region (900 bp between 4430 and 5329 on chromosome X) by GenScript was inserted upstream of the firefly luciferase reporter gene (*luc2*). Renilla luciferase activity was used to normalize the firefly luciferase activity. The pHAGE NF-κB-TA-LUC-UBC-GFP-W was acquired from Addgene depositor, Darrell Kotton Lab. SCC143 cells were plated in triplicate in a 24-well plate to 70–80% confluency and were transfected with 500 ng pmiR-GLO or pHAGE luciferase reporter plasmid with 2 µL Lipofectamine 2000 (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) per well. The culture medium was replaced by Opti-MEM Reduced Serum. After 18 h incubation, the transfection mixture was replaced by complete culture medium for 24 h. The cells were rinsed in 1× Phosphate Buffered Saline (PBS) and harvested with Passive Lysis Buffer in a new tube on ice. Luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA),

according to the manufacturer's protocol. For the NF- κ B activation assay, the culture plate was divided to measure fluorescence intensity in a flow cytometer, FACSCantoA.

4.5. Proteome Profiler Phospho MAPK and NF- κ B Array

SCC143 cells were grown to 90% confluence in 10-cm plates and subjected to serum starvation for 24 h. Cells were collected by centrifugation and washed once with PBS. The washed cell pellets were suspended in extraction lysis buffer and incubated for 20 min at 4 °C. The protein concentration was determined by the Pierce BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA), according to the manufacturer's instructions. Screening for different proteins in cell lysates was performed with the Proteome Profiler Human NF- κ B Pathway Array and Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Pathway Array (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Horseradish peroxidase substrate (Millipore Corporation, Burlington, VT, USA) was used to detect the protein signal and data were captured by exposure in ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For semi-quantitative analysis, ImageJ software version 1.52a (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) was used.

4.6. Western Blot

Total protein was extracted from cells with 1× RIPA lysis buffer (Abcam, Cambridge, UK) containing both protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). Cells were incubated at 4 °C for 10 min, sonicated on ice for 20 s and centrifuged at 14,000× *g* for 15 min. The proteins were quantified by using the Pierce BCA Protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) and 30 µg of the extract was loaded per well. Following 12% PAGE–SDS, the proteins were transferred to a Hybond-P ECL membrane (Amersham, Piscataway, NJ, USA) using 20 mM Tris, 150 mM glycine pH 8.3, in 20% methanol with the semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated for 1 h at room temperature with blocking buffer (5% bovine serum albumin, Tris-buffered saline (TBS)–0.5% Tween 20, pH 7.6) and incubated overnight at 4 °C with primary antibody against Pirin (ab51360), pRb (ab24), EGFR (ab32562), EGFR^{Y1173} (ab32578), EGFR^{Y1068} (ab40815), p65^{S536} (ab86299), β -actin (ab6276) (Abcam, Cambridge, UK), C-Rel (MAB2699), p65^{S529} (MAB7624) (R&D System, Minneapolis, MN, USA), HPV16 E7 (SC6981), pAKT1-2-3 (SC514032), PHOSPHO AKT^{S473} (4060S), NRF2 (4060S) (Cell Signaling, Danver, MA, USA), ERK (SC514302), pERK (SC136521), AREG (SC5797), pMTORC (SC293133), MTORC (SC517464), Histone H3 (SC56616), GSK3 (SC7291), p65 (SC8008), (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) diluted 1/1000 in Tris-buffered saline–Tween 20 (TBS–T20). Membranes were washed three times in TBS–T20 and incubated with secondary anti-IgG-labeled peroxidase (Anti Mouse 554002; BD Pharmingen; BD Biosciences and Anti Rabbit SC2004; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA). After three washes in TBS–T20, immune complexes were detected using the ECL system (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfon, UK) according to the manufacturer's instructions. Detailed information can be found at Figures S9–S17.

4.7. Pharmacological Inhibition Assay

For inhibition experiments, SCC143 cells were serum-depleted for 24 h and incubated with 100 µM Gefitinib (EGFR inhibitor) (Sigma, St. Louis, MO, USA), 6.3 µM UO126 (ERK inhibitor) (Sigma, St. Louis, MO, USA) or 10 µM LY294002 (PI3K inhibitor) (Sigma, St. Louis, MO, USA) for times ranging from 1.5 to 24 h. Then, cells were washed twice with 1× PBS (pH 7.4), dried and lysed with 1× RIPA buffer (Abcam, Cambridge, UK) containing both protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland).

4.8. Immunofluorescence and Confocal Microscopy

The cellular location of Pirin and E7 proteins was determined by using indirect immunofluorescence (IF). Transduced cells were grown to confluence in Chamber Slides, washed twice with 1× PBS (pH 7.4), dried and incubated for 5 min with cold Paraformaldehyde (PFA). Next, cells were incubated with 3% bovine seroalbumin (BSA) for 1 h at room temperature, followed by incubation with a primary

monoclonal anti-specific protein antibody diluted in 1× PBS (1:50), according to the manufacturer's instructions. The fixed cells were washed three times for 5 min at room temperature and incubated with a secondary fluorescein isothiocyanate (FITC) or Texas red-labeled anti-IgG antibody (1:100) (Santa Cruz biotechnology, Dallas, TX, USA). After three washes with 1× PBS, cells were incubated for 15 min with Rhodamine Phalloidin (Rh/Ph) and DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and finally visualized in a C2 Plus confocal microscope.

4.9. Reverse Transcriptase–Quantitative Polymerase Chain Reaction

RNA from cell lines was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. After chloroform purification and isopropanol precipitation, the RNA was suspended in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water and stored at -80°C . Next, the RNA was treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA) at 37°C for 60 min and then incubated with RQ1 DNase Stop Solution for 10 min. cDNA was prepared using a 20 μL -reaction volume containing DNase treated RNA (2 μg), 1 U RNase inhibitor (Promega, Madison, WI, USA), 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ random primers (Promega, Madison, WI, USA), 2 mM dNTPs (Promega, Madison, WI, USA) and 10 U Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). The reaction mixture was incubated for 1 h at 37°C . cDNA was subjected to amplification by real-time quantitative PCR using specific primers for transcripts (Table 1) in a Rotor-Gene 6000 apparatus (Corbett Research, Sydney, Australia). The conditions of amplification were as follows: 95°C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 55°C for 20 s and extension at 72°C for 20 s. The dissociation curve was carried out by increasing the temperature from 70 to 90°C , by 0.5°C at each step. The reaction was performed using 2 × SYBR Green Master Mix (Bioline, London, UK), 0.4 μM primers, 10.5 μL RNase-free water and 1 μL cDNA in a 25 μL final volume. Specific primers and amplification conditions were adjusted for each RNA sequence. The relative copy number of each sample was calculated by the $2^{(-\Delta\Delta\text{C(T)})}$ method and Rotor-Gene software. Endogenous β -actin mRNA levels were used for the normalization of RNA expression. All reactions were performed in duplicate.

Table 1. Primers used in this study

Region	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Amplicon (bp)
PIR	TCAAATTGGACCCAGGAGCC	TCCAAGCACTGCTGTGTGAT	131
E7 HPV16	CAATATTGTAATGGGCTCTGTCC	ATTGCAACCAGAGACAACCTGAT	120
ARE CHIP	GTGAGCATCTCTCCCGGCA	TGACCGCCAGCATTCCCTCA	347
β -actin	AGCGAGCATCCCCAAAG	GGGCACGAAGGCTCATCA	289

4.10. Cell Migration Assays

For the three-dimensional migration assay, the bottom side of a transwell upper chamber (Corning, New York, NY, USA) was coated with 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fibronectin and incubated overnight at 4°C . A total of 15,000 SCC143 cells were seeded in non-supplemented medium inside the upper chamber, and 500 μL of complete medium was added to the plate. Cells were allowed to migrate for 7 h. Migrated cells were fixed and stained with crystal violet/methanol solution. Non-migrated cells were removed with a cotton tip. Migrated cells were counted in eight fields for each experiment.

4.11. Chromatin Immunoprecipitation

SCC143 cells stably transfected with pLXSN and pLXSNE7 were grown in 10 cm dishes until reaching 80% confluence. SCC143-E7 cells were treated with 10 μM LY294002 for 12 h and were subsequently incubated with 1% formaldehyde at room temperature to elicit DNA-protein cross-linking. DMSO-treated cells were included as controls. After 2 min of incubation, 0.4 M glycine was added to quench the reaction. Next, the cross-linked cells were lysed with a scraper and harvested by

centrifugation at 8000 rpm for 20 min at room temperature. After centrifugation, supernatants were removed, pellets were washed twice in Triton X-100 buffer (50 mM Tris, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0.1% Triton X-100; 0.1% Nonidet P-40; 0.01% SDS) and subjected to three sonication pulses (1 min each/pulse). Afterwards, the volume of sonicated chromatin was adjusted to 4 mL with Triton buffer–SDS 0.1%, then cleared by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min. Chromatin was stored in 800- μ L aliquots at -80°C . Immunoprecipitation of NRF2, Pol II, c-JunS73 and c-FosT232 bound to chromatin was carried out by using a mixture composed by 80 μ L of pre-blocked immunoglobulin G (IgG)-magnetic beads, an equal volume of chromatin dissolved in Triton buffer and 3 μ L of specific antibody. Before immunoprecipitation with IgG beads, 10% of each sample was saved as an input fraction. The mixture was incubated overnight at 4°C in a rotary shaker. The next day, the beads were pelleted by centrifugation at 12,000 RPM for 1 min. Five hundred μ L of supernatant was washed four times in 400 μ L of Triton buffer and once with PBS buffer pH 7.4. After each wash, the liquid suspensions were transferred to fresh tubes. Immunocomplexes were de-cross-linked by overnight incubation at 85°C in 125 μ L of elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS, 2.5% dithiothreitol). Free DNA was purified from the solution by phenol–chloroform extraction. After precipitation by the addition of 3M Sodium acetate and cold ethanol, DNA was washed in 70% ethanol and dried for 20 min using a Speedvac Rotation System. Finally, purified DNA was suspended in 12 μ L of Tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA) for PCR analysis. PCR amplifications were performed using a RotorGene 6000 system with an initial hold at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C , 1 min at 58°C , and 2 min at 72°C and then one cycle of 4 min at 72°C . Primers that span the antioxidant response elements (ARE) were used for qPCR analysis.

4.12. Statistical Analysis

A comparison of means between two groups was performed using a Mann–Whitney test, whereas comparisons between multiple groups were performed using one-way ANOVA and Tukey’s post-hoc test. Data were analyzed using GraphPad Prism version 7 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). *p*-values of less than 0.05 were considered statistically significant.

5. Conclusions

Our data allow us to propose that activation of the EGFR/PI3K/AKT1/NRF2 pathway by HPV16 E7 leads to PIR/NF- κ B activation in oral tumor epithelial cells, finally leading to an increased cell migration, although a possibility still exists that this mechanism is involved in other epithelial cell models. It is tempting to speculate that components of these signaling pathways may constitute therapeutic targets of oral cancer associated to HR-HPV infection.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/7/1904/s1>, Figure S1: Toxicity of G418, expression and functionality of E7 in oral cells, Figure S2: Phenotypic changes associated with HPV16 E7 and Pirin levels in SCC143 cells, Figure S3: Human NF- κ B Pathway Array Coordinates, Figure S4: HPV16 E7 expression induces changes in NF- κ B pathway in oral cells, Figure S5: Human MAPK Pathway Array Coordinates, Figure S6: HPV16 E7 expression induces changes in MAPK and AKT pathways in oral cells, Figure S7: The binding site of pRb and the PI3K/AKT1 pathway are necessary in the regulation of AKT1 and E7-mediated Pirin expression in PHKs, Figure S8: HPV16 E7, Pirin and p65 expression induce migration in oral cells, Figure S9: Unprocessed images for WB results (Pirin, EGFR, pRb, AREG and EGFRY1173) of SCC143 cells, corresponding to the Figure 1A, Figure 3B and S1C, Figure S10: Unprocessed images for WB results (Pirin, EGFR, pRb, EGFRY1173, EGFRY1068, AKT1 and AKT1S473) of OKF6-TERT2 (Raft) cells, corresponding to Figure 1F, S2A and Figure 3C, Figure S11: Unprocessed images for WB results (Pirin, EGFR, ERK1/2, p-ERK1/2T202/T204, EGFRY1173, AKT1 and AKT1S473) of SCC143 cells, corresponding to Figure 4A, Figure S12: Unprocessed images for WB results (Pirin, EGFR, EGFRY1068, AKT1 and AKT1S473) of SCC143 cells, corresponding to Figure 4B,C, Figure S13: Unprocessed images for WB results (Pirin, c-Rel, P65S529, AKT1 and AKT1S473) of OKF6-TERT2 (Raft) cells corresponding to Figure 4D–F, Figure S14: Unprocessed images for WB results (Pirin, c-Rel, P65S529 and P65) corresponding to Figure 2E, Figure S15: Unprocessed images for WB results (GFP, E-Cadherin and N-Cadherin) corresponding to Figure 6D,F, Figure S16: Unprocessed images for WB results (E7, Pirin and P65S536) corresponding to the Figures S1A, S2B and S4B, Figure S17: Unprocessed images for WB results (ERK1/2, AKT1, MTORC, pERK1/2, pMTORC, pAKT1-2-3 and pAKT1) corresponding to the Figure S6B.

Author Contributions: D.C.-B. designed and carried out almost all of the experiments included in this study, discussion and writing. J.P.M., N.G.-V., R.B., V.d.S.L. and K.D.-C. performed additional experiments and discussion. O.L., J.C.T., G.M.C., A.H.C., M.A.H., E.M. contributed to the experimental design, provided reagents and results discussion. F.A. conceived this study and F.A./E.B. designed experiments, discussed the results, wrote and corrected the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fondecyt Grant 1161219 (F.A.), 1200656 (G.M.C.) and 1160889 (J.C.T.), CONICYT-FONDAP 15130011 (A.H.C., F.A.), Conicyt scholarship 21180901 (D.C.-B.), Fondecyt Post-Doctoral 3190744 (J.P.M.) and 3190723 (R.B.), FAPESP 2010/20002-0 (E.B.) and 2017/02997-3 (E.B.).

Acknowledgments: We thanks to University of Pittsburgh for providing SCC143 and SCC47 cell lines. We would also like to thank Luisa Lina Villa (Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo (SP), Brazil) for providing OKF6-TERT2 cells. We would also like to thank David Cox for his editing contribution.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hausen, H.Z. Papillomaviruses in the causation of human cancers—A brief historical account. *Virology* **2009**, *384*, 260–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hausen, H.Z. Human papillomavirus & cervical cancer. *Indian J. Med. Res.* **2009**, *130*, 209. [[PubMed](#)]
- Herrero, R.; Castellsagué, X.; Pawlita, M.; Lissowska, J.; Kee, F.; Balaram, P.; Rajkumar, T.; Sridhar, H.; Rose, B.; Pintos, J.; et al. Human papillomavirus and oral cancer: The International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, *95*, 1772–1783. [[CrossRef](#)]
- Kreimer, A.R.; Clifford, G.M.; Boyle, P.; Franceschi, S. Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2005**, *14*, 467–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wakeham, K.; Kavanagh, K. The Burden of HPV-Associated Anogenital Cancers. *Curr. Oncol. Rep.* **2014**, *16*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kreimer, A.R.; Clifford, G.M.; Snijders, P.J.; Castellsagué, X.; Meijer, C.J.; Pawlita, M.; Viscidi, R.; Herrero, R.; Franceschi, S. HPV16 semiquantitative viral load and serologic biomarkers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer* **2005**, *115*, 329–332. [[CrossRef](#)]
- Scheffner, M.; Werness, B.A.; Huibregtse, J.M.; Levine, A.J.; Howley, P. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **1990**, *63*, 1129–1136. [[CrossRef](#)]
- Heck, D.V.; Yee, C.L.; Howley, P.; Munger, K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4442–4446. [[CrossRef](#)]
- Yeo-Teh, N.S.L.; Ito, Y.; Jha, S. High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Marullo, R.; Werner, E.; Zhang, H.; Chen, G.Z.; Shin, N.M.; Doetsch, P.W. HPV16 E6 and E7 proteins induce a chronic oxidative stress response via NOX2 that causes genomic instability and increased susceptibility to DNA damage in head and neck cancer cells. *Carcinogenesis* **2015**, *36*, 1397–1406. [[CrossRef](#)]
- Spardy, N.; Covella, K.; Cha, E.; Hoskins, E.E.; Wells, S.I.; Duensing, A.; Duensing, S. Human papillomavirus 16 E7 oncoprotein attenuates DNA damage checkpoint control by increasing the proteolytic turnover of claspin. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 7022–7029. [[CrossRef](#)]
- Funk, J.O.; Waga, S.; Harry, J.B.; Espling, E.; Stillman, B.; Galloway, D.A. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genome Res.* **1997**, *11*, 2090–2100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zerfass-Thome, K.; Zwerschke, W.; Mannhardt, B.; Tindle, R.; Botz, J.W.; Jansen-Dürr, P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* **1996**, *13*, 2323–2330.
- Hu, T.; Ferril, S.; Snider, A.; Barbosa, M. In-vivo analysis of hpv e7 protein association with prb, p107 and p130. *Int. J. Oncol.* **1995**, *6*, 167–174. [[CrossRef](#)]
- Akerman, G.S.; Tolleson, W.H.; Brown, K.L.; Zyzak, L.L.; Mourateva, E.; Engin, T.S.; Basaraba, A.; Coker, A.L.; Creek, K.E.; Pirisi, L. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cooperate to increase epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels, overcoming mechanisms by which excessive EGFR signaling shortens the life span of normal human keratinocytes. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 3837–3843.

16. Menges, C.W.; Baglia, L.A.; Lapoint, R.; McCance, D.J. Human Papillomavirus Type 16 E7 Up-regulates AKT Activity through the Retinoblastoma Protein. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 5555–5559. [[CrossRef](#)]
17. Fruman, D.; Rommel, C. PI3K and cancer: Lessons, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 140–156. [[CrossRef](#)]
18. Charette, S.T.; McCance, D.J. The E7 protein from human papillomavirus type 16 enhances keratinocyte migration in an Akt-dependent manner. *Oncogene* **2007**, *26*, 7386–7390. [[CrossRef](#)]
19. Tankere, F.; Camproux, A.; Barry, B.; Guedon, C.; Depondt, J.; Gehanno, P.; Tankere, F. Prognostic Value of Lymph Node Involvement in Oral Cancers: A Study of 137 Cases. *Laryngoscope* **2000**, *110*, 2061–2065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Sano, D.; Myers, J.N. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 645–662. [[CrossRef](#)]
21. Carrillo, D.; Muñoz, J.P.; Huerta, H.; Leal, G.; Corvalán, A.H.; León, O.; Calaf, G.M.; Urzúa, U.; Boccardo, E.; Tapia, J.C.; et al. Upregulation of PIR gene expression induced by human papillomavirus E6 and E7 in epithelial oral and cervical cells. *Open Biol.* **2017**, *7*, 170111. [[CrossRef](#)]
22. Komai, K.; Niwa, Y.; Sasazawa, Y.; Simizu, S. Pirin regulates epithelial to mesenchymal transition independently of Bcl3-Slug signaling. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 738–743. [[CrossRef](#)]
23. Pires, B.; Silva, R.C.M.C.; Ferreira, G.M.; Abdelhay, E. NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. *Genes* **2018**, *9*, 24. [[CrossRef](#)]
24. Mitchell, J.P.; Carmody, R.J. NF-κB and the Transcriptional Control of Inflammation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2018**, *335*, 41–84. [[CrossRef](#)]
25. Vandermark, E.R.; DeLuca, K.A.; Gardner, C.R.; Marker, D.F.; Schreiner, C.N.; Strickland, D.; Wilton, K.M.; Mondal, S.; Woodworth, C. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins alter NF-κB in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF-κB promotes cell growth and immortalization. *Virology* **2012**, *425*, 53–60. [[CrossRef](#)]
26. Morgan, E.L.; Macdonald, A. Autocrine STAT3 activation in HPV positive cervical cancer through a virus-driven Rac1—NFkappaB—IL-6 signalling axis. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007835. [[CrossRef](#)]
27. Tummers, B.; Goedemans, R.; Pelascini, L.P.L.; Jordanova, E.S.; Van Esch, E.M.G.; Meyers, C.; Melief, C.J.M.; Boer, J.M.; Van Der Burg, S.H. The interferon-related developmental regulator 1 is used by human papillomavirus to suppress NFkappaB activation. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6537. [[CrossRef](#)]
28. Oeckinghaus, A.; Hayden, M.; Ghosh, S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 695–708. [[CrossRef](#)]
29. He, C.; Mao, D.; Hua, G.; Lv, X.; Chen, X.; Angeletti, P.C.; Dong, J.; Remmenga, S.W.; Rodabaugh, K.J.; Zhou, J.; et al. The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression. *EMBO Mol. Med.* **2015**, *7*, 1426–1449. [[CrossRef](#)]
30. Brzóska, K.; Stępkowski, T.; Kruszewski, M. Basal PIR expression in HeLa cells is driven by NRF2 via evolutionary conserved antioxidant response element. *Mol. Cell. Biochem.* **2014**, *389*, 99–111. [[CrossRef](#)]
31. Williams, V.M.; Filippova, M.; Filippov, V.; Payne, K.J.; Duerksen-Hughes, P.J. Human Papillomavirus Type 16 E6* Induces Oxidative Stress and DNA Damage. *J. Virol.* **2014**, *88*, 6751–6761. [[CrossRef](#)]
32. Prati, B.; Abjaude, W.D.S.; Termini, L.; Morale, M.; Herbster, S.; Longatto-Filho, A.; Nunes, R.A.L.; Camacho, L.C.C.; Rabelo-Santos, S.H.; Zeferino, L.C.; et al. Three Prime Repair Exonuclease 1 (TREX1) expression correlates with cervical cancer cells growth in vitro and disease progression in vivo. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 351. [[CrossRef](#)]
33. Gorrini, C.; Harris, I.; Mak, T.W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 931–947. [[CrossRef](#)]
34. Hausen, H.Z. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4677–4681.
35. Balsitis, S.J.; Sage, J.; Duensing, S.; Munger, K.; Jacks, T.; Lambert, P.F. Recapitulation of the Effects of the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncogene on Mouse Epithelium by Somatic Rb Deletion and Detection of pRb-Independent Effects of E7 In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 9094–9103. [[CrossRef](#)]
36. Shin, M.-K.; Sage, J.; Lambert, P.F. Inactivating all three rb family pocket proteins is insufficient to initiate cervical cancer. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 5418–5427. [[CrossRef](#)]

37. Branca, M.; Giorgi, C.; Ciotti, M.; Santini, D.; Di Bonito, L.; Costa, S.; Benedetto, A.; Bonifacio, D.; Paba, P.; Accardi, L.; et al. Upregulation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus or disease outcome in cervical cancer. *Diagn. Cytopathol.* **2006**, *34*, 555–563. [[CrossRef](#)]
38. Hayden, M.; Ghosh, S. Shared Principles in NF-kappaB Signaling. *Cell* **2008**, *132*, 344–362. [[CrossRef](#)]
39. Sun, S.C. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res.* **2011**, *21*, 71–85. [[CrossRef](#)]
40. Jiang, T.; Grabiner, B.; Zhu, Y.; Jiang, C.; Li, H.; You, Y.; Lang, J.; Hung, M.C.; Lin, X. CARMA3 is crucial for EGFR-Induced activation of NF-kappaB and tumor progression. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 2183–2192. [[CrossRef](#)]
41. Pan, D.; Jiang, C.; Ma, Z.; Blonska, M.; You, M.J.; Lin, X. MALT1 is required for EGFR-induced NF-kappaB activation and contributes to EGFR-driven lung cancer progression. *Oncogene* **2015**, *35*, 919–928. [[CrossRef](#)]
42. Li, Z.; Liao, J.; Yang, Z.; Choi, E.Y.; Lapidus, R.G.; Liu, X.; Cullen, K.J.; Dan, H. Co-targeting EGFR and IKK β /NF-kappaB signalling pathways in head and neck squamous cell carcinoma: A potential novel therapy for head and neck squamous cell cancer. *Br. J. Cancer* **2018**, *120*, 306–316. [[CrossRef](#)]
43. Chua, H.L.; Bhat-Nakshatri, P.; Clare, S.E.; Morimiya, A.; Badve, S.; Nakshatri, H. NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: Potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* **2006**, *26*, 711–724. [[CrossRef](#)]
44. Kang, B.-H.; Shu, C.; Chao, J.-K.; Lee, C.-H.; Fu, T.-Y.; Liou, H.-H.; Ger, L.-P.; Liu, P. HSPD1 repressed E-cadherin expression to promote cell invasion and migration for poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8932. [[CrossRef](#)]
45. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)]
46. Liu, F.; Rehmani, I.; Esaki, S.; Fu, R.; Chen, L.; De Serrano, V.; Liu, A. Pirin is an iron-Dependent redox regulator of NF-kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 9722–9727. [[CrossRef](#)]
47. Miyazaki, I.; Simizu, S.; Okumura, H.; Takagi, S.; Osada, H. A small-molecule inhibitor shows that pirin regulates migration of melanoma cells. *Nat. Methods* **2010**, *6*, 667–673. [[CrossRef](#)]
48. Zhou, Y.; Pan, Y.; Zhang, S.; Shi, X.; Ning, T.; Ke, Y. Increased phosphorylation of p70 S6 kinase is associated with HPV16 infection in cervical cancer and esophageal cancer. *Br. J. Cancer* **2007**, *97*, 218–222. [[CrossRef](#)]
49. Bai, D.; Ueno, L.; Vogt, P.K. Akt-Mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 2863–2870. [[CrossRef](#)]
50. Madrid, L.V.; Mayo, M.W.; Reuther, J.Y.; Baldwin, A.S. Akt Stimulates the Transactivation Potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappaB through Utilization of kappaB Kinase and Activation of the Mitogen-activated Protein Kinase p38. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 18934–18940. [[CrossRef](#)]
51. Gustin, J.A.; Ozes, O.N.; Akca, H.; Pincheira, R.; Mayo, L.D.; Li, Q.; Guzman, J.R.; Korgaonkar, C.K.; Donner, D.B. Cell Type-Specific Expression of the kappaB Kinases Determines the Significance of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling to NF-kappaB Activation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *279*, 1615–1620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Hausen, H.Z. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 690–698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ma, J.-Q.; Tuersun, H.; Jiao, S.-J.; Zheng, J.-H.; Xiao, J.-B.; Hasim, A. Functional Role of NRF2 in Cervical Carcinogenesis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Yun, S.-M.; Kim, Y.S.; Hur, D.Y. LMP1 and 2A Induce the Expression of Nrf2 Through Akt Signaling Pathway in Epstein-Barr Virus-Transformed B Cells. *Transl. Oncol.* **2019**, *12*, 775–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Li, Y.; Guo, Y.; Feng, Z.; Bergan, R.; Li, B.; Qin, Y.; Zhao, L.; Zhang, Z.; Shi, M. Involvement of the PI3K/Akt/Nrf2 Signaling Pathway in Resveratrol-Mediated Reversal of Drug Resistance in HL-60/ADR Cells. *Nutr. Cancer* **2019**, *71*, 1007–1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Reddy, N.M.; Potteti, H.R.; Vegiraju, S.; Chen, H.-J.; Tamatam, C.M.; Reddy, S.P. PI3K-AKT Signaling via Nrf2 Protects against Hyperoxia-Induced Acute Lung Injury, but Promotes Inflammation Post-Injury Independent of Nrf2 in Mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0129676. [[CrossRef](#)]
57. Rojo, A.I.; Sagarra, M.R.; Cuadrado, A. GSK-3beta down-Regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: Relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J. Neurochem.* **2008**, *105*, 192–202. [[CrossRef](#)]

58. White, J.S.; Weissfeld, J.L.; Ragin, C.C.R.; Rossie, K.M.; Martin, C.L.; Shuster, M.; Ishwad, C.S.; Law, J.C.; Myers, E.N.; Johnson, J.T.; et al. The influence of clinical and demographic risk factors on the establishment of head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol.* **2006**, *43*, 701–712. [[CrossRef](#)]
59. Valdano, M.B.; Cavatorta, A.L.; Morale, M.G.; Marzali, F.; Lino, V.D.S.; Steenbergen, R.D.M.; Boccardo, E.; Gardiol, D. Disc large 1 expression is altered by human papillomavirus E6/E7 proteins in organotypic cultures of human keratinocytes. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 453–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).