

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSGRADO



Mecanismo de activación del promotor lítico Zp de virus Epstein-Barr por componentes del humo de cigarrillo en células epiteliales orales.

CLAUDIA PATRICIA ARIAS CALVACHI

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE

MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA

Director de Tesis: Francisco Aguayo, Ph. D.

2023

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

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina,
que la Tesis de Magíster presentada por la candidata**

CLAUDIA PATRICIA ARIAS CALVACHI

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para
optar al Grado de Magíster en Microbiología en el Examen de Defensa de
Tesis rendido el día 13 de Abril de 2023.**

**Prof. Dr. Francisco Aguayo
Director de Tesis**

**Programa de Virología
ICBM
Facultad de Medicina,
Universidad de Chile**

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Ulises Urzúa

Prof. Dra. Daniela Gutiérrez

Prof. Dr. Fabien Magne

**Prof. Dra. Sandra Ampuero
Presidenta Comisión**

DEDICATORIA

A mis abuelitos Prof. Zoilita Fernández, Lic. Wilson Calvachi y Dr. Nicolás Arias por su amor infinito hacia mí y por su apoyo incondicional durante el inicio, transcurso y finalización de este período formativo. Me demostraron que el cariño no conoce de distancias.

A mis queridos padres, Dr. Pablo Arias e Ing. Patricia Calvachi por motivarme a crecer personalmente y académicamente. Espero de todo corazón poderles retribuir todo el tiempo y esfuerzo invertido en mi educación.

A mis hermanitas, María Isabel, Daniela, María Belén, Ana Paula y a cada uno de los miembros de mi familia por confiar en mí y acompañarme a la distancia en los logros y dificultades que surgieron durante el desarrollo de esta tesis.

A Maxie, por enseñarme que una casa con perritos es un hogar completo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiar cada uno de mis pasos hacia el logro de mis objetivos personales.

Al comité académico del Magíster en Microbiología por darme la oportunidad de formar parte de este prestigioso programa.

Al Dr. Francisco Aguayo por incluirme en su grupo de investigación, por sus enseñanzas y guía en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Jonás Chnaiderman por su acertada tutoría académica.

A la Dra. Sandra Ampuero, Dr. Ulises Urzúa, Dr. Fabien Magne, Dra. Daniela Gutiérrez, miembros de mi comisión evaluadora por su tiempo y retroalimentación en este trabajo de tesis.

Al Dr. Diego Carrillo y al Dr. Rancés Blanco por sus invaluable enseñanzas experimentales en la ejecución de este trabajo.

Al Dr. Edio Maldonado y al Dr. Diego Rojas por contribuir con su expertize en el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina.

Al Dr. Julio Tapia por facilitarme el uso del equipo de quimioluminiscencia.

Al Dr. Juan Pablo Muñoz por facilitarme la plataforma para elaborar gráficos.

Al Bq. Luis Lizama y al Sr. Cristian Moreno por su gentil colaboración para resolver problemas.

A la Dra. Aracelly Gaete y al Bq. César Navarrete.

A mis compañeros de laboratorio, porque aprendí más de ciencia a su lado.

A los docentes y estudiantes del programa de Virología.

Finalmente al financiamiento otorgado por el proyecto Fondecyt 1221033.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	15
1.INTRODUCCION.....	17
1.1 Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE).....	17
1.2 Factores de Riesgo.....	18
2. Virus Epstein-Barr	19
2.1 Taxonomía, estructura y biología.....	19
2.2 Epidemiología	21
2.3 Ciclo Replicativo del Virus Epstein-Barr en células epiteliales.....	21
2.4 Ciclo Replicativo del Virus Epstein-Barr en linfocitos B.....	23
2.5 Virus Epstein-Barr y alteraciones moleculares en COCE	24
2.6 Virus Epstein-Barr y Cáncer	25
2.7 Virus Epstein-Barr y COCE	26
2.8 Promotor Viral Zp y proteína Zebra.....	27
3. Humo del cigarrillo y alteraciones moleculares.....	28
3.1 Humo de Cigarrillo y Virus Epstein-Barr	30
3.2 Humo del cigarrillo y cánceres asociados	30
3.3 Virus Epstein- Barr y LUAD	31
HIPOTESIS.....	32
OBJETIVO GENERAL.....	32
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	32
MATERIALES Y METODOS.....	33
RESULTADOS.....	43

1. Estandarización de las condiciones experimentales	43
1.1 Actividad biológica de CHC en células orales	43
1.2 Ensayo de proliferación en células orales	44
1.3 Ensayo de viabilidad de células orales en presencia de CHC.....	45
1.4 Secuenciación del promotor viral Zp.....	46
1.5. Estandarización del vector dual pmir-GLO Zp en células orales	48
1.6 Actividad del promotor viral Zp.....	49
1.7 Mutantes de delección y mutante de sustitución	50
1.8 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	52
OBJETIVO ESPECÍFICO 2.....	54
2.1 Predicción Bioinformática	55
2.2 Identificación de genes relacionados al hábito tabáquico en pacientes con COCE	57
2.3 Identificación de genes relacionados al hábito tabáquico en pacientes con LUAD.....	63
OBJETIVO ESPECIFICO 3.....	68
3.1 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	68
DISCUSION.....	72
REFERENCIAS.....	79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura morfológica de VEB
- Figura 2.** Organización genómica de VEB
- Figura 3.** Ciclo lítico de VEB
- Figura 4.** Ciclo latente de VEB
- Figura 5.** Estructura del promotor Zp de VEB
- Figura 6.** Efectos moleculares frente a la exposición a HC
- Figura 7.** Actividad biológica del CHC en células orales
- Figura 8.** Ensayo de proliferación celular
- Figura 9.** Ensayo de viabilidad celular
- Figura 10.** Secuencia de nucleótidos del promotor Zp
- Figura 11.** Estructura del vector reportero dual pmir-GLO
- Figura 12.** Alineamiento de secuencias del promotor Zp entre las cepas B95.8 y NPCT090
- Figura 13.** Estandarización de la cantidad de vector reportero dual pmir-GLO a transfectar
- Figura 14.** El promotor Zp es activado por CHC en células orales
- Figura 15.** Estructura del promotor Zp *wild type* y de mutantes
- Figura 16.** Mutaciones en el promotor Zp disminuyen la actividad de luciferasa a CHC en células orales
- Figura 17.** Eficiencia de transfección por IFI en las células SCC-143
- Figura 18.** Eficiencia de transfección por IFI en las células CAL-27
- Figura 19.** Factores de transcripción y sitios de unión en el promotor Zp
- Figura 20.** Correlación de individuos con COCE e historial tabáquico
- Figura 21.** Correlación de individuos con LUAD e historial tabáquico
- Figura 22.** Expresión de la proteína c/EBP β en las células SCC-143 expuestas a DMSO y CHC

Figura 23. Expresión de la proteína c/EBP β en las células CAL-27 expuestas a DMSO y CHC

Figura 24. Secuencia de reconocimiento de la proteína c/EBP β en el promotor Z ρ

Figura 25. Reclutamiento de la proteína c/EBP β en el dominio ZV' del promotor Z ρ en células orales

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Predicción *in silico* de factores de transcripción y sus sitios de unión al promotor Zp mediante PROMO V 8.3

Tabla 2. Categorización de pacientes con COCE

Tabla 3. Niveles de expresión de los 23 FT en pacientes con COCE

Tabla 4. Categorización de pacientes con LUAD

Tabla 5. Niveles de expresión de los 23 FT en pacientes con LUAD

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descripción
COCE	Carcinoma oral de células escamosas
HT	Hábito tabáquico
VEB	Virus Epstein-Barr
CHC	Componentes del condensado de humo de cigarrillo
FT	Factor de transcripción
HC	Humo del cigarrillo
LUAD	Adenocarcinoma de pulmón
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
OMS	Organización mundial de la salud
CO	Cáncer de labio y cavidad oral
IARC	Agencia Internacional de Investigación del cáncer
ASR	Tasa estandarizada por edad
OR	Odds ratio
CYP1B1	Citocromo 1B1
HHV-4	Herpesvirus humano 4
ADN	Acido desoxiribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
IR1	Secuencia repetida interna 1
IR4	Secuencia repetida interna 4
U1	Secuencia única 1
U5	Secuencia única 5
TRs	Secuencias repetitivas terminales
T CD8 ⁺	Cúmulo de diferenciación 8
CD21	Receptor del complemento 2

EphA2	Receptor tirosin quinasa Efrina A2
ZRE	Elementos de respuesta de Zta
RRE	Elementos de respuesta de Rta
OryLyt	Origen de replicación lítica
EBNA	Antígeno nuclear de VEB
LMP	Proteína latente de membrana
EBER	ARN de VEB
BART	micro ARNs de VEB
TSG	Gen supresor de tumor
LOH	Pérdida de heterocigosidad
CpG	Citosina -fosfatidilguanosina
CDKs	Ciclina dependiente de quinasa
	Fosfatidil inositol 3 Kinasa / proteína kinasa B
NPC	Carcinoma nasofaríngeo
CGaVEB	Carcinoma gástrico asociado a virus Epstein-Barr
LB	Linfoma Burkitt
LH	Linfoma Hodking
Nk/T	Linfoma de células natural killer y T
XBP1	Proteína 1 de unión a la caja X
PKD	Proteína kinasa D
NNN	n-nitrosornicotina
NNK	4 metil nitrosamina 1-3 piridil 1 butanona
DDR	Vía de respuesta de daño al ADN
H-ras	Harvey Ras
HPV	Virus Papiloma humano
IgA	Inmunoglobulina A
VCA	Antígeno de la cápside mayor de VEB
SCLC	Carcinoma de pulmón de células pequeñas

NSCLC	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas
SQC	Carcinoma escamoso de pulmón
LUAD	Adenocarcinoma de pulmón
LCC	Carcinoma de células largas
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
EE.UU	Estados Unidos
SFB	Suero fetal bovino
CO ₂	Dióxido de carbono
PBS	Tampón fosfato salino
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
DMSO	Dimetilsulfóxido
ADN	Ácido desoxiribonucleico complementario
MMLV	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney
FD	Factor de dilución
PFA	Paraformaldehído
MUT 1	Mutante 1
MUT 2	Mutante 2
MUT 3	Mutante 3
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
PUC	Pontificia Universidad Católica de Chile
TCGA	The genome cancer atlas
HiSeq	Secuenciación de alto rendimiento
RSEM	Secuenciación del ARN por la maximización esperada
NF	No fumador

FA	Fumador actual
F+15	Ex fumador por más de 15 años
F-15	Ex fumador por menos de 15 años
SDS	Dodecilsulfato de sodio
ASB	Albúmina de suero bovino
TBS-T	Solución salina tris más tween 20
DTT	Ditiotreitol
NaOAc	Acetato de sodio
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Luc	Luciferasa de luciérnaga
hRLuc	Renila luciferasa
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
URL	Unidades relativas de luminiscencia
RE	Expectativa aleatoria
CECC	Carcinoma escamoso de cabeza y cuello
bZip	Región basica cremallera de leucina
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico

RESUMEN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el tipo más común de cáncer de cabeza y cuello y está fuertemente asociado al hábito tabáquico (HT). Sin embargo, factores adicionales pueden estar involucrados. En particular, el virus Epstein-Barr (VEB) es un herpesvirus ubicuo, el cual es el agente causal de carcinoma nasofaríngeo y de un subgrupo de adenocarcinomas gástricos y linfomas. Además, el VEB ha sido detectado en COCE, aunque su rol es desconocido. Hay evidencia que la proteína viral Zebra es expresada en tumores epiteliales asociados a VEB. Zebra es la reguladora del switch latente-lítico, cuyos transcritos son expresados desde el promotor Zp. En esta tesis, se planteó la hipótesis: “Los componentes del condensado del humo del cigarrillo (CHC) activan el promotor Zp de VEB a través del reclutamiento de factores de transcripción (FT) expresados en células epiteliales orales”. El primer objetivo fue evaluar la activación del promotor viral Zp de VEB y de mutantes de delección y sustitución por CHC en células epiteliales orales. Mediante ensayos de luciferasa usando el vector reportero dual pmir-GLO se encontró que Zp es activado después de la incubación de células orales CAL-27 y SCC-143 con 10 µg/mL y 50 µg/mL de CHC, respectivamente. Además, delecciones en las secuencias TTGCTA – TTGCAC/C reconocidas por la proteína c/EBP en los dominios ZIIIB y ZV', disminuyeron significativamente la actividad de Zp. La actividad de Zp también disminuyó al sustituir una C/G en la secuencia TTGCACG reconocida por la isoforma c/EBPα en el dominio ZV' del promotor Zp. El segundo objetivo fue determinar *in silico* FT candidatos a ser reclutados en el promotor viral Zp en carcinomas asociados a la exposición a HC, incluyendo COCE y LUAD (adenocarcinoma pulmonar). La predicción determinó 23 FT cuyos niveles de transcritos no mostraron asociación con el HT en COCE. Sin embargo, se detectó asociación estadísticamente significativa entre los niveles de transcritos de c/EBPβ y el HT en pacientes con LUAD. El tercer objetivo fue evaluar el reclutamiento de FT candidatos en el promotor Zp en células epiteliales orales expuestas a CHC. El ensayo de ChIP determinó el reclutamiento de la proteína c/EBPβ en el dominio ZV' del promotor Zp en las células CAL-27. Los datos obtenidos en esta

tesis permiten concluir que el CHC activa Zp en células orales y que la proteína c/EBP β podría estar involucrada en el incremento en la actividad de Zp en presencia de CHC.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common type of head and neck cancer, strongly associated with tobacco smoking (TS). However, additional factors may be involved. In particular, Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous herpesvirus, which is the etiologic agent of nasopharyngeal carcinoma, a subgroup of gastric adenocarcinomas and lymphomas. In addition, EBV has been detected in OSCCs, although its role in these tumors is still unknown. There is evidence that Zebra protein is expressed in EBV-associated tumors. Zebra is the regulator of the latent-lytic switch, whose transcripts are expressed from the Zp promoter. In this thesis, the following hypothesis was raised: "Cigarette smoke components (CSC) activate the EBV Zp promoter through the recruitment of transcription factors (TF) expressed in oral epithelial cells". The first objective was to evaluate the activation of the EBV Zp promoter and deletion and substitution mutants by CSC in oral epithelial cells. Through luciferase assays using the pmir-GLO dual reporter vector, it was found that Zp is activated after the incubation of CAL-27 and SCC-143 oral cells with 10 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$ of CSC, respectively. In addition, deletions in the TTGCTA – TTGCAC/C sequences recognized by the cellular protein c/EBP in the domains ZIIIB and ZV', significantly decreased Zp activity. Zp activity was also decreased by substituting a C/G in the TTGCACG sequence recognized by the c/EBP α isoform in the ZV' domain of the Zp promoter. The second objective was to determine *in silico* TF candidates to be recruited in the viral Zp promoter in carcinomas associated with TS exposure, including COCE and LUAD (lung adenocarcinoma). The prediction determined 23 cell TFs whose transcript levels did not show any association with TS in COCE. However, a statistically significant association was detected between the transcript levels of c/EBP β and TS in patients with LUAD. The third objective was to evaluate the recruitment of candidate TFs at the Zp promoter in oral epithelial cells exposed to CSC.

The ChIP assay determined the recruitment of c/EBP β protein into the ZV' domain of the Zp promoter in CAL-27 cells. The data obtained in this thesis allow us to conclude that CSC activates Zp in oral cells and that the c/EBP β protein may be involved in the increase in Zp activity in the presence of CSC.

INTRODUCCION

1.1 Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE)

El cáncer es un problema importante de salud pública en todo el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2020 la cifra de incidencia global superó los 18 millones de personas con una mortalidad equivalente a más de 9 millones (1). En particular, el cáncer de labio y cavidad oral (CO) representa el 95% de todos los cánceres de cabeza y cuello. En el año 2020 ocupó el puesto 18 entre las neoplasias más comunes, con una incidencia estimada de 377.713 casos y 177.757 muertes (1). El CO se manifiesta con la aparición de lesiones ulcerosas en la cavidad oral que incluyen: labios, mejillas, parte media y frontal de la lengua, encías superior e inferior, piso de la boca, paladar duro, paladar blando y trigono retromolar (2). El tipo histológico más frecuente (90%) es el carcinoma oral de células escamosas (COCE) seguido de otros carcinomas de tipo basaloide, fusiforme, verrucoso, papilar y adenocarcinomas (3). Adicionalmente, existe una proporción menor de lesiones orales premalignas que progresan a COCE como la leucoplasia, eritroplasia, el liquen plano oral y la fibrosis submucosa aunque su potencial maligno es muy limitado (4). Según los reportes de la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), el COCE es muy frecuente en regiones con índices de desarrollo humano medio/bajo como Asia Central Sur (Sri Lanka, India y Pakistan) versus otras regiones más desarrolladas, reflejando los hábitos culturales en la población y la inequidad social (1). En Sudamérica, en el año 2020 se reportaron 14.191 casos de COCE y 6.027 defunciones, siendo Brasil el país más afectado. Chile ocupó el sexto puesto en incidencia y mortalidad con 295 y 130 casos reportados respectivamente, lo cual representa una tasa estandarizada por edad (ASR) de 1 y 0.4 por cada 100.000 habitantes (1). Se espera que estas estadísticas aumenten a un ritmo alarmante para el año 2040 debido a las conductas de riesgo y el estilo de vida de los habitantes. El COCE es tres veces más común en hombres que en mujeres en edades superiores a los 50 años (1). Los síntomas clínicos implican sangrado bucal, dientes móviles, disfagia, dificultad para hablar, inflamación, dolor generalizado, entre otros (5). Sin

embargo, la mayoría de los pacientes con COCE son asintomáticos y por lo tanto se diagnostican en una etapa tardía (III o IV) de la enfermedad, lo que representa una sobrevida de alrededor del 50% y un tratamiento que deja complicaciones físicas y psicológicas en los pacientes que lo reciben (6).

1.2 Factores de Riesgo

La carcinogénesis oral es multifactorial y es el resultado de una serie de interacciones entre el hospedero y factores exógenos ambientales; cuya prevalencia varía de región en región debido a las diferentes prácticas sociales y culturales de la población (7). Hoy en día es ampliamente aceptado que el hábito tabáquico (HT) y la ingesta de alcohol son cofactores fuertes para el desarrollo de COCE, e incluso pueden tener un efecto sinérgico (2, 8). Sorprendentemente, el 80% de los pacientes que desarrollan COCE son fumadores o estuvieron expuestos al humo de cigarrillo de segunda mano (9, 10). Se estima que los individuos fumadores tienen un riesgo mayor de desarrollar COCE (OR=2.33) que los no fumadores, el mismo que aumenta con la duración (años) (OR=3.89) y frecuencia (g/día) del HT (OR=6.11) (11). Además, los fumadores pasivos también forman parte del grupo de riesgo. Un estudio estimó que existe una mayor probabilidad de desarrollar COCE (OR= 2.45 – IC: 95%; 1.20-5.01) en fumadores pasivos en comparación con aquellos individuos sin exposición al humo de cigarrillo (HC) (12). Adicionalmente, existen otros factores relacionados a COCE como la exposición ocupacional a agentes químicos, la radiación ultravioleta, deficiencias nutricionales en la dieta y una higiene oral deficiente (7). De hecho, se estima que la mitad de casos de COCE reportados en poblaciones asiáticas son atribuibles a la masticación de productos derivados de la nuez de areca (areca catechu), incluidas las mezclas con betel quid. Estos productos se consumen debido a su efecto estimulante, sin embargo, contienen compuestos carcinógenos que son absorbidos directamente por la mucosa oral (13). Además, existen factores genéticos como la anemia de Fanconi, o polimorfismos en genes que codifican para enzimas metabolizadoras de xenobióticos que predisponen a desarrollar COCE, como la variante homocigótica Val/Val del citocromo CYP1A1 (14). Sin embargo, algunos individuos no están expuestos a estos factores y desarrollan COCE (15). Por lo tanto, se ha planteado que

otros cofactores como los microorganismos que forman parte de la microbiota oral, incluidas las infecciones virales persistentes podrían influir en el desarrollo y progresión del COCE (16, 17). Por ejemplo, VEB causa lesiones premalignas orales como leucoplasia vellosa y enfermedades linfoproliferativas en individuos inmunosuprimidos (7). Interesantemente, el genoma de VEB se ha detectado en COCE, aunque aún no se ha establecido una relación causal (18).

2. Virus Epstein-Barr

2.1 Taxonomía, estructura y biología

El VEB o herpesvirus humano 4 (HHV-4), pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *gammaherpesvirinae* y género *lymphocryptovirus*. A nivel estructural posee una envoltura con al menos 13 glicoproteínas de superficie (once estructurales y dos no estructurales), una cápside de 122 a 180 nm, compuesta por 162 capsómeros (150 hexámeros y 12 pentámeros) y un tegumento compuesto de proteínas y enzimas ubicado entre la cápside y la envoltura viral (19) (**Figura 1**).

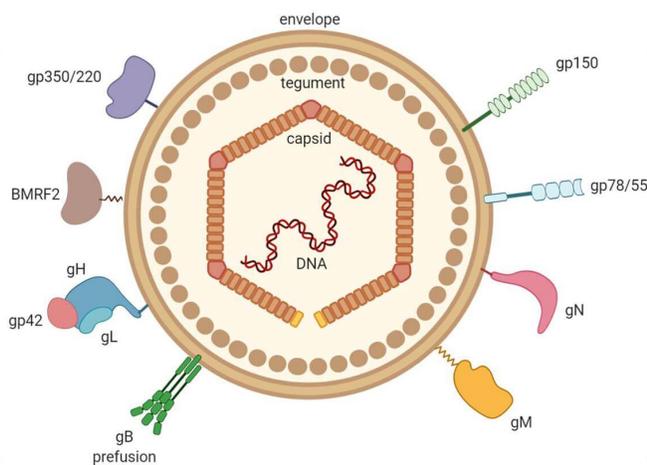


Figura 1. Estructura morfológica de VEB. Partícula viral con simetría icosaédrica recubierta de glicoproteínas, un manto y una nucleocápside que protege el ácido nucleico. Modificado de (20).

El genoma de VEB es ácido desoxirribonucleico (ADN) lineal, de doble hebra con una longitud aproximada de 172 kilobases que incluye más de 80 regiones codificantes

para genes líticos, latentes y ARNs pequeños no codificantes (21). El ADN viral está organizado en una región única larga intercalada por cuatro secuencias repetidas internas (IR1 a IR4) y cinco secuencias únicas (U1 a U5) flanqueadas por secuencias repetitivas terminales (TRs) de 0.5 kb de longitud organizados espacialmente según el fragmento viral BamHI (22) (**Figura 2**).

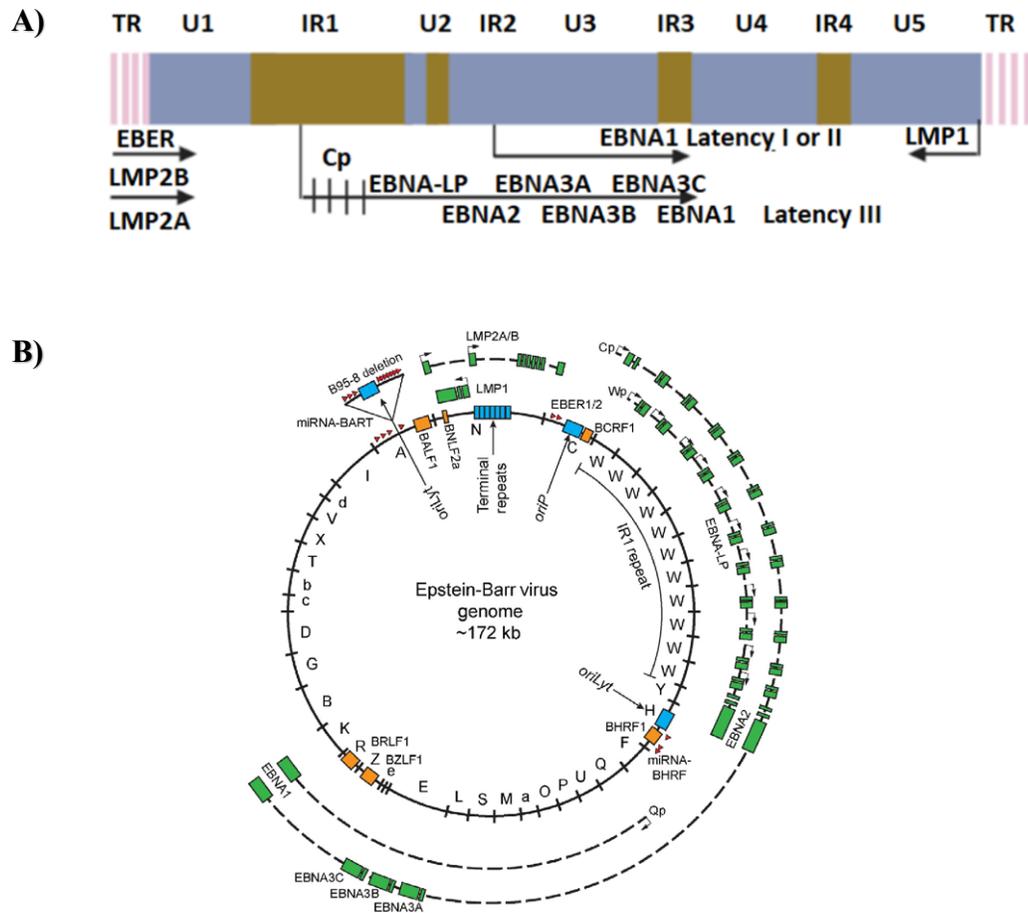


Figura 2. Organización genómica de VEB. A) Disposición lineal del genoma de VEB. Posee una longitud de alrededor de 172 kb, que incluye varias regiones codificantes divididas en cinco dominios de secuencia únicos (U1 - U5) y cuatro dominios de secuencias repetidas internas (IR1-IR4). Estos dominios están flanqueados por las secuencias repetitivas terminales (TRs). **B) Disposición circular del genoma de VEB.** Los promotores que dan origen a los genes latentes (Cp, Wp, Qp, LMP) se indican en recuadros verdes, los genes líticos como *bzlf1* (posición Z) se indican en recuadros naranjas y los ARN no codificantes se indican en triángulos rojos. Las letras en el borde interno indican los fragmentos de digestión BamHI. Los dos orígenes de replicación lítica (ori_{lyt}) y el origen de replicación plasmidial (ori_P) se indican en recuadros celestes (22).

2.2 Epidemiología

VEB es muy ubicuo y se estima que alrededor del 95% de la población mundial es seropositiva para la infección (23). Los seres humanos son el único hospedero del virus, el cual es transmitido de un individuo infectado a uno sano a través de la saliva. VEB también se puede transmitir a través de fómites contaminados y en menor frecuencia por transplante de órganos o transfusiones sanguíneas principalmente en individuos inmunosuprimidos (24). La cavidad oral es el sitio primario de la infección de VEB e infecta fundamentalmente células epiteliales y linfocitos B (25). En estas células, VEB establece dos ciclos de infección. El ciclo latente ocurre en linfocitos B. En este estado VEB se establece en el hospedero como plásmido circular constituyendo el reservorio de la infección a largo plazo (26). El ciclo lítico, ocurre en células epiteliales y conlleva la producción de partículas virales infectivas, aunque también es activado durante la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas (27, 28). La infección primaria en países en vías de desarrollo es generalmente asintomática y ocurre durante los primeros años de vida (24). En cambio, en países más desarrollados, la primoinfección puede retrasarse hasta la adolescencia o la adultez produciendo mononucleosis infecciosa de curso agudo asociada a fiebre, dolor de garganta y linfadenopatía en respuesta a la reactividad de los linfocitos T CD8⁺ a la infección (24, 29). Los individuos infectados con VEB cursan con periodos de reactivación viral durante toda su vida en respuesta al estrés, otras infecciones o inmunosupresión (30).

2.3 Ciclo Replicativo del Virus Epstein-Barr en células epiteliales

Las células epiteliales son susceptibles y permisivas a la infección por VEB (31). Primero, el virus ingresa (adsorción) a la célula epitelial por fusión directa del manto viral con la membrana celular a través de la interacción de tres receptores: CD21, neurophilina 1 y receptor tirosin quinasa Efrina A2 (EphA2) con las glicoproteínas virales gp350/220, gB y gH/gL respectivamente (32-34) (**Figura 3**). Luego de la fusión, el material genético viral es transportado desde el citoplasma hacia el núcleo para

llevar a cabo la replicación del genoma viral, el cual involucra la expresión temporal y secuencial de genes líticos (35). Los genes inmediatamente tempranos *bzlf1* y *brlf1* se expresan primero para dar origen a las proteínas transactivadoras Zebra y Rta (35). Luego, Zebra y Rta reconocen secuencias específicas (ZRE y RRE) en los promotores de genes líticos tempranos para activarlos transcripcionalmente y permitir la formación del complejo de inicio de la transcripción (36, 37).

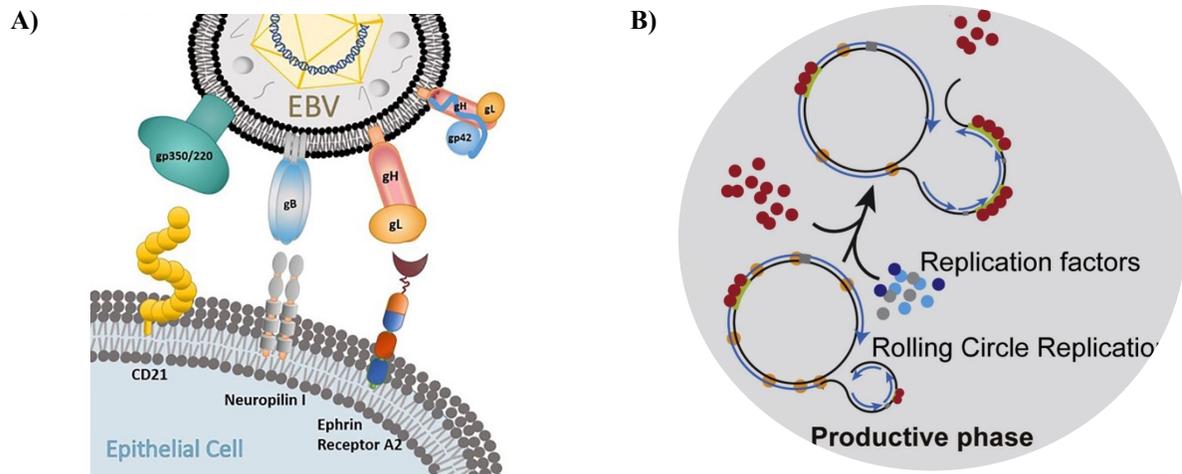


Figura 3. Ciclo lítico de VEB. A) Adsorción de VEB a la célula epitelial: VEB ingresa a la célula por fusión gracias a la interacción de sus tres glicoproteínas virales: gp350/220, gB, gH/gL con los receptores celulares CD21, neuropilina I, tirosin quinasa efrina A2. **B) Replicación del genoma viral:** El mecanismo replicativo de VEB sucede en el núcleo, en el *oriLyt* y es bidireccional. La expresión sistemática de los genes inmediatamente tempranos como *bzlf1* y *brlf1*, algunos genes tempranos como *balf5*, *balf2*, *bmrfl*, *bbfl4*, *bslf1* y los genes tardíos *bfrf3*, *blrf2*, *blfl1*, *bilf2*, *bzlf2*, *bxlf2*, *bkrf2* dan origen a la partícula viral. Luego, el virión abandona la célula por exocitosis causando lisis. Modificado de (38, 39).

Los genes tempranos incluyen a *balf5* (ADN polimerasa viral), *balf2* (proteína homóloga de unión al ADN), *bmrfl* (factor de procesividad de la ADN polimerasa), *bbfl4* (helicasa), *bslf1* (primasa) entre otros (40-42). La replicación viral ocurre en el origen de replicación lítico (*oriLyt*) de manera bidireccional formando concatémeros circulares. El ADN sintetizado es escindido y empaquetado en la cápside viral (43, 44). Finalmente se expresan los genes tardíos para dar origen a las proteínas estructurales de la nucleocápside (*bfrf3*), el tegumento (*blrf2*) y las glicoproteínas de superficie gp350/220 (*blfl1*), gp55/80 (*bilf2*), gp42 (*bzlf2*), gp85 (*bxlf2*), gp25 (*bkrf2*), entre otras

(45). Estos componentes forman la partícula viral, la cual es liberada de la célula infectada mediante exocitosis (46).

2.4 Ciclo Replicativo del Virus Epstein-Barr en linfocitos B

Los viriones ingresan al anillo de Waldeyer en las amígdalas, el cual está formado por tejido linfóide y acceden a los linfocitos B inmaduros mediante endocitosis gracias a la interacción de la glicoproteína viral gp350/220 con los receptores del complemento CD21 (47, 48). Adicionalmente, la interacción de la proteína viral gp42 con el co-receptor del antígeno leucocitario humano clase II facilita este proceso (49). Después de infectado, el linfocito B inmaduro se transforma en linfoblasto expresando todos los genes de la latencia III, es decir, los antígenos nucleares EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA-LP, las proteínas latentes de membrana LMP1 que codifican para dos isoformas (LMP2A y LMP2B), además de los ARN no codificantes EBEB1/2 y transcritos del fragmento A de BamHI o BARTs. En esta etapa, algunos linfoblastos son destruidos por las células del sistema inmune. Luego, los linfocitos inmaduros migran hacia el centro germinal y cambian su programa de expresión de genes a uno más restrictivo con la expresión de EBNA1, LMP1, LMP2a, LMP2b, EBEBs, BARTs, durante la latencia II. Cuando los linfocitos B maduran, salen del centro germinal como linfocitos B de memoria en reposo que solo expresan EBEBs y BARTs durante la latencia 0, o como linfocitos B de memoria en división y expresan los genes EBNA1, EBEBs y BARTs propios de la latencia I (50). Finalmente, el linfocito B puede diferenciarse a célula plasmática por estimulación del antígeno del receptor B y generar anticuerpos (28). Este proceso desencadena la reactivación viral caracterizada por la transición de un estado latente a uno lítico, lo cual lleva a la síntesis de nuevos viriones que son liberados extracelularmente para iniciar un nuevo ciclo de infección en otras células adyacentes (51) (**Figura 4**).

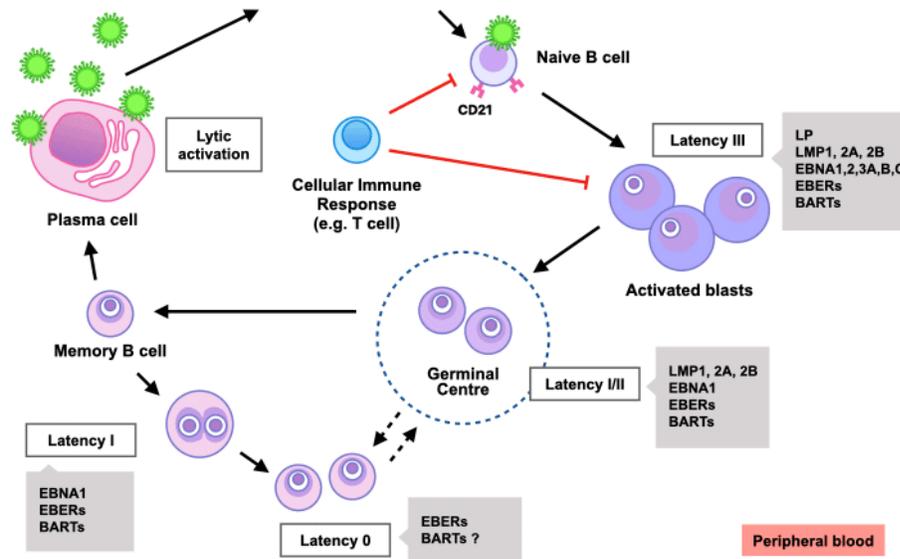


Figura 4. Ciclo latente de VEB. VEB infecta a los linfocitos B inmaduros a través de la interacción de sus glicoproteínas gp350/220 con el receptor celular CD21. Los genes virales EBNA (1,2,3A,3B,3C, LP), LMP (1, 2A,2B), los EBERs y BARTs se activan en el programa de latencia III y transforman al linfocito en linfoblasto. Estas células migran al centro germinal para activar el programa de latencia II caracterizado por la expresión de LMP (1, 2A, 2B), EBNA1, EBERs y BARTs. Una vez que el linfocito B pasa a la circulación sanguínea, establece latencia 0 en linfocitos B en reposo expresando EBERs y BARTs o latencia I en linfocitos B de memoria expresando EBNA1, EBERs y BARTs. Cuando el linfocito B se diferencia a célula plasmática, se produce reactivación viral permitiendo la transición del ciclo latente al lítico generando partículas virales. Modificado de (52)

2.5 Virus Epstein-Barr y alteraciones moleculares en COCE

La cavidad oral es el sitio primario para la infección y persistencia de VEB (53). En células orales normales la infección *per sé* es lítica y conlleva a la generación de partículas virales y posterior destrucción celular (54). Sin embargo, VEB podría establecer latencia en células epiteliales que presentan alteraciones genéticas previas, en vez de seguir su curso lítico habitual (23, 53). El COCE emerge como resultado de una serie de eventos moleculares que alteran la fisiología de las células orales. La acumulación de las alteraciones genéticas puede llevar al desarrollo de lesiones premalignas y el subsecuente desarrollo de carcinomas orales (55). En el COCE se han detectado anomalías en oncogenes celulares y genes supresores de tumores (TSG) (56). Los oncogenes son activados por mutaciones somáticas o rearrreglos

cromosómicos, mientras que los TSG son inactivados por mutaciones puntuales, pérdida de heterocigosidad, deleciones o hipermetilación de islotes CpG en regiones promotoras de genes celulares (57, 58). Por ejemplo, la pérdida de la región cromosómica 9p21 ocurre en el 70 - 80% de las lesiones displásicas de la mucosa oral y deriva en la pérdida de p16, una proteína que funciona como inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (CDKs). Esta proteína regula el ciclo celular y la senescencia representando un evento temprano en la carcinogénesis oral (59). Otras alteraciones en la región cromosómica 17p13 originan la pérdida de función de la proteína p53 ocasionando desregulación del ciclo celular y promoviendo la progresión de lesiones orales preinvasivas a invasivas (60). La amplificación de la región 11q13 y la sobreexpresión de la ciclina D1 han sido descritas en el 40% de displasias escamosas orales (61). La LOH (expresión de un solo gen en un locus génico) en la región cromosómica 10q23 origina mutaciones en *pten* (un TSG involucrado en el 40% de COCE) activando la vía de señalización PI3K/Akt para incrementar la proliferación celular en el epitelio oral (62, 63). Como consecuencia la célula anormal adquiere un fenotipo particular caracterizado por el crecimiento descontrolado, la inmortalidad, la angiogénesis, la metástasis entre otras (55).

2.6 Virus Epstein-Barr y cáncer

Aproximadamente el 18% de la carga global de cáncer es atribuida a agentes infecciosos (64). Particularmente, VEB fue el primer virus humano declarado oncogénico por la Agencia internacional de investigación del cáncer (IARC) (65, 66). El VEB produce alrededor de 200.000 casos de cáncer cada año, lo cual se traduce en una mortalidad global del 1.8% (23). Estos casos ocurren tanto en hospederos inmunocompetentes como en pacientes con inmunodeficiencias adquiridas (23). Los cánceres epiteliales como carcinoma nasofaríngeo no diferenciado (NPC) y el 9% de adenocarcinomas gástricos (CGaVEB) se asocian etiológicamente a un estado latente de VEB (67). El VEB también causa linfoma de Burkitt (LB), linfoma de Hodgking (LH) y linfoma de células natural killer/T (NK/T), así como otros tipos de cánceres atípicos como leiomiomas y linfoma de efusión primaria (67-70). El VEB también ha sido

detectado en otros tumores epiteliales como cáncer de mama o cáncer de cuello uterino, aunque su rol etiológico es controversial (71, 72). Por lo tanto, el establecimiento de la latencia viral en el tumor constituye un evento crítico para el desarrollo de cánceres asociados a VEB y a la evasión de la respuesta inmune (73-75).

2.7 Virus Epstein-Barr y COCE

Interesantemente, el genoma de VEB ha sido detectado en COCE mediante técnicas moleculares. En un meta-análisis, VEB estuvo presente en un 45,37% (95% CI: 38,90 – 51,84%; $p < 0.001$) y los individuos infectados tuvieron un 2,5% más de riesgo de desarrollar COCE (OR=2,57; $p < 0.001$) (76). En un estudio en Tailandia se detectó VEB en el 45,05% (41/91) de pacientes con COCE en comparación con personas sanas 18,08% (17/94) ($p < 0.001$) cuya prevalencia fue estadísticamente asociada con COCE (OR=3,76) (77). En un estudio en Suiza, se detectó genomas de VEB en un 37,9% (11/29) ($p < 0.0005$) de pacientes con COCE y curiosamente también en un 26,1% (6/23) de lesiones premalignas de liquen plano oral; lo cual podría implicar un rol de VEB en esta patología oral (78). Un estudio en Japón, demostró que VEB está presente en un 52,8% (19/36) en pacientes con COCE y en el 5,3% (1/19) de lesiones premalignas, pero no en tejido sano sugiriendo un posible rol carcinógeno a este virus (79). Las proteínas latentes de VEB también están presentes en tejido tumoral de COCE. Estudios realizados en Japón encontraron genoma de VEB en un 15,2% (7/46) de muestras de tejido de COCE con presencia de la proteína viral oncogénica LMP1, la cual está implicada en procesos de transformación celular (80). En un estudio en Tailandia, se detectó que la proteína viral LMP1 estaba sobreexpresada en pacientes con COCE en un 59,67%, así como en un 34,15% de lesiones displásicas, demostrando la latencia de VEB en el epitelio oral (81). Otro estudio en Japón, reportó que VEB estuvo presente en el 100% (36/36) de las muestras de COCE pero no en tejido sano. Además, se detectó EBER1 en el 66,6% (16/24), EBNA2 en el 75% (9/12) y LMP1 en el 51,72% (15/29) en COCE. Sorprendentemente, la proteína BZLF1 o Zebra también fue detectada en el 50% (14/28) de estos tejidos neoplásicos, pero no

en epitelio sano, sugiriendo que tendría un posible rol en la transformación neoplásica en COCE (18). En estos estudios se ha demostrado la presencia de VEB en COCE, sin embargo, no se ha determinado una asociación directa de este virus con el proceso oncogénico.

2.8 Promotor Viral Zp y proteína Zebra

Como se mencionó en el apartado anterior, la presencia de las proteína latentes de VEB tiene un rol oncogénico definido en tumores epiteliales (82). Sin embargo, la activación del ciclo lítico también es importante para la carcinogénesis mediada por VEB. De hecho, hay evidencia que tanto proteínas latentes como algunas proteínas líticas como Zebra están presentes en tumores epiteliales (18, 83). Este estado se conoce como ciclo lítico abortivo, ya que no finaliza en la producción de partículas virales (84, 85). Zebra está codificada por el gen *bzlf1*, cuya expresión depende de la activación transcripcional del promotor Zp (86). La longitud de este promotor es de 683 nucleótidos y ya ha sido previamente caracterizado. Los dominios cis-acting más importantes son 4: ZI (A-B-C-D), ZII, ZIII (A-B), ZV y ZV' ubicados desde la posición -197 río arriba del sitio de inicio de la transcripción hasta la +8 (87) (**Figura 5**). Existen otros dominios más distales pero han sido pobremente identificados. Cada uno de estos 4 dominios contiene secuencias consenso que son reconocidas por factores de transcripción celulares (88)..

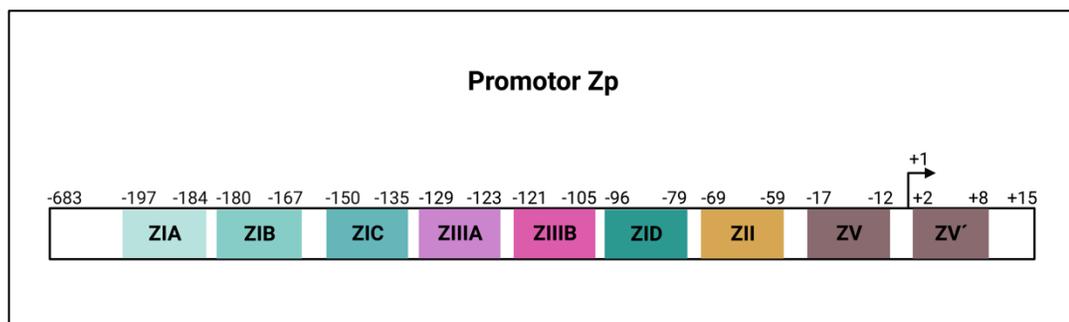


Figura 5. Estructura del promotor Zp de VEB. Zp posee una longitud de 683 nucleótidos. Está formado por cuatro dominios cis-acting ZI(A-B-C-D), ZII, ZIII (A-B), ZV y ZV' ubicados desde la posición -197 hasta la +8 del promotor Zp. El +1 indica el sitio de inicio de la transcripción. Figura creada en BioRender.

De esta interacción proteína-ADN depende la represión o activación del promotor Zp. Por ejemplo, la proteína Zta reconoce los elementos de respuesta de Zta (ZRES) ubicados en el dominio ZIIIA y ZIIIB de Zp y es capaz de unirse a su propio promotor para autoregular su transcripción (89). La proteína celular XBP1 (proteína 1 de unión a la caja X) y PKD (proteína quinasa D) trabajan en conjunto para activar transcripcionalmente al promotor Zp (88)

3. Humo del cigarrillo y alteraciones moleculares

El humo del cigarrillo (HC) es un carcinógeno clase I para el ser humano y su rol causal en el desarrollo de varios cánceres ha sido extensamente comprobado y estudiado (90). El HC tiene participación etiológica en cáncer oral, pulmonar, de faringe, laringe, esófago, cavidad nasal, páncreas, vejiga, estómago, hígado, riñones, útero, etc (91). Si bien el HT es una práctica voluntaria, continúa siendo una de las mayores causas de mortalidad prematura a nivel mundial (92). De hecho, fue la segunda causa mundial de muerte en el año 2020 después del cáncer de mama (91). Además, se estima que los índices de mortalidad aumentarán a 450 millones para el año 2050 (1). El HT es una práctica muy prevalente en la sociedad, ya que la exposición a este agente genera un efecto adictivo en el consumidor (93). El HC contiene más de 4.500 componentes químicos, de los cuales 73 tienen potencial carcinógeno, entre ellos, hidrocarburos aromáticos como el benzo[a]pireno, las n-nitrosaminas: n-nitrosornicotina (NNN) y 4 metil nitrosamina 1-3 piridil 1 butanona (NNK), aldehídos e hidrocarburos volátiles como el benceno, entre otros (92). El epitelio oral está directamente expuesto a los xenobióticos presentes en el HC, lo cual representa un riesgo importante para el desarrollo de lesiones malignas (55). Los componentes del HC entran en contacto directo con la mucosa activando varios mecanismos de metabolización que involucran a las enzimas degradativas de la familia del citocromo P-450 (94). La mayoría de metabolitos tóxicos son secretados a través de la orina y otros líquidos corporales para mantener la homeostasis (94). Sin embargo, la exposición prolongada al HC compromete los mecanismos de reparación y daño al ADN (DDR) provocando inestabilidad genómica, que eventualmente puede derivar en cáncer (95). (**Figura 6**)

Las n-nitrosaminas presentes en el HC son agentes alquilantes que reaccionan con los átomos de oxígeno de las bases del ADN para inducir mutagénesis (96). La exposición a aldehídos presentes en el HC induce la formación de aductos en el tejido oral en individuos fumadores (97). Estos aductos son el resultado de las especies reactivas de oxígeno generadas como parte del metabolismo de estos xenobióticos y se unen al ADN de manera irreversible promoviendo quiebres en sus hebras (94, 95). A nivel molecular, el HT está relacionado con mutaciones en el gen *tp53* en pacientes con COCE (33% en fumadores vs 17% en no fumadores), sugiriendo un rol mutagénico a los componentes presentes en el HC en la progresión de esta malignidad (98)..

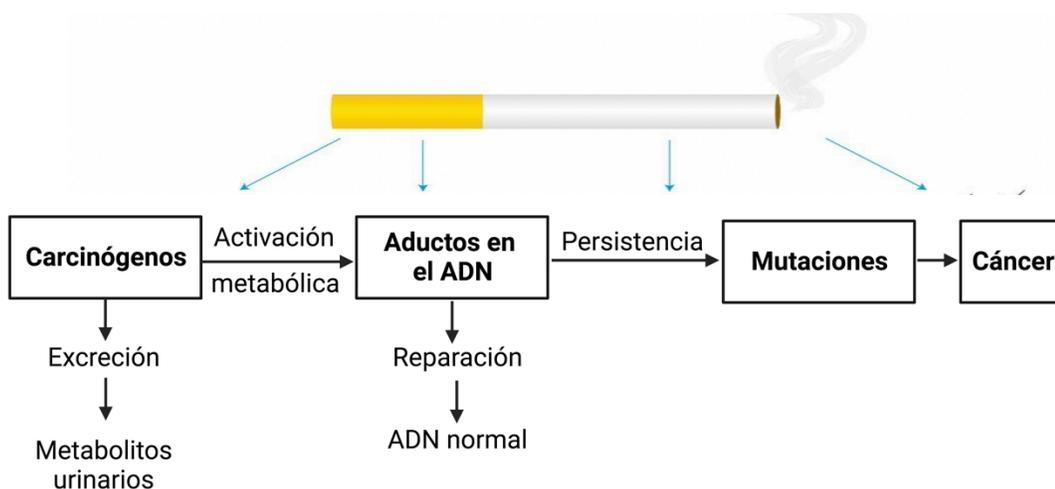


Figura 6. Efectos moleculares frente a la exposición a HC. El humo del cigarrillo contiene muchos compuestos carcinógenos que son biometabolizadas por las enzimas de la familia del citocromo P-450 para ser excretados a través de la orina. La exposición a HC resulta en la formación de aductos, situación que activa los mecanismos de reparación del ADN para conservar la integridad celular. Sin embargo, la exposición crónica al HC altera el ADN, aumentando la probabilidad de que se generen mutaciones en genes críticos de control del ciclo celular, causando inestabilidad genómica y favorecer el desarrollo de cáncer. Modificado de (94). Figura creada en BioRender.

El HC también está implicado en alteraciones en vías de señalización o en proteínas implicadas en procesos de división celular. Por ejemplo, la pérdida de función del gen supresor de tumores *tsc* por LOH contribuye a la activación de la vía mTOR favoreciendo la proliferación celular en COCE (99). La proteína Harvey-Ras (H-ras) (regulador del crecimiento celular) está sobreexpresada en un 60% de COCE en

estadíos avanzados comparada con tejidos normales (41.5%) ($p < 0.03$). Además, el 82.1% de estos casos estuvieron asociados al HT, sugiriendo una potencial participación de este agente en el desarrollo de COCE (100)

3.1 Humo de Cigarrillo y Virus Epstein-Barr

En la actualidad se desconoce si VEB puede cooperar con el HC para promover algún tipo de cáncer, incluyendo COCE. Sin embargo, existe evidencia mecanística de la interacción de este xenobiótico ambiental con otros virus. La exposición a HC activa el promotor viral p97 del virus papiloma humano (HPV-16), lo cual se traduce en la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 en líneas celulares epiteliales tumorales (101). Además, existe evidencia de que la exposición a HC induce reactivación viral en el individuo (modula la transición desde el estado latente a lítico). De hecho, un estudio en individuos fumadores activos determinó que el título de anticuerpos IgA contra el antígeno VCA de VEB (14%) es más alto que en aquellos que nunca han fumado (102). En algunos casos, estos eventos de reactivación viral periódica se han asociado positivamente con el desarrollo de NPC (103). También se ha reportado que existe asociación, aunque no significativa, entre los niveles de cotinina (el principal metabolito de la nicotina presente en el TS) y la seropositividad de VEB frente a la proteína viral Zebra en sujetos sanos de una región endémica de NPC (104). También existe evidencia *in vitro* de que VEB puede ser reactivado por exposición a radiación, drogas y otros xenobióticos. Por ejemplo el clorpirifos, un pesticida organofosforado induce la activación del ciclo lítico a través de la expresión de la proteína Zebra (105). La proteína Zebra, y por tanto los mecanismos que regulan su expresión, tienen un rol fundamental en la activación de esta forma de interacción entre VEB y la célula hospedera, lo cual puede concluir con el desarrollo de tumores asociados a esta infección viral.

3.2 Humo del cigarrillo y cánceres asociados

Una malignidad altamente relacionada al HC es el cáncer de pulmón. El cáncer de pulmón es una neoplasia heterogénea y se clasifica en dos grandes grupos: carcinoma

de pulmón de células pequeñas (SCLC) y carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (22). El NSCLC es el tipo más prevalente y comprende el carcinoma de células escamosas (SQC), adenocarcinoma (LUAD) y carcinoma de células largas (LCC) (22). En particular el LUAD es el subtipo histológico más común de cáncer pulmonar primario y tiene un origen alveolar (106). Es el subtipo más común diagnosticado en un 25% de personas que no han fumado (107). El cáncer de pulmón ocupó el segundo lugar en las estadísticas mundiales de malignidades más frecuentes y mortales, con una incidencia de 2'206.771 casos diagnosticados y 1'796.144 muertes en el año 2020 (1). La mayor tasa de incidencia se registró en las regiones de la micronesia/ polinesia, europa oriental y del sur, y asia oriental y occidental (1). El principal factor de riesgo es el HT con un OR estimado de 10 a 30 comparado con sujetos no fumadores (108). Al igual que en COCE, se ha reportado que los metabolitos del HC promueven mutaciones en genes importantes involucrados en la regulación del ciclo celular como *tp53*, *myc*, *kras* y *cdkn2a* (109, 110). Además, los individuos fumadores presentan alteraciones en los cromosomas 17p13 (*tp53*), 9p21 (*cdkn2a*) y 3p14 (*fhit*) que codifican para genes supresores de tumores (111). Adicionalmente, existe un 40% de mutaciones en el gen *kras*, cuya función es participar en vías de señalización celular que controlan la división y destrucción de las células (112). El LUAD es clínicamente agresivo y a pesar de los avances recientes en modalidades de terapia la tasa de supervivencia a 5 años es baja, representando un riesgo importante de muerte (113).

3.3 Virus Epstein- Barr y LUAD

Al igual que el COCE, la patogénesis del LUAD se caracteriza por la acumulación de anormalidades genéticas y epigenéticas en el individuo previamente mencionadas (22). La evidencia epidemiológica sugiere que VEB está presente en algunos especímenes clínicos de cáncer pulmonar, aunque una relación causal entre estos dos agentes no se haya definido aún (22). En un estudio realizado en España se encontró una positividad del 63,2% (12/19) para EBER (ARN de VEB) en muestras de LUAD

(114). Otro estudio en Irán reveló que VEB estuvo presente en 5/48 especímenes de LUAD y SCQ representando un 10,4% de positividad (115).

HIPOTESIS

Estableciendo que 1) La infección por VEB no es condición suficiente para inducir carcinogénesis; 2) El humo de cigarrillo es un agente clastogénico cuya exposición es muy frecuente en la población y es un factor importante de cáncer oral y pulmonar; 3) La activación del switch latente lítico es importante en la carcinogénesis mediada por VEB; 4) El promotor Zp dirige la expresión de Zebra, la proteína reguladora maestra del ciclo lítico de VEB.

Se plantea la hipótesis: “Los componentes del condensado del humo del cigarrillo activan el promotor Zp de VEB a través del reclutamiento de factores de transcripción (FT) expresados en células epiteliales orales”.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la activación y el reclutamiento de FT candidatos en el promotor Zp de VEB promovido por los componentes del condensado del humo del cigarrillo en células epiteliales orales.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.-** Evaluar la activación del promotor viral Zp *wild type* de VEB y mutantes de delección y sustitución por los componentes del condensado del humo de cigarrillo en células epiteliales orales.
- 2.-** Determinar *in silico* factores de transcripción (FT) candidatos a ser reclutados en el promotor viral Zp en carcinomas asociados a la exposición a humo de cigarrillo (HC).
- 3.-** Determinar el reclutamiento de FT candidatos en el promotor viral Zp en células epiteliales orales expuestas a componentes del condensado del humo de cigarrillo.

MATERIALES Y METODOS

Líneas celulares

Las líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas SCC-143 (piso de boca) y CAL-27 (parte media de la lengua) se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco – DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Hyclone, Fremont, EE. UU) más los antibióticos penicilina y estreptomina 100 µg/mL (Corning, EE. UU). Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ al 5% (Sanyo, EE.UU). Para los subcultivos, se retiró el medio, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) al 1x (Hyclone, Fremont, CA, EE. UU) y se incubaron con 500 µL o 1000 µL de tripsina-EDTA (Hyclone, Fremont, CA, EE. UU) al 0.25% por 5 min a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ al 5%. Ambos cultivos celulares fueron analizados periódicamente para detectar contaminación con micoplasma spp. u otros microorganismos. Todos los medios y reactivos fueron previamente acondicionados a 37°C antes de su uso en cultivos o pasajes celulares.

Actividad biológica del CHC y qPCR

Se sembraron 150.000 células SCC-143 y CAL-27 en triplicado en placas de Petri para cultivo celular de 60 mm en 5 mL de medio DMEM durante 24 h en atmósfera controlada de CO₂ (Sanyo, EE.UU). Luego las células fueron tratadas con 10 µg/mL de CHC (Murthy Pharmaceuticals, Universidad de Kentucky) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (PanReac AppliChem, EE.UU) o cantidades equivalentes de DMSO. Se incubaron durante 4 y 8 h respectivamente en atmósfera controlada de CO₂ al 5%. Para obtener el ARN celular, se agregó 1 mL de TRIzol® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU) a cada placa y se incubó sobre hielo durante 5 min. Las células fueron lisadas con ayuda de un scrapper y el contenido de cada placa se recolectó en tubos Eppendorf de 1.5 mL. A cada tubo se le agregó 200 µL de cloroformo frío (Merck, Burlington, Massachusetts, EE.UU) y se centrifugó a 12.000

rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL y se añadieron 500 µL de isopropanol frío (Merck, Burlington, Massachusetts, EE.UU) para precipitar el ARN. Luego se incubó durante 1 h en refrigerador a -80°C. Después se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol frío (Merck, Burlington, Massachusetts, EE.UU) al 75%. Luego se dió un vortex breve y se centrifugó a 7.500 rpm durante 5 min. Después, se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 25 µL de agua libre de nucleasas. El ARN obtenido fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm (rango 260/280 – 260/230) usando el equipo Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU). El ARN de cada placa fue almacenado a -20°C. La integridad del ARN fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9%. Luego, cada muestra fue tratada con DNAsa RQ1 (Promega®, Wisconsin, EEUU) a 37°C durante 120 min y luego se incubó con solución de detención RQ1 DNAsa (Promega®, Wisconsin, EE.UU) a 65°C durante 10 min para un volumen final de 10 µL. Para obtener el ADNc de cada muestra se trató con DNAsa (1µg) (Promega®, Wisconsin, EE.UU), 1 U de inhibidor de RNAsa (Promega®, Wisconsin, EEUU), random primers 0,04 µg/µL (Promega®, Wisconsin, EE.UU), dNTPs 2 mM (Promega®, Wisconsin, EE.UU) y 10 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney (MMLV) (Promega®, Wisconsin, EE.UU) en un volumen de reacción final de 20 µL. El ADNc de cada muestra (1000 ng) (con y sin tratamiento con CHC) fue evaluado por qPCR (ARIAMx Real Time PCR System - Agilent Technologies). Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 µL usando SensiMix™ SYBER® master mix (Bioline), ADNc y partidores específicos (22 µM) para los genes *cyp1b1* (forward 5' ATCAGCAATGCCTCCTGCAC 3', reverse 5' ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT 3') y *gapdh* (forward 5' CGGGAAGCTTGTCATCAATGG 3', reverse 5' CATGGTTCACCCATGACG 3'). Las condiciones de termociclado fueron: 95°C durante 30 seg, 94°C durante 30 seg, 58°C durante 20 seg, 72°C durante 20 seg para un total de 41 ciclos. Para el análisis de melting: 95°C durante 15 seg, 60°C durante 1 min y 95°C durante 15 seg. Los niveles de transcritos de *cyp1b1* se obtuvieron usando el método de cuantificación del $\Delta\Delta CT$ normalizando contra los niveles de *gapdh*.

Ensayos de proliferación celular

Las líneas celulares SCC-143 y CAL-27 se sembraron por quintuplicado en placas de 96 pocillos transparentes con fondo plano en tres diferentes densidades: 1×10^3 , 3×10^3 y 5×10^3 células/pocillo durante 24 h en atmósfera controlada de CO₂ (Sanyo, EE.UU). Se usó azul tripán para excluir posibles células muertas y el conteo celular se realizó usando una cámara de Neubauer (Hirschmann®, Techcolor). La fórmula para determinar el conteo celular fue: número total de células / 8 cuadrantes x factor de dilución (FD) x 10.000. Luego las células se incubaron durante 0, 24, 48 y 72 h en una atmósfera controlada de CO₂ al 5%. La tasa proliferativa se determinó cada 24 h a excepción del tiempo 0 a través del kit CellTitter 96 Aqueous Non Radioactive Cell Proliferation Assay - MTS (Promega®, Wisconsin, EE.UU) añadiendo 20 µL de reactivo a cada pocillo e incubando a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ al 5% durante 3 h. La formación del producto formazán (pigmento morado por metabolización del compuesto tetrazolio) se midió espectrofotométricamente a 490 nm y 630 nm usando el lector multimodal Synergy HTX (Biotek, Vermont, EE.UU).

Ensayos de viabilidad celular

Las líneas celulares SCC-143 y CAL-27 se sembraron por triplicado en placas de cultivo de 96 pocillos transparentes con fondo plano a una densidad de 5×10^3 células/pocillo durante 24 h en atmósfera controlada de CO₂ (Sanyo, EE.UU). Se usó azul tripán para excluir posibles células muertas y el conteo celular se realizó usando una cámara de Neubauer (Hirschmann®, Techcolor). La fórmula para determinar el conteo celular fue: número total de células / 8 cuadrantes x factor de dilución (FD) x 10.000. Luego las células se incubaron durante 24 h en atmósfera controlada de CO₂ al 5%. Después las células fueron tratadas con DMSO o CHC en un rango de concentraciones crecientes (1 a 50 µg/mL) y luego se incubaron durante 24 h adicionales. La viabilidad se midió usando el kit CellTitter 96 Aqueous Cell Proliferation Assay (Promega®, Wisconsin, EE.UU) añadiendo 20 µL de reactivo a cada pocillo e incubando a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ al 5% durante 3 h. La formación

del producto formazán (pigmento morado por metabolización del compuesto tetrazolio) se midió espectrofotométricamente a 490 nm y 630 nm usando el lector multimodal synergy HTX (Biotek, Vermont, EE.UU).

Vectores duales pmir-GLO *wild type* y mutantes

El vector dual pmir-GLO Zp *wild type* fue gentilmente donado por la Dra. Shannon Kenney (Universidad de Wisconsin, EE.UU). Este vector incluye un inserto del promotor viral Zp de 683 nucleótidos, sitio reconocido por las enzimas BglIII y ApaI. Adicionalmente, dos mutantes de delección (MUT 1, MUT 2) y una mutante de sustitución (MUT 3) fueron sintetizadas a través de GenScript Biotech Corp (Nueva Jersey, EE.UU) con base al análisis *in silico* del sitio de reconocimiento TTGCTA y TTGCAC/C, respectivamente del factor de transcripción (FT) c/EBP β . En la MUT 1 y MUT 2 se eliminaron 132 y 332 nucleótidos respectivamente desde el extremo 3' hasta el extremo 5' del promotor Zp. En la MUT 3 se sustituyó una C por una G (1 pb) en la posición +8 en el promotor Zp. Los vectores se propagaron en células competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen), se purificaron (Miniprep, Qiagen) según las instrucciones del fabricante y se eluyeron en 50 μ L de agua ultra pura. El ADN plasmidial purificado fue cuantificado (nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU) y la integridad de cada vector se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Ensayo reportero de luciferasa-renila

Se sembraron 45.000 células SCC-143 y CAL-27 por triplicado en placas de cultivo transparente con fondo plano de 24 pocillos y se incubaron a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ (Sanyo, EE.UU) al 5% por 24 h. Luego el medio de cultivo fue reemplazado con medio fresco DMEM libre de SFB y las células se incubaron durante 24 h adicionales. Posteriormente las células SCC-143 y CAL-27 fueron transfectadas con los vectores dual pmir-GLO Zp *wild type* y pmir-GLO MUT 1, MUT 2 y MUT 3 (250 ng y 500 ng) respectivamente usando 2,4 μ L de Fugene 6 (Promega®, Wisconsin, EE.UU) por pocillo según las instrucciones del fabricante y se incubaron por 24 h. Las

células fueron tratadas con 10 µg/mL y 50 µg/mL de CHC (Murthy Pharmaceuticals) y dimetilsulfóxido (DMSO) (PanReac AppliChem, EE.UU) grado cultivo celular en concentraciones equivalentes, disueltos en medio fresco DMEM libre de SFB durante 24 h. Las células se lavaron con PBS al 1x (Hyclone, Fremont, CA, EE. UU), se lisaron con 100 µL de tampón de lisis (Promega®, Wisconsin, EE.UU) de los cuales se recolectaron 20 µL en una placa de 96 pocillos blanca. La actividad de luciferasa/renilla se midió usando el kit dual-luciferase® reporter assay system protocol (Promega®, Wisconsin, EE.UU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las lecturas se realizaron en el luminómetro GLOMAX® 96 microplate (Promega®, Wisconsin, EE.UU).

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se sembraron 45.000 células SCC-143 y CAL-27 por triplicado sobre cubreobjetos de 12 mm en placas de cultivo transparente con fondo plano de 24 pocillos y se incubaron a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ al 5% (Sanyo, EE.UU) por 24 h. Luego el medio de cultivo fue reemplazado con medio fresco DMEM libre de SFB y las células se incubaron durante 24 h adicionales. Posteriormente las células SCC-143 y CAL-27 fueron transfectadas con los vectores duales pmir-GLO Zp *wild type* y pmir-GLO MUT 1, MUT 2 y MUT 3 (250 ng y 500 ng) respectivamente usando 2,4 µL de Fugene 6 (Promega®, Wisconsin, EE.UU) por pocillo según las instrucciones del fabricante y se incubaron por 24 h. Las células fueron tratadas con 50 µg/mL y 10 µg/mL de condensado de humo de cigarrillo (CHC) (Murthy Pharmaceuticals) y dimetil sulfóxido (DMSO) (PanReac AppliChem, EE.UU) grado cultivo celular en concentraciones equivalentes, disueltos en medio fresco DMEM libre de SFB durante 24 h. Los cubreobjetos se retiraron con cuidado de las placas de cultivo y se lavaron dos veces con 500 µL de PBS 1x (Hyclone, Fremont, CA, EE. UU). Para fijar las células se agregaron 500 µL de paraformaldehído (PFA) (Merck, Alemania) al 4% y se incubaron durante 20 min. Las células se lavaron con 500 µL de PBS 1x y se añadieron 500 µL de glicina (Merck, Alemania) 0.1 M y se incubaron durante 10 min. Luego las células se lavaron con con 500 µL de PBS 1x durante 5 min. Para permeabilizar las células se agregaron 500 µL de Tritón X- 100 (Merck, Alemania) al 0.2% durante 5 min y se

lavaron nuevamente con 500 μ L de PBS 1x. Este paso se repitió cuatro veces. Todos los reactivos del paso de fijación se filtraron antes de su uso. Luego a cada coverslip se le añadió 50 μ L de solución de bloqueo 1x (Merck, Alemania) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se añadieron 50 μ L de anticuerpo primario 1:100 anti renilla luciferasa (cat. n° PM047) (MBL, EE.UU) a cada coverslip y se incubó durante 1 h a 37°C en una incubadora (Fisher Scientific, EE.UU) con atmósfera controlada de CO₂ al 5%. Cada coverslip se lavó con 30 μ L de PBS 1x durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se añadieron 50 μ L de anticuerpo secundario 1:500 Alexa fluor 488 anti conejo (cat. A21206) (Life technologies, EE.UU) a cada coverslip y se incubó durante 1 h a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ al 5%. Cada coverslip se lavó con PBS 1x durante 10 min a temperatura ambiente. Este paso se repitió dos veces. Luego a cada coverslip se le añadió 15 μ L de DAPI 1x (Life technologies, EE.UU) y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente. Cada coverslip se lavó dos veces en PBS 1x y luego se lavó una vez más en agua ultra pura. Cada coverslip se dejó secar sobre una toalla de papel. El montaje de cada coverslip sobre un portaobjetos se hizo con 5 μ L del reactivo Fluoromount™ (Sigma-Aldrich, Chile). Las células fueron analizadas en un microscopio invertido IX73 (Olympus, Japón). El software para analizar las imágenes fue el Infinity Analyze. El conteo celular se realizó en el programa Image J (National Institutes of Health, Maryland. EE.UU). La eficiencia de transfección se calculó aplicando la fórmula: (número de células transfectadas / número de células totales) x 100.

2.1 Análisis *in silico*

El promotor viral Zp clonado en el vector dual pmir-GLO Zp fue secuenciado (método de Sanger) por el servicio de secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC) usando los siguientes partidores: forward: 5' CGTACAATTAAGGGATTATGG3' y reverse: 5' GTAATGTCCACCTCGATATGTG3'). La predicción de los FT celulares y sus sitios de unión en la región promotora de Zp se obtuvieron a través del programa PROMO V 8.3, TRANSFACT V 6.4, disponible en https://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3. Para

establecer la correlación entre los niveles de expresión de cada gen que codifica para cada FT y el HT se utilizó el programa Xena browser disponible en <https://xena.uCHC.edu>. La información clínica: número de pacientes, diagnóstico primario e historial tabáquico (número de cajetillas fumadas/año y años del hábito tabáquico) para las cohortes de COCE y LUAC fueron extraídas del Atlas del genoma del cáncer (TCGA) disponible en <https://portal.gdc.cancer.gov>. Los datos numéricos de secuenciación por Illumina® HiSeq del ARNm de cada gen normalizados por la maximización esperada (RSEM) para cada cohorte se obtuvieron del programa Xena browser. El grupo de pacientes analizados fueron: no fumadores (NF), fumadores actuales (FA), ex fumadores por menos de 15 años (F-15), ex fumadores por más de 15 años (F+15). Las variables continuas fueron transformadas en variables categóricas y a cada paciente se lo agrupó dentro de niveles altos o bajos de expresión de acuerdo a la mediana de los datos. El análisis estadístico del incremento en los niveles de transcritos de cada gen en los pacientes fumadores vs las otras 3 categorías se realizó en STATA/BE.

Western Blotting

Para determinar la expresión de las proteínas c/EBP β y β actina en las células orales SCC-143 y CAL-27, se trataron con 10 μ g/mL de CHC y concentraciones equivalentes de DMSO durante 24 h. Posteriormente las células fueron lisadas con 500 μ L de buffer RIPA 1x suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa 1x (Roche diagnostics, Basilea, Suiza) sobre hielo por 30 min. La concentración de proteínas se determinó usando el reactivo Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los geles de acrilamida/bisacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) fueron preparados al 10%. Se cargaron 10 μ g de proteína por carril (concentración estandarizada), las mismas que fueron previamente desnaturalizadas con β -mercaptoetanol 5x (National diagnostics, Atlanta, EE.UU) a 95°C durante 10 min. Las condiciones de la electroforesis fueron 90 V durante 2.5 h usando una fuente de poder PowerPac (BIO-RAD, California, EE.UU). Posteriormente las proteínas del gel fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (Millipore, Billerica, EE.UU) usando la plataforma Trans-Blot® SD semi dry transfer a

18 V-300 W durante 50 min. Luego las membranas fueron bloqueadas con una solución de seroalbúmina de bovino (ASB) al 5% y solución salina Tris más Tween 20 1x (TBS-T) durante 2 h a temperatura ambiente en agitación permanente. La incubación en agitación durante la noche con anticuerpo primario monoclonal anti-c/EBP β (Abcam, Cambridge, Inglaterra) y anti- β actina (Santa Cruz Biotechnology) se realizó en SAB al 1% a una dilución de 1:1000. Luego las membranas fueron lavadas tres veces con solución TBS-T 1x en intervalos de 10 min a temperatura ambiente. La incubación con anticuerpo secundario Ig conjugado a peroxidasa de rábano se llevó a cabo a una dilución de 1:4000 para c/EBP β (Santa Cruz Biotechnology) y 1:1000 para β -actina (BD Pharmingen, California, EE.UU) durante 2 h a temperatura ambiente. Luego las membranas fueron lavadas tres veces con solución TBS-T 1x en intervalos de 10 min a temperatura ambiente. La detección de las dos proteínas por quimioluminiscencia se realizó usando el sistema ChemiDoc Touch Imaging System (BIO-RAD, California, EE.UU) usando peroxidasa como sustrato y luminol como cromógeno. La proteína β -actina se usó como control de carga interno para normalizar los niveles de la proteína c/EBP β . La intensidad de cada banda se cuantificó mediante el software NIH ImageJ (National Institutes of Health, Maryland. EE.UU).

Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)

Se sembraron 250.000 células SCC-143 y CAL-27 en 8 placas de Petri para cultivo celular de 90 mm en 10 mL de medio DMEM y se incubaron a 37 °C en atmósfera controlada de CO₂ al 5% por 24 h. Cuatro placas fueron transfectadas con vector dual pmir-GLO Zp *wild type* (250 ng y 500 ng respectivamente) y expuestas a DMSO y CHC (10 μ g/mL). Adicionalmente, dos placas fueron expuestas solo a CHC (10 μ g/mL) y dos placas más de células se dejaron sin transfección o tratamiento. Para fijar las interacciones ADN-proteína, se añadieron 280 μ L de formaldehído (Sigma-Aldrich, St Louis, EE.UU) al 37% a cada placa y se incubaron durante 2 min a temperatura ambiente. Esta reacción se detuvo mediante la adición de 1 mL de glicina 1 M (PanReac® ApplyChem, España) a cada placa y se incubaron por 2 min a temperatura ambiente. Las células fueron colectadas de las placas con un *scraper* y transferidas

a tubos cónicos de 15 mL sobre hielo. Posteriormente para obtener la cromatina, los tubos fueron centrifugados a 7.000 rpm por 20 min a 4°C (HERMLE Z 326K, Wehingen, Alemania). Se descartó el sobrenadante y las células de cada tubo se resuspendieron en 200 µL de Buffer A (50 mM tampón PO₄ pH 7.9, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 2% de Tritón X-100 y 0.5% de SDS), se homogenizó y el contenido fue transferido a tubos Axygen (Corning, Brasil) de 1.5 mL. Para obtener fragmentos de ADN de alrededor de 500 pb de longitud, cada muestra se sometió a 3 pulsos de sonicación (Fisher Scientific Sonic Dismembrator Model 100, EE.UU) en potencia 10 durante 10 seg en intervalos de 3 seg. Las muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 min y los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos Axygen de 1.5 mL. Para eliminar las interacciones inespecíficas con la cromatina, se tomaron 50 µL de perlas magnéticas unidas a proteína A (Magna CHIP™, Sigma Aldrich, catálogo N.º 16-661) previamente lavadas (4 veces), centrifugadas a 8.000 rpm y resuspendidas en 250 µL de buffer Tritón (50 mM tampón PO₄ pH 7.9, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 0.1% de Tritón X-100) y se añadieron a cada muestra. Luego se incubaron por 12 h en un agitador rotatorio (Ovan N12E, EE.UU) a 4°C. Al día siguiente, se separó el sobrenadante de las perlas magnéticas tras centrifugación a 10.000 rpm durante 5 min y el contenido de cada muestra se transfirió a un nuevo tubo Axygen de 1.5 mL. Para la inmunoprecipitación de c/EBPβ se tomaron 300 µL de sobrenadante (incluye 100 µL de buffer tritón), 50 µL de perlas magnéticas unidas a proteína A (previamente lavadas y resuspendidas en 250 µL de buffer Tritón) y 2 µL (equivalente a 1,2 µg) de anticuerpo monoclonal anti c/EBPβ (ABCAM, ab 32358) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Luego, los tubos con inmunoprecipitado se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min descartando el sobrenadante y lavando las perlas magnéticas con 1.5 mL de buffer tritón. Este paso se repitió cuatro veces más. Luego las perlas de cada tubo se lavaron con 1.5 mL de PBS 1x (Hyclone, Utah, EE. UU), seguido de centrifugación a 10.000 rpm durante 5 min y eliminación del sobrenadante. Para liberar el inmunocomplejo de las perlas se añadieron 200 µL de buffer de liberación (Tris 62 mM, NaCl 200 mM, SDS al 2% más DTT 10 mM) a cada tubo. Posteriormente, se incubaron en el termoblock (VWR Scientific, EE.UU) a 65°C por 12 h. Al día siguiente, se centrifugó y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Axygen. El ADN eluído,

se extrajo y se purificó al añadir 200 μ L de fenol-cloroformo (1:1) (Merck, Alemania) a cada tubo, se mezcló bien y se centrifugó. La fase superior acuosa fue transferida a un nuevo tubo Axygen y se le añadió 200 μ L de cloroformo (Merck, Alemania). La mezcla se homogenizó a través de vortex (SciLogex MX-S, EE.UU) y nuevamente se centrifugó. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo Axygen y se le agregó 20 μ L de acetato de sodio (NaOAc) 3 M, pH 5, se homogenizó y agregó 600 μ L de etanol absoluto frío (Merck, Alemania). Luego se incubó durante 30 min a -80°C . Después de centrifugar y descartar el sobrenadante se agregó 1.5 mL de etanol frío (Merck, Alemania) al 80% y los tubos se centrifugaron manteniendo el precipitado de cada muestra, el mismo que fue secado en el equipo ADN speed vac (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU). El ADN purificado se resuspendió en 20 μ L de buffer TE (Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1mM) y se almacenó a -80°C hasta su análisis. El análisis del sitio de unión de c/EBP β al promotor Zp en la posición +2 y +8 fue evaluado por qPCR en el sistema ARIAMx Real Time PCR System - Agilent Technologies. El volumen final de reacción fue de 25 μ L y contuvo SensiMix™ SYBER® master mix (Bioline) y partidores específicos (22 μ M) para la región consenso de c/EBP β en el promotor Zp (secuencia forward: 5' TAGCACGTCCCAAACCATGA 3' y secuencia reverse: 5' TACCGGATTGCCAAGCTTCC 3'). Las condiciones de termociclado fueron: 95°C durante 30 seg, 94°C durante 30 seg, 58°C durante 20 seg, 72°C durante 20 seg. Para el análisis de melting: 95°C durante 15 seg, 60°C durante 1 min y 95°C durante 15 seg para un total de 30 ciclos. Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 1.5%. Por otro lado, los dos tubos cónicos de 15 mL con ADN genómico fueron purificados con el kit Zymo Research DNA fungal/bacterial microprep, (California, EE.UU) según las instrucciones del fabricante. Este ADN fue usado como control de calidad para verificar que cada muestra tenga la misma cantidad de ADN input. Una alícuota de 100 μ L de cromatina de cada condición experimental fue mezclada con 100 μ L de buffer de liberación e incubada y procesada como se describió para las muestras de inmunoprecipitados. El ADN fue almacenado a -80°C . Luego cada muestra fue evaluada mediante qPCR con partidores específicos para β actina (secuencia forward: 5' AGCGAGCATCCCCAAAGTT 3' y secuencia reverse: 5' GGGCACGAAGGCTCATCATT 3'). Posteriormente, los productos de

qPCR se analizaron en gel de agarosa al 1.5%. El reclutamiento de c/EBP β en la región Z ρ se determinó mediante qPCR.

Análisis Estadístico

Los análisis ANOVA, Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, test student para los datos obtenidos se realizaron con el software Graphpad Prism v9 (La Jolla, California, EE.UU). Las barras de error se incluyeron para indicar la desviación estándar. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Para el análisis *in silico* se establecieron las diferencias significativas entre las 4 variables del HT a través del test de Fisher en el software estadístico STATA/BE. Para los datos de ChIP-qPCR, se determinó el valor de Ct para el locus objetivo, como indicativo de asociación positiva de la proteína c/EBP β en el ADN. Para obtener el porcentaje de ADN input, se normalizó cada Ct obtenido por cada condición experimental contra los valores de Ct del ADN input.

RESULTADOS

1. Estandarización de las condiciones experimentales

1.1 Actividad biológica de CHC en células orales

Estudios previos han demostrado que el CHC biológicamente activo promueve la expresión del gen *cyp1b1*, que codifica para una de las enzimas oxidativas del citocromo P-450. Para evaluar la funcionalidad del CHC, se determinaron los niveles de transcritos de *cyp1b1* mediante qPCR post-exposición a DMSO o CHC. Se observó que el tratamiento con 10 $\mu\text{g/mL}$ de CHC en las células SCC-143 induce un incremento significativo de *cyp1b1* luego de 4 y 8 h de exposición a CHC con respecto al control. Adicionalmente, en las células CAL-27 se observó un incremento significativo de *cyp1b1* solo a las 8 h de exposición a CHC (**Figura 7**).

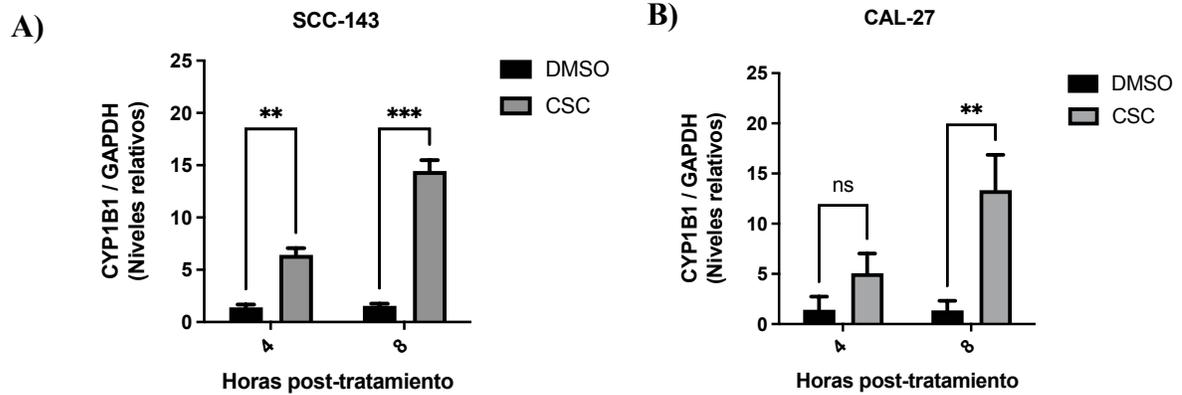


Figura 7. Actividad biológica del CHC en células orales. El ARNm de *cyp1b1* se evaluó mediante qPCR en las células **A)** SCC-143 y **B)** CAL-27 después del tratamiento con DMSO y CHC (10 µg/mL) durante 4 y 8 h de exposición. La exposición a 10 µg/mL de CHC aumenta los niveles de expresión del gen *cyp1b1*, en células SCC-143 y CAL-27. Los niveles relativos de los transcritos fueron normalizados contra el gen housekeeping *gapdh* y determinados bajo el método del $\Delta\Delta CT$. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. Las líneas verticales representan la desviación estándar. Test estadístico: ANOVA. ns: no significativo, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

1.2 Ensayo de proliferación en células orales

Las células fueron sembradas a tres diferentes densidades (1×10^3 , 3×10^3 , 5×10^3) y evaluadas por método MTS. Se observa la cinética de crecimiento, la misma que aumenta exponencialmente en las dos líneas celulares por cada periodo de tiempo evaluado. El máximo peak de crecimiento se observó en la densidad celular más alta a las 72 h (5×10^3) en células SCC-143 y CAL-27 (**Figura 8**). Además, las células CAL-27 proliferan mucho más rápido que las células SCC-143. De esa manera se determinó que 5×10^3 células/pocillo es la densidad óptima celular para los ensayos de viabilidad para ambas líneas celulares.

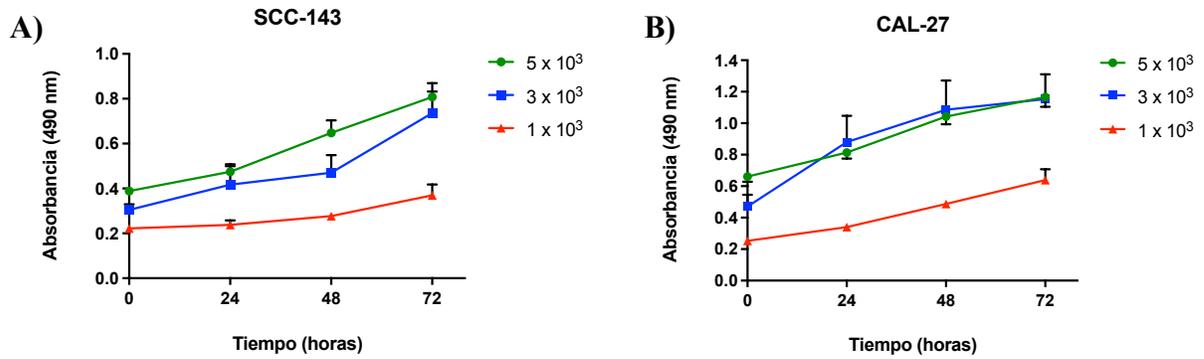


Figura 8. Ensayo de proliferación celular. Se evaluó la tasa proliferativa en las células A) SCC-143 y B) CAL-27 sembradas a 3 densidades diferentes. La medición de la absorbancia se realizó entre 0 y 72 h. Los datos son representativos de un experimento independiente con cinco réplicas técnicas. Las líneas verticales representan la desviación estándar. Figuras creadas con GraphPad Prism 9.

1.3 Ensayo de viabilidad de células orales en presencia de CHC

El CHC es elaborado a partir de cigarrillos estándar 3R4F y contiene material particulado con aproximadamente 60 compuestos carcinógenos, incluidos hidrocarburos policíclicos aromáticos y nitrosaminas, los cuales pueden ser tóxicos para las células.

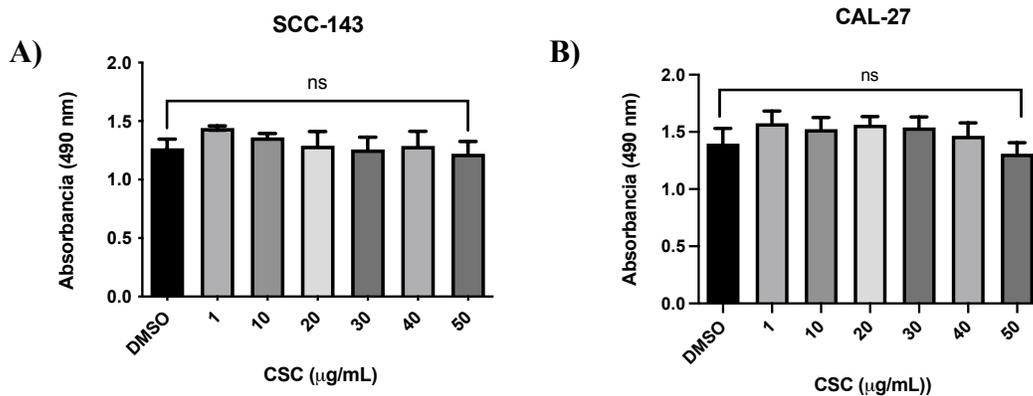


Figura 9. Ensayos de viabilidad celular. Ensayo MTS realizado en las células SCC-143 y CAL-27 durante 24 h de exposición a varias concentraciones de CHC (1 µg/mL y 50 µg/mL). Los componentes del condensado del humo de cigarrillo no inducen pérdida de viabilidad en las células A) SCC-143 y B) CAL-27. Los datos son representativos de un experimento independiente. Las líneas verticales representan la desviación estándar. Test estadístico: Kruskal Wallis. ns: no significativo. Figuras creadas con GraphPad Prism 9.

Por este motivo se evaluaron varias concentraciones de CHC que no inducen toxicidad celular. Se observó que el tratamiento con CHC durante 24 h no disminuye significativamente la viabilidad en ambas líneas celulares. La concentración mínima no tóxica evaluada fue de 10 µg/mL y la máxima de 50 µg/mL (**Figura 9**).

1.4 Secuenciación del promotor viral Zp

La secuenciación de Sanger reveló que la región promotora de Zp está conformada por 683 nucleótidos (**Figura 10**). Dicho promotor se encuentra clonado en el vector dual pmir-GLO (tamaño 7389 pb) en la región reconocida por las enzimas BglIII y ApaI. Otros elementos de este vector incluyen el primer gen reportero luciferasa de luciérnaga (*luc*) el cual está bajo el control del promotor Zp y el segundo gen reportero normalizador renilla luciferasa (*hRluc*) está bajo el control del promotor SV40. Además, este vector posee un gen que le confiere resistencia ampicilina (beta lactamasa) (**Figura 11**).

```
5'AGGTGTGTCAGCCAAAGAGGATCAGGCCCTTCCATCCACCCGGATCCCCGTG
GGCCAACCGGCCCTGCCTGCCTCTTTGGCTCCCACCCCCACAGGACCTGTCC
ATGAACCGATCGGATCCCTAACGCCAGCCCCAGTGCCCCGGCCACTTGACCCG
GCCCCGCAGTAACCCCGAGGCAAGTCATCTGTTGGAGGACCCTGATGAGGA
AACCAGTCAGGCCGTGAAGGCCCTAAGGGAGATGGCTGACACTGTTATTCCTCA
GAAGGAGGAAGCAGCCATATGTGGACAGATGGACCTGAACCACCCGCCCTC
GTGGCCATTTGGACGAAGTACCACAACTAGAGTCCATGACAGAGGATTTGA
ATCTGGACTCCCCCTGACCCCGAAGTAAATGAAATCTTGGATACATTTCTAAA
TGATGAATGTCTGCTGCATGCCATGCATATTTCAACTGGGCTGTCTATTTTTGAC
ACCAGCTTATTTTAGACACTTCTGAAAAGTGCCTCCTCCTCTTTTAGAAACTATGC
ATGAGCCACAGGCATTGCTAATGTACCTCATAGACACACCTAAATTTAGCACGTC
CAAACCATGACATCACAGAGGAGGCTGGTGCCTTGGCTTTAAAGGGGAGATGT
TAGACAGGTAACACTACTAAACATGTCACCTTGCCGG3'
```

Figura 10. Secuencia de nucleótidos del promotor Zp. El promotor viral Zp clonado en el vector dual pmir-GLO tiene una longitud de 683 nucleótidos. La caja TATA se muestra en amarillo y el sitio de inicio de la transcripción CAT en celeste.

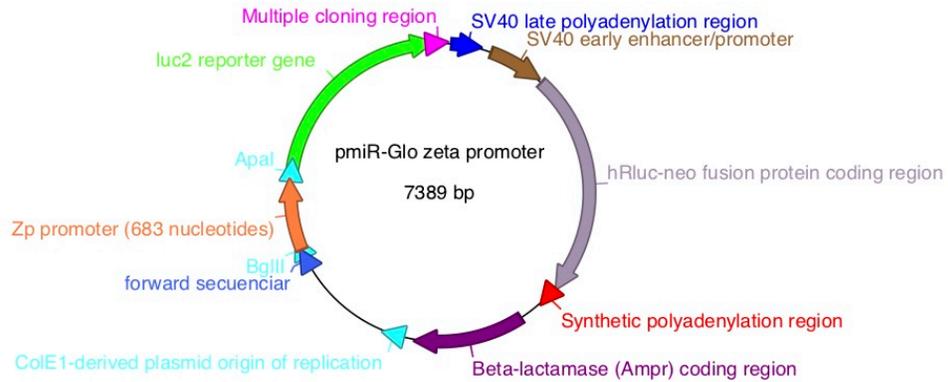


Figura 11. Estructura del vector reportero dual pmir-GLO. Este vector tiene un tamaño de 7389 nucleótidos, que incluye la secuencia del promotor viral Zp, dos genes reporteros bajo el control de diferentes promotores y un gen de resistencia a ampicilina.

La base de datos Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) determinó que el origen del promotor viral Zp pertenece a un aislado clínico de carcinoma nasofaríngeo NPCT090 (cobertura e identidad del 100% - código de acceso MK540447.1). Adicionalmente, se realizó un alineamiento de secuencias entre el promotor clonado en el vector dual pmir-GLO y la cepa prototipo de VEB B95.8 (código de acceso: V01555.2 - cobertura del 100%). Se encontró que comparten una identidad del 99.27%, con la presencia de 5 diferencias nucleotídicas en la posición 114 (G-A), 138 (G-A), 146 (A-G), 209 (A-G), 304 (G-A) (**Figura 12**).

```

B95.8 1 AGGTGTGTCAGCCAAAGAGGATCAGGCCCTTCCATCCACCCGGATCCCCGTGGGCCAACCC 60
NPC90 1 AGGTGTGTCAGCCAAAGAGGATCAGGCCCTTCCATCCACCCGGATCCCCGTGGGCCAACCC 60
B95.8 61 GGCCCCCTGCCTGCCTCTTTGGCTCCCACCCACAGGACCTGTCCATGAACCGGTCGGAT 120
NPC90 61 GGCCCCCTGCCTGCCTCTTTGGCTCCCACCCACAGGACCTGTCCATGAACCGATTCGGAT 120
B95.8 121 CCCTAACGCCAGCCCCGGTGCCCCAGCCACTTGACCCGGCCCCCGCAGTAACCCCGAGG 180
NPC90 121 CCCTAACGCCAGCCCCAGTGCCCCGGCCACTTGACCCGGCCCCCGCAGTAACCCCGAGG 180
B95.8 181 CAAGTCATCTGTTGGAGGACCCTGATGAAAGAAACCAGTCAGGCCGTGAAGGCCCTAAGGG 240
NPC90 181 CAAGTCATCTGTTGGAGGACCCTGATGAGGAAACCAGTCAGGCCGTGAAGGCCCTAAGGG 240
B95.8 241 AGATGGCTGACACTGTTATTCCCAGAAAGGAGGAAGCAGCCATATGTGGACAGATGGACC 300
NPC90 241 AGATGGCTGACACTGTTATTCCCAGAAAGGAGGAAGCAGCCATATGTGGACAGATGGACC 300
B95.8 301 TGAGCCACCCGCCCTCGTGGCCATTTGGACGAACTGACCACAACACTAGAGTCCATGA 360
NPC90 301 TGAAACACCCGCCCTCGTGGCCATTTGGACGAACTGACCACAACACTAGAGTCCATGA 360
B95.8 361 CAGAGGATTTGAATCTGGACTCCCCCTGACCCCGAACTTAATGAAATCTTGGATACAT 420
NPC90 361 CAGAGGATTTGAATCTGGACTCCCCCTGACCCCGAACTTAATGAAATCTTGGATACAT 420
B95.8 421 TTCTAAATGATGAATGTCTGCTGCATGCCATGCATATTTCAACTGGGCTGTCTATTTTTG 480
NPC90 421 TTCTAAATGATGAATGTCTGCTGCATGCCATGCATATTTCAACTGGGCTGTCTATTTTTG 480
B95.8 481 ACACCAGCTTATTTTAGACACTTCTGAAAAGTGCCTCCTCCTCTTTTAGAAAATATGCAT 540
NPC90 481 ACACCAGCTTATTTTAGACACTTCTGAAAAGTGCCTCCTCCTCTTTTAGAAAATATGCAT 540
B95.8 541 GAGCCACAGGCATTGCTAATGTACCTCATAGACACACCTAAATTTAGCACGTCCCAAACC 600
NPC90 541 GAGCCACAGGCATTGCTAATGTACCTCATAGACACACCTAAATTTAGCACGTCCCAAACC 600
B95.8 601 ATGACATCACAGAGGAGGCTGGTGCCTTGGCTTTAAAGGGGAGATGTTAGACAGGTAAC 660
NPC90 601 ATGACATCACAGAGGAGGCTGGTGCCTTGGCTTTAAAGGGGAGATGTTAGACAGGTAAC 660
B95.8 661 CACTAAACATTGCACCTTGCCGG 683
NPC90 661 CACTAAACATTGCACCTTGCCGG 683

```

Figura12. Alineamiento de secuencias del promotor Zp entre las cepas B95.8 y NPCT090. El promotor viral Zp contiene 5 diferencias con relación a la cepa de referencia de VEB B95.8. Los 5 polimorfismos (resaltados en rosado) se encuentran en la posición 114 (G-A), 138 (G-A), 146 (A-G), 209 (A-G), 304 (G-A).

1.5. Estandarización del vector dual pmir-GLO Zp en células orales

Para conocer la cantidad óptima de vector a transfectar, las células SCC-143 y CAL-27 fueron sembradas y transfectadas con el vector dual pmir-GLO Zp *wild type* en un rango de 50 ng a 1000 ng. Luego se evaluó la actividad de luciferasa post tratamiento con dos concentraciones no tóxicas de CHC (50 µg/mL y 10 µg/mL). Se observó que la transfección de 250 ng de vector en las células SCC-143 y 500 ng en las células CAL-27 induce mayor actividad de luciferasa (**Figura 13**)

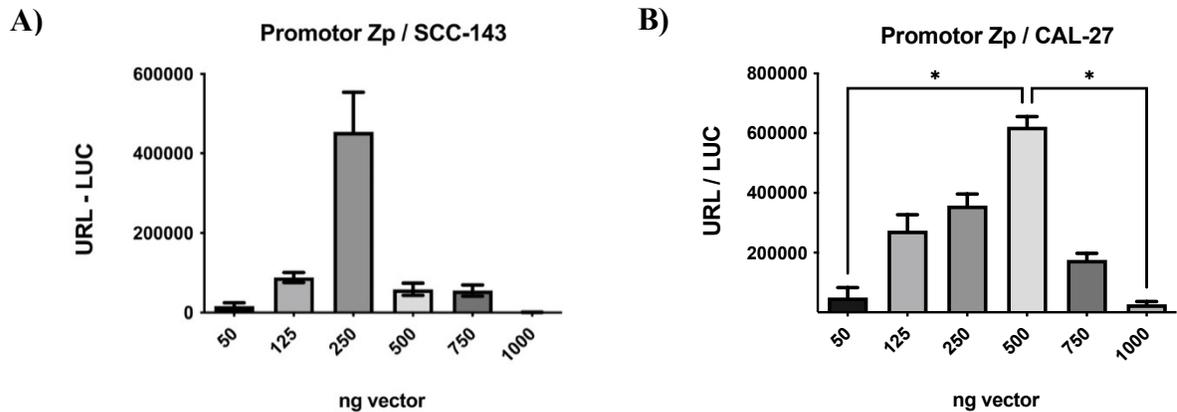


Figura 13. Estandarización de la cantidad de vector reportero dual pmir-GLO a transfectar. Actividad de luciferasa post transfección de 50 ng a 1000 ng de vector reportero dual pmir-GLO. La actividad de luciferasa aumenta cuando las células **A)** SCC-143 y **B)** CAL-27 son transfectadas con 250 ng y 500 ng respectivamente de vector dual pmir-GLO. Los resultados fueron normalizados contra renilla-luciferasa y son representativos de un experimento independiente. Las líneas verticales representan la desviación estándar. Test estadístico: Kruskal-Wallis.* $p < 0.05$. URL: unidades relativas de luminiscencia. LUC: luciferasa. Figuras creadas con GraphPad Prism 9.

1.6 Actividad del promotor viral Zp

Con el fin de conocer si la exposición a CHC induce activación en el promotor viral Zp de VEB, se realizó el ensayo de luciferasa. Las células SCC-143 y CAL-27 fueron sembradas, transfectadas con 250 ng y 500 ng respectivamente de vector reportero dual pmir-GLO y expuestas a CHC durante 24 h. Se observó que el tratamiento con 50 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$ de CHC producen activación de promotor viral Zp en las células SCC-143 y en las células CAL-27 (**Figura 14**).

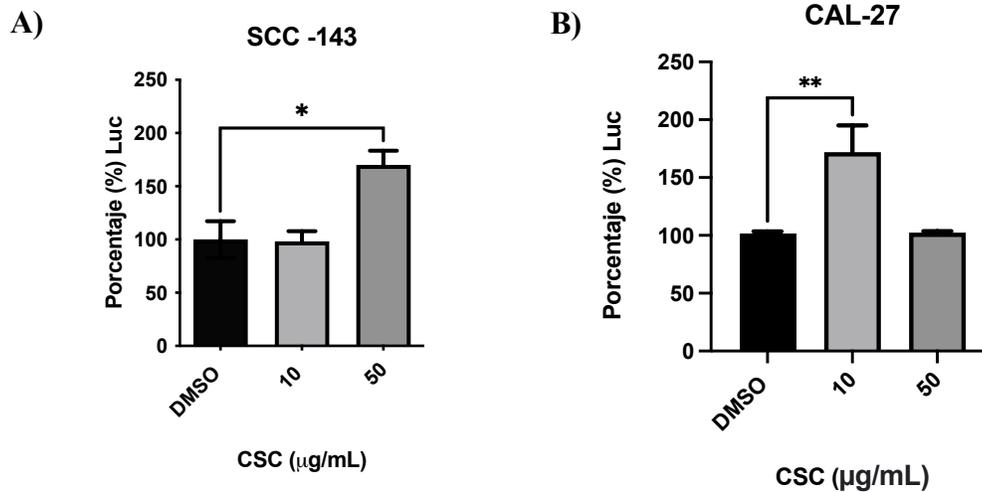


Figura 14. El promotor Zp es activado por CHC en células orales. Actividad de luciferasa en las células **A)** SCC-143 y **B)** CAL-27 previamente transfectadas con el vector dual pmirGLO Zp *wild type* (250 ng y 500 ng) y tratadas con DMSO y CSC durante 24 h. El tratamiento con 50 µg/mL y 10 µg/mL respectivamente de CHC activa el promotor Zp. Luc: luciferasa. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Las líneas verticales representan la desviación estándar. Test estadístico: ANOVA. *p<0.05, **p<0.001. Figuras creadas con GraphPad Prism 9.

1.7 Mutantes de delección y mutante de sustitución

Según el ensayo anterior el promotor Zp es activado por la exposición a 50 µg/ml y 10 µg/mL de CHC en las células SCC-143 y CAL-27 respectivamente. En este ensayo se evaluó la actividad de luciferasa tanto en la cepa *wild type* como en las tres mutantes sintetizadas, cuya estructura se indica en la **Figura 15**. La síntesis de las tres mutantes está basado en el análisis in silico del objetivo dos de este trabajo con respecto a los sitios de reconocimiento de la proteína c/EBP. En la mutante uno (MUT 1) se eliminó desde el dominio ZIIIB hasta el dominio ZV' (132 nucleótidos) ya que esos dos dominios son reconocidos por la proteína c/EBP. En la mutante dos (MUT 2) se eliminó desde el dominio ZIA hasta el dominio ZV' (351 nucleótidos) ya que según estudios previos estas regiones son importantes para la activación de Zp. En la mutante 3 (MUT 3) se realizó una sustitución de una C por una G en la posición +8 en el dominio ZV'

del promotor, ya que esta región es reconocida tanto por la isoforma c/EBP α y c/EBP β , de manera que esta región solo sea reconocida por la isoforma c/EBP α .

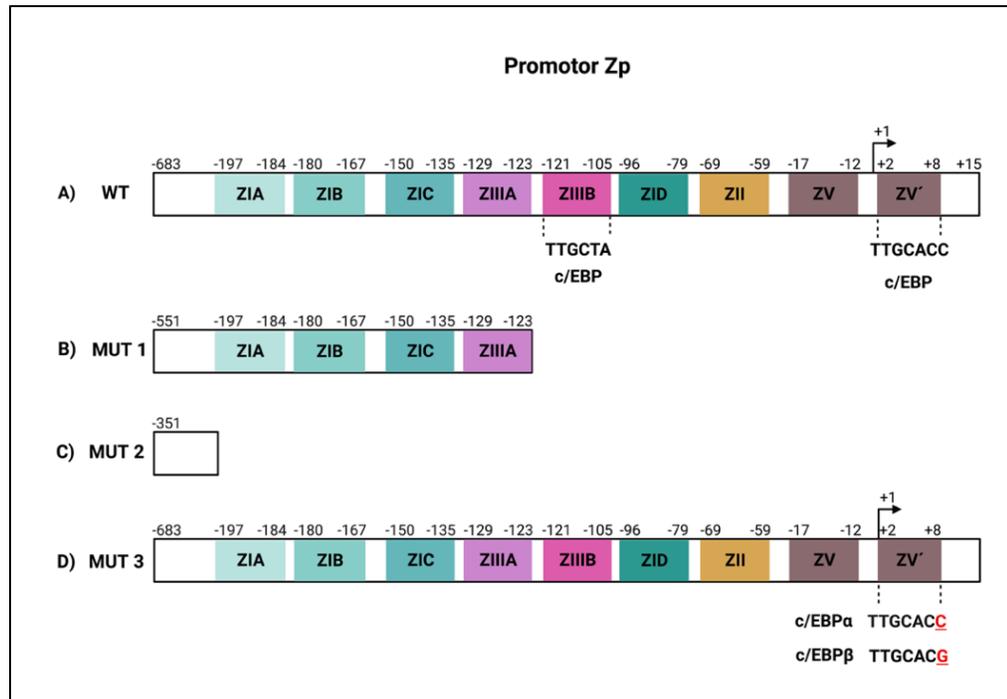


Figura 15. Estructura del promotor Zp *wild type* y de mutantes. En rectángulos se muestran los 9 dominios regulatorios cis-acting para la activación transcripcional de Zp. **A)** El promotor *wild type* (WT) está formado por 683 nucleótidos. Los sitios de reconocimiento del FT celular c/EBP son ZIIIB y ZV'. **B)** El promotor Zp en la MUT 1 tiene una longitud de 551 nucleótidos debido a una delección en la posición -129 hasta la +15. **C)** El promotor Zp en la MUT 2 tiene una longitud de 351 nucleótidos debido a una delección desde la posición -332 hasta la +15. **D)** El promotor Zp en la MUT 3 tiene una longitud de 683 nucleótidos con una sustitución de una C por una G en la posición +8 en del dominio ZV'. El +1 indica el sitio de inicio de la transcripción. Figura creada con BioRender.com.

Las células SCC-143 transfectadas con MUT 1, MUT 2, MUT 3 y tratadas con 50 μ g/mL de CHC mostraron una disminución en la actividad luciferasa en un 42%, 51% y 57% respectivamente con respecto al promotor Zp *wild type*. Las células CAL-27 transfectadas con MUT 1, MUT 2, MUT 3 y tratadas con 10 μ g/mL de CHC mostraron una disminución en la actividad luciferasa en un 33%, 52% y 90% respectivamente con respecto al promotor Zp *wild type* (**Figura 16**).

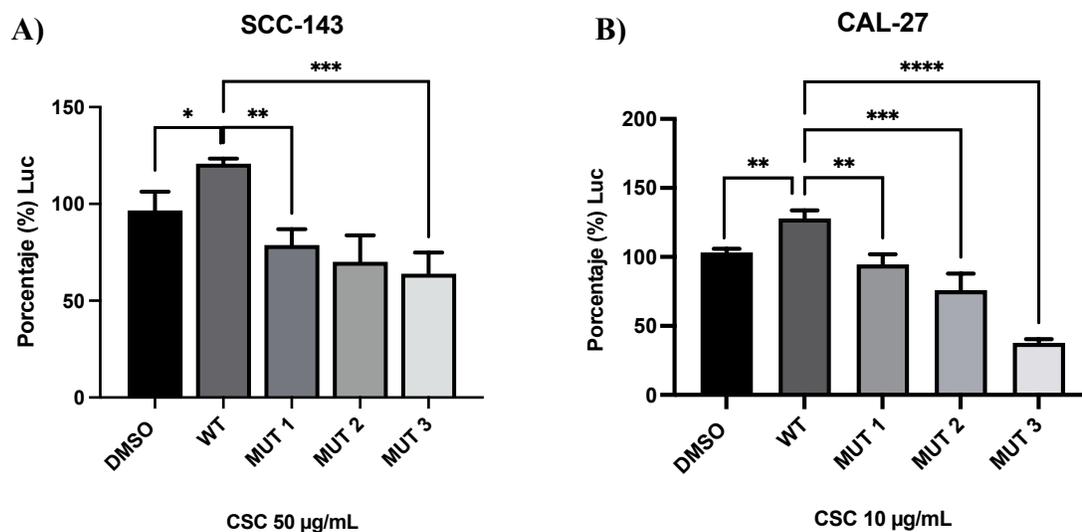


Figura 16. Mutaciones en el promotor Zp disminuyen la actividad de luciferasa a CHC en células orales. Actividad de luciferasa en las células **A)** SCC-143 y **B)** CAL-27 previamente transfectadas (250 ng y 500 ng, respectivamente) con los vectores duales pmir-GLO Zp *wild type*, MUT 1, MUT 2 y MUT 3 y tratadas con 50 µg/mL y 10 µg/mL de CHC o DMSO en concentraciones equivalentes durante 24 h. La actividad de luciferasa aumentó en ambas líneas celulares para la situación *wild type* y disminuyó significativamente para cada mutante transfectada. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Las líneas verticales representan la desviación estándar. Test estadístico: ANOVA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$. Figuras creadas con GraphPad Prism 9.

1.8 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Para analizar la eficiencia de transfección en el ensayo de activación del promotor viral Zp en las células SCC-143, se realizó transfección con el promotor Zp WT y las tres mutates post exposición a 50 µg/mL de CSC. Para las células transfectadas con el promotor WT, MUT 1, MUT 2 y MUT 3 se obtuvo una eficiencia del 77.4%, 73,9%, 74,1% y 76,1% (**Figura 17**).

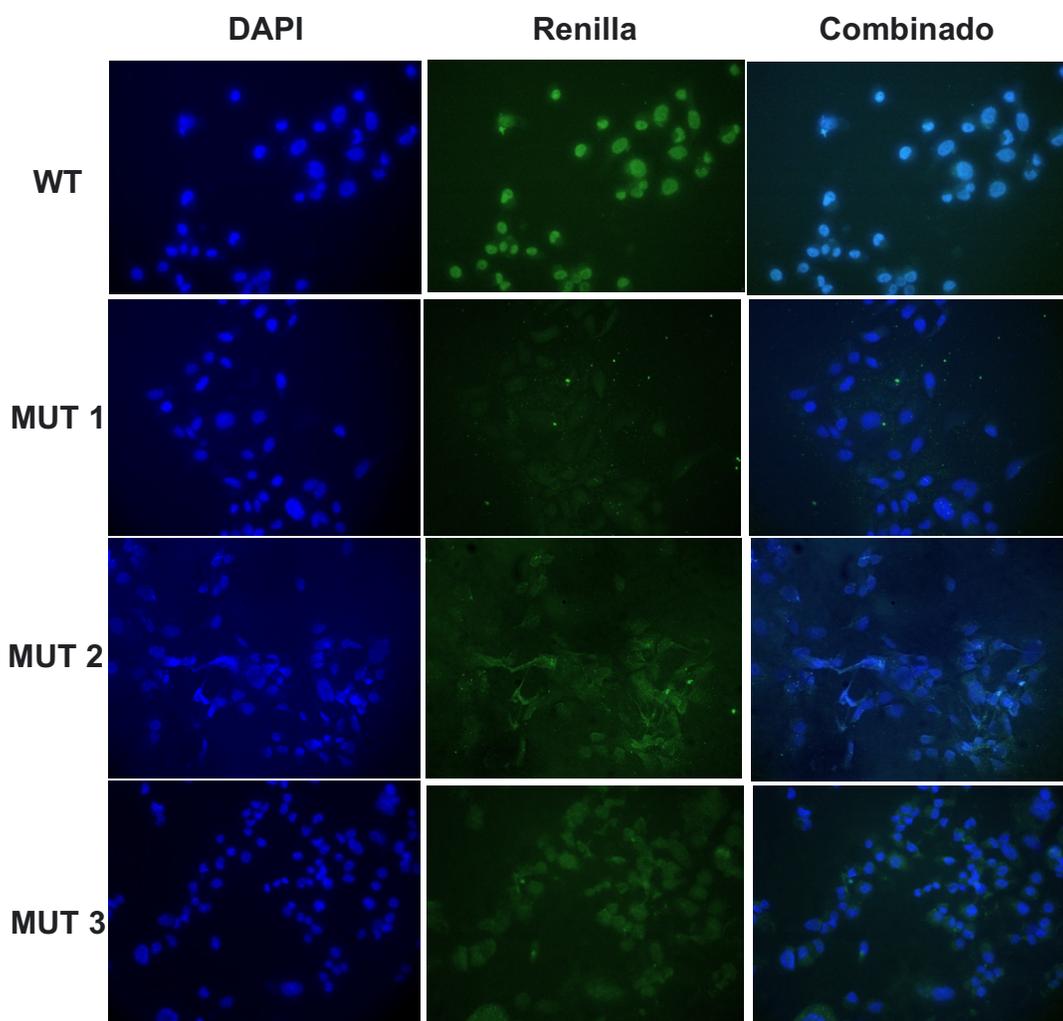


Figura 17. Eficiencia de transfección por IFI en las células SCC-143. Microscopía para la proteína reportera renilla luciferasa en las células SCC-143. Las células SCC-143 fueron transfectadas con el promotor *Zp wild type* (WT) y las mutantes MUT 1, MUT 2 y MUT 3 de este promotor. La fluorescencia se observó después de la exposición a 50 µg/mL de CHC. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las imágenes se procesaron en el programa infinity analyze y tienen un aumento de 40x. Los resultados son representativos de un experimento independiente.

Para analizar la eficiencia de transfección en el ensayo de activación del promotor viral *Zp* en las células CAL-27, se realizó transfección con el promotor *Zp* WT y las tres mutates post exposición a 10 µg/mL de CHC. Para las células transfectadas con el promotor WT, MUT 1, MUT 2 y MUT 3 se obtuvo una eficiencia del 77.6%, 76,5%, 76,2% y 74,6% (**Figura 18**).

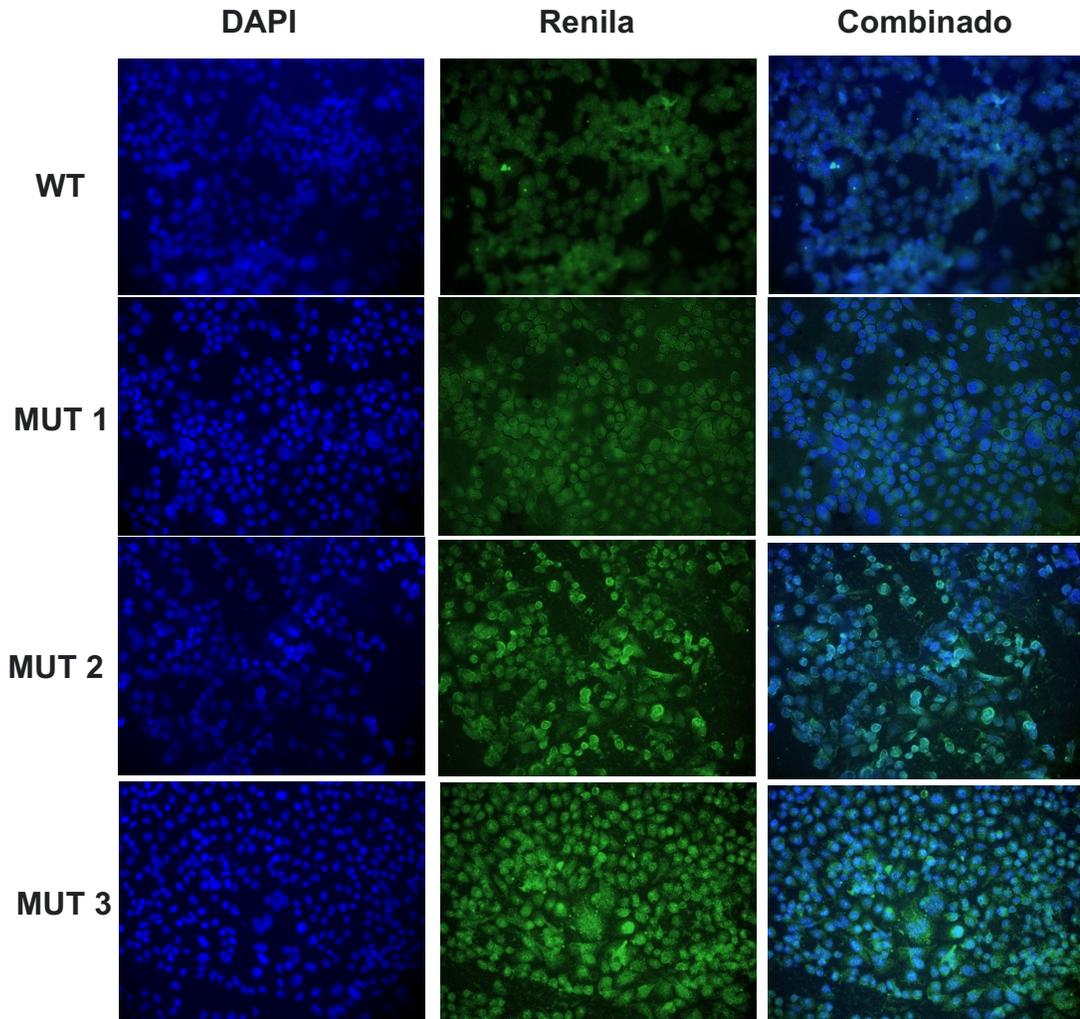


Figura 18. Eficiencia de transfección por IFI en las células CAL-27. Microscopía para la proteína reportera renila luciferasa en las células CAL-27. Las células CAL-27 fueron transfectadas con el promotor *Zp wild type* (WT) y las mutantes MUT 1, MUT 2 y MUT 3 de este promotor. La fluorescencia se observó después de la exposición a 10 µg/mL de CHC. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las imágenes se procesaron en el programa infinity analyze y tienen un aumento de 40x. Los resultados son representativos de un experimento independiente.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2

2. Determinar *in silico* factores de transcripción (FT) candidatos a ser reclutados en el promotor viral *Zp* en carcinomas asociados a la exposición al humo de cigarrillo.

2.1 Predicción Bioinformática

El programa PROMO V 8.3 a través de la generación de matrices de peso específicas y la base de datos TRANSFACT V 6.4. predijo 23 factores de transcripción (FT) y su unión a su secuencia objetivo en el promotor viral Zp. La predicción se llevó a cabo considerando solo FT humanos y una tasa máxima de disimilitud de matriz 1 (**Figura 19**).

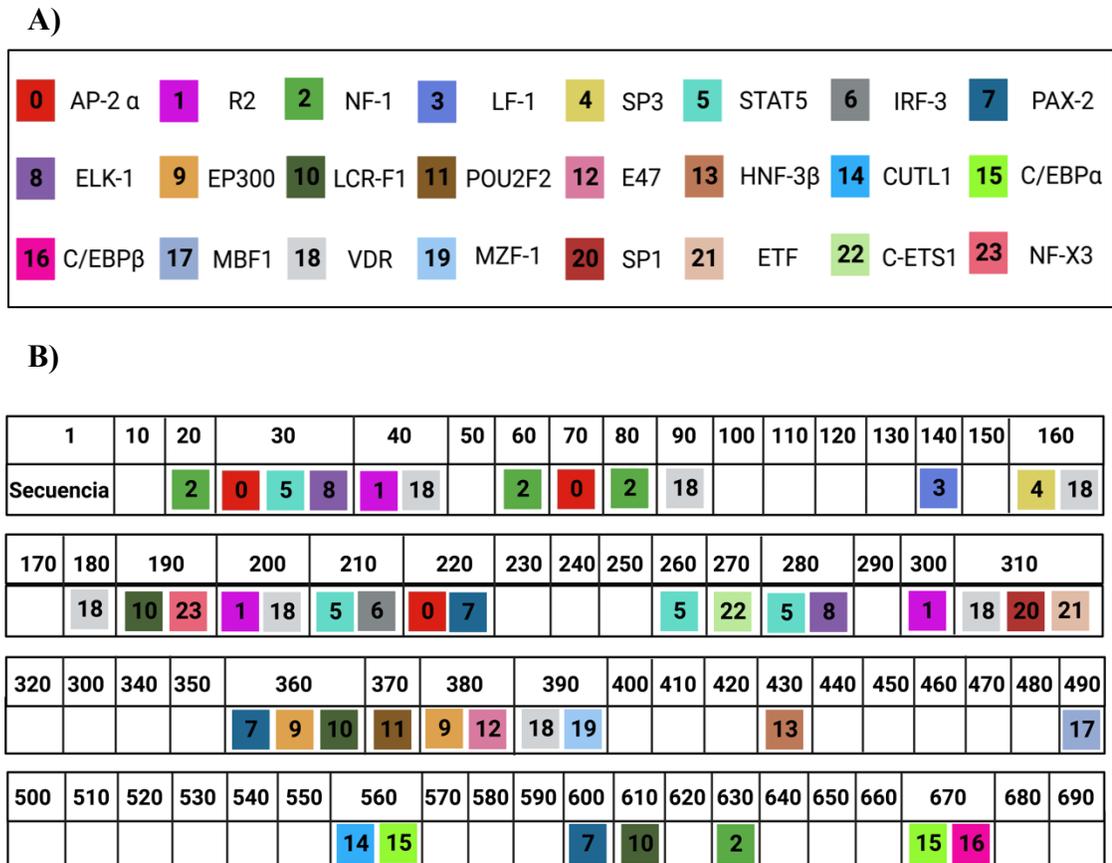


Figura 19. Factores de transcripción y sitios de unión en el promotor Zp. A) Análisis predictivo en el programa PROMO V 8.3. Como resultado se detectaron 23 proteínas celulares candidatas que reconocen secuencias específicas en el promotor Zp. **B) Matriz que especifica el sitio específico de reconocimiento de cada proteína.** La orientación del promotor Zp desde el nucleótido 1 hasta el 683 representa el extremo 5' a 3' de este promotor. Figura creada con BioRender.com

Para cada FT se describen varios parámetros. El nombre del factor con las posición inicial y final de las secuencias de unión. El porcentaje (%) de disimilitud que mide la

variación que existe entre la secuencia de unión del FT predicho y los motivos conocidos para dicho factor consultado. La secuencia de nucleótidos del sitio de unión potencial. La expectativa aleatoria (RE) indica el número de coincidencias esperadas en una secuencia aleatoria de la misma longitud que la secuencia de consulta según la tasa de disimilitud para los 4 nucleótidos y la expectativa aleatoria de consulta estima la frecuencia de los nucleótidos en la secuencia problema (**Tabla 1**).

Factor de T.	Posición inicial	Posición final	Disimilitud (%)	Secuencia	RE de igualdad	RE de consulta
AP-2 α	21	26	0.798453	TCAGGC	0.16675	0.17852
	67	72	0.000000	GCCTGC	0.33350	0.40993
	217	222	0.798453	TCAGGC	0.16675	0.17852
R2	30	35	0.000000	TCCATC	0.50024	0.56014
	34	39	0.000000	TCCACC	0.50024	0.56014
	190	195	0.000000	GTTGGA	0.50024	0.56014
	292	297	0.000000	GATGGA	0.50024	0.56014
NF-1	10	14	0.000000	GCCAA	0.66699	0.70953
	53	57	0.000000	GCCAA	0.66699	0.70953
	77	81	0.000000	TTGGC	0.66699	0.70953
	626	630	0.000000	TTGGC	0.66699	0.70953
LFA-1	138	144	0.780778	TGCCCCG	0.25012	0.28881
SP3	154	162	0.982066	CCCGGCCCC	0.00521	0.01101
STAT5	29	32	0.000000	TTCC	2.66797	2.5966
	208	211	0.000000	GGAA	2.66797	2.59667
	258	261	0.000000	TTCC	2.66797	2.59667
	271	274	0.000000	GGAA	2.66797	2.59667
IRF-3	208	214	0.658627	GGAAACC	0.16675	0.15676
PAX-2	216	222	0.958187	GTCAGGC	0.08337	0.08926
	354	360	0.591451	CCATGAC	0.12506	0.13382
	598	604	0.591451	CCATGAC	0.12506	0.13382
ELK-1	28	32	0.000000	CTTCC	0.66699	0.70640
	271	275	0.000000	GGAAG	0.66699	0.70640
P300	351	355	0.000000	AGTCC	0.69699	0.68503
	376	380	0.000000	GGACT	0.69699	0.68503
	378	382	0.770383	ACTCCC	0.69699	0.74670
LCR-F1	182	187	0.000000	AGTCAT	0.69699	0.60035
	356	361	0.000000	ATGACA	0.69699	0.60035
	600	605	0.000000	ATGACA	0.69699	0.60035

POU2F2	366	373	0.897235	ATTTGAAT	0.01042	0.00685
E47	372	378	0.523865	ATCTGGA	0.12506	0.12014
HNF-3β	423	429	0.610628	TAAATGA	0.16675	0.11657
CUTL1	551	556	0.967341	ATTGCT	0.66699	0.61535
c/EBPα	552	557	0.858813	TTGCTA	0.33350	0.32138
	669	674	0.644110	TTGCAC	0.33350	0.30438
c/EBP β	669	675	0.805985	TTGCACC	0.12506	0.11601
MBF1	488	498	0.000000	TTATTTTAGAC	0.00440	0.00339
VDR	37	40	0.000000	ACCC	2.66797	3.32325
	86	89	0.000000	ACCC	2.66797	3.32325
	153	156	0.000000	ACCC	2.66797	3.32325
	170	173	0.000000	ACCC	2.66797	3.32325
	198	201	0.000000	ACCC	2.66797	3.32325
	306	309	0.000000	ACCC	2.66797	3.32325
	389	392	0.000000	ACCC	2.66797	3.32325
MZF-1	380	386	0.056332	TCCCCCC	0.16675	0.24897
SP1	307	315	3.32325	CCCGCCCC	0.01042	0.02271
ETF	306	314	0.630521	ACCGCCCC	0.01563	0.03203
C- ETS-1	269	275	0.323073	GAGGAAG	0.12506	0.11966
NF-X3	183	190	3.32325	GTCATCTG	0.03127	0.03201

Tabla 1. Predicción *in silico* de factores de transcripción y sus sitios de unión al promotor Zp mediante PROMO V 8.3. Resumen del análisis predictivo en PROMO V 8.3 para los 23 FT que incluye la posición inicial y final de reconocimiento, la disimilitud (%), la secuencia reconocida y la RE de igualdad y de consulta. Información obtenida de https://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3

2.2 Identificación de genes relacionados al hábito tabáquico en pacientes con COCE

La base de datos del Atlas genómico del cáncer (TCGA) contempla 604 pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC) sin distinción de aquellos casos correspondientes a COCE. Por ese motivo, nuestro análisis solo se enfocó en 368 pacientes con COCE: 179 pacientes con carcinoma escamoso de lengua, 74 de labio, 56 de piso de boca, 43 de mejilla, 11 de encía y 5 de paladar (**Tabla 2**). Se excluyeron 236 pacientes que desarrollaron otros CECC, incluyendo 24 pacientes con cáncer en

la base de la lengua y pacientes que no tuvieron datos de secuenciación o asignación de categoría de hábito tabáquico.

Pacientes con COCE						
Lengua	Labio	Piso de Boca	Boca/Mejilla	Encías	Paladar	Total
179	74	56	43	11	5	368

Tabla 2. Categorización de pacientes con COCE. La información del número de pacientes y sitio anatómico de la cavidad oral afectado fue tomada del TCGA (atlas genómico del cáncer). Disponible en <https://portal.gdc.cancer.gov>.

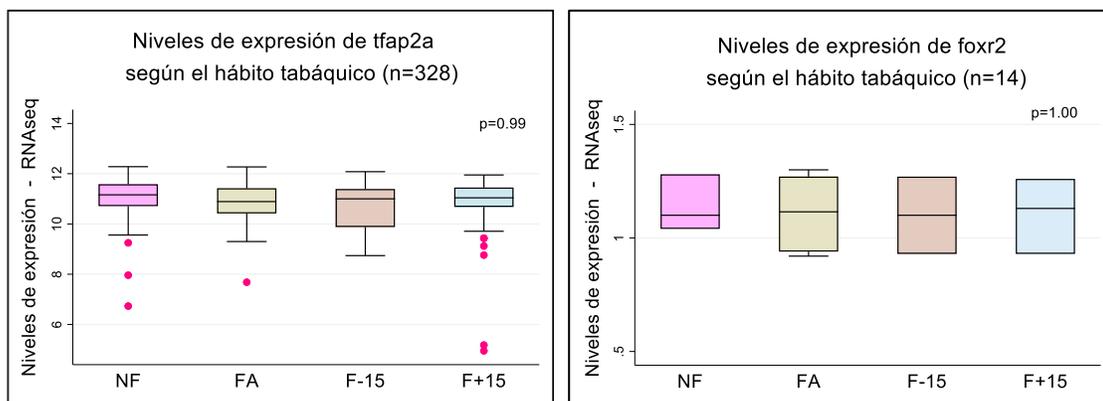
Los niveles de transcritos (RNAseq) de los genes que codifican para cada FT y el historial tabáquico de cada paciente se obtuvieron del programa Xena Browser (**Tabla 3**). Los pacientes y sus niveles de transcritos fueron agrupados por categorías: no fumadores NF (categoría 1), fumadores actuales FA (categoría 2), ex fumadores por menos de 15 años F-15 (categoría 3), ex fumadores por más de 15 años F+15 (categoría 4). Las variables continuas fueron transformadas en variables categóricas al agrupar a los pacientes dentro de niveles altos o bajos de expresión de los genes propuestos. Se analizó estadísticamente el incremento en los niveles de transcritos de cada gen que codifica para cada FT en los pacientes fumadores vs las otras 3 categorías.

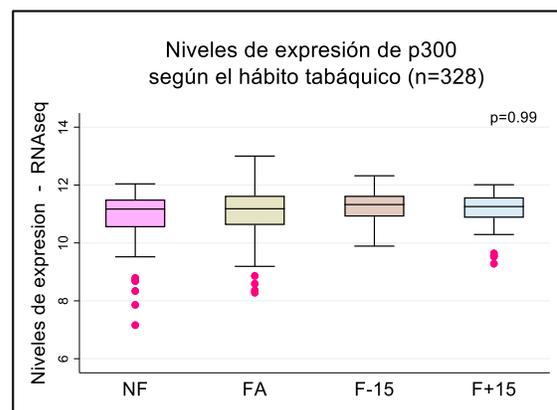
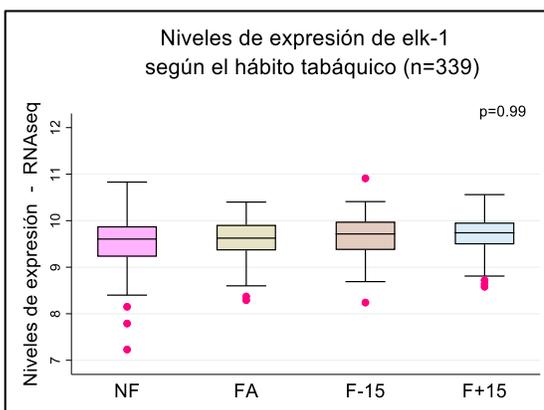
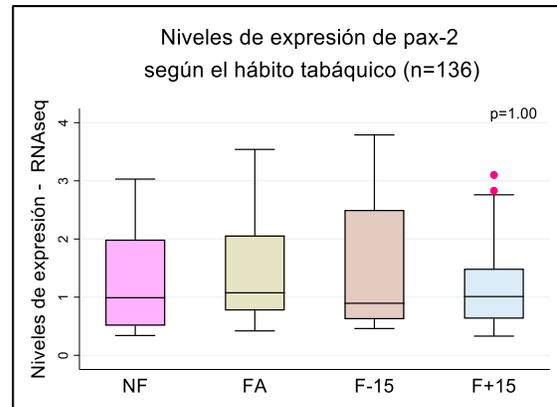
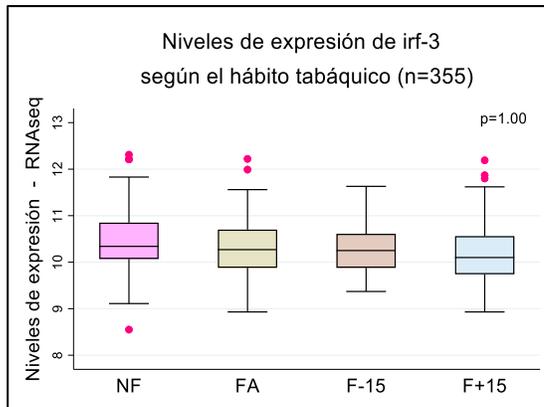
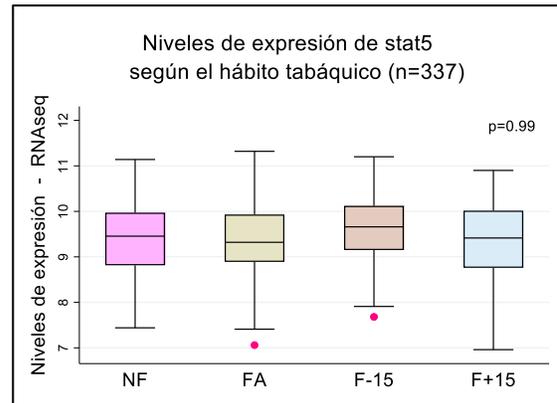
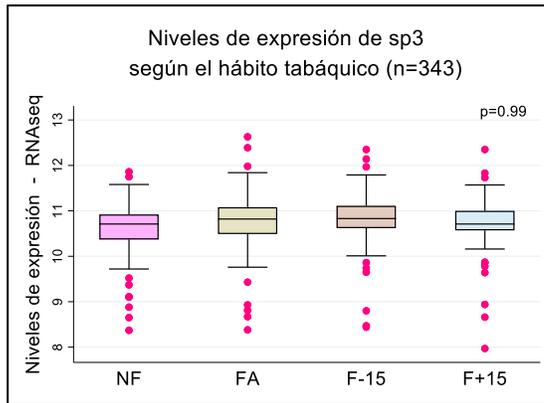
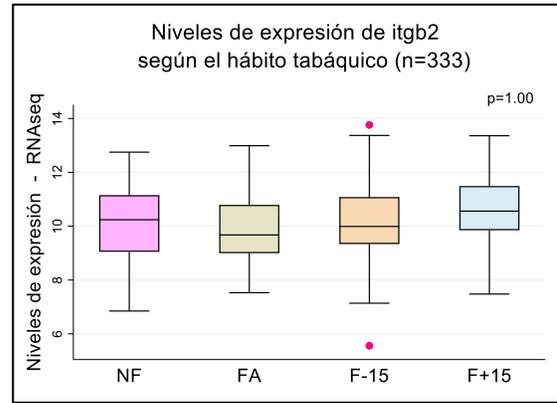
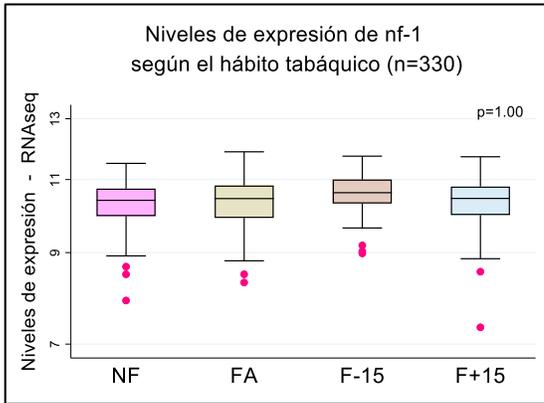
Gen	Proteína	Número de pacientes	Niv. mínimo de expresión	Niv. máximo de expresión	p valor
<i>tfap2a</i>	AP-2 α	328	7.68	12.08	0.99
<i>foxr2</i>	R2	14	0.92	1.30	1.00
<i>nf-1</i>	NF-1	330	7.33	11.87	1.00
<i>itgb2</i>	LFA-1	333	5.56	13.76	1.00
<i>sp3</i>	SP3	343	7.97	12.63	0.99
<i>stat5</i>	STAT5	337	6.96	11.32	0.99
<i>irf-3</i>	IRF-3	355	8.93	12.31	1.00
<i>pax-2</i>	PAX-2	136	0.42	3.79	1.00
<i>elk-1</i>	ELK-1	339	8.24	10.83	0.99
<i>p300</i>	EP300	328	9.89	13.00	0.99
<i>lcr-f1</i>	NFE2L1	322	19.94	23.00	0.99

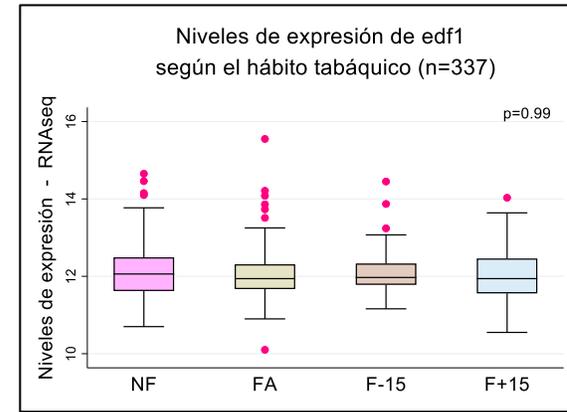
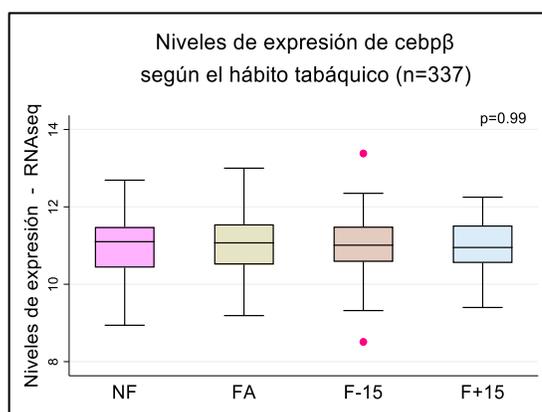
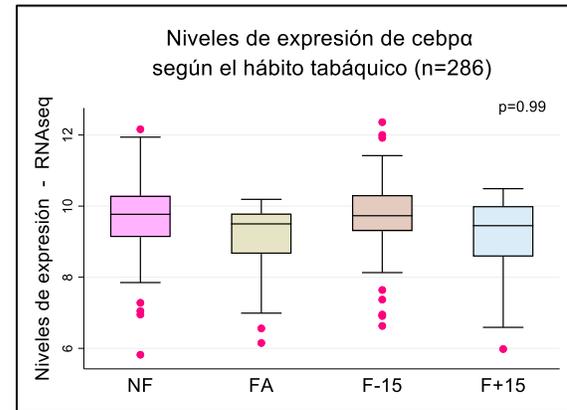
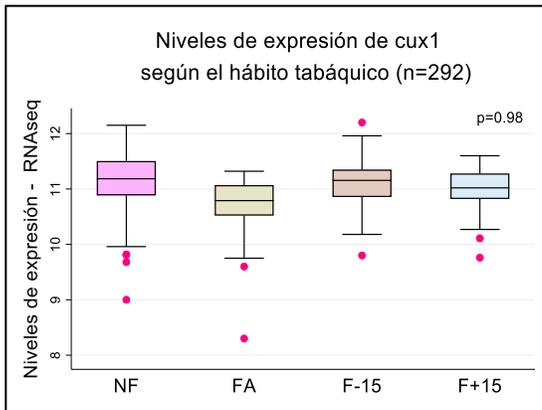
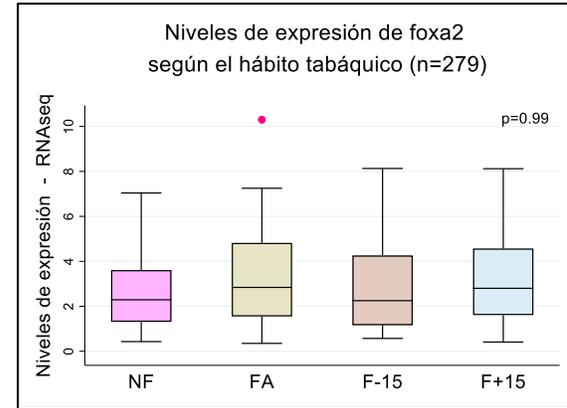
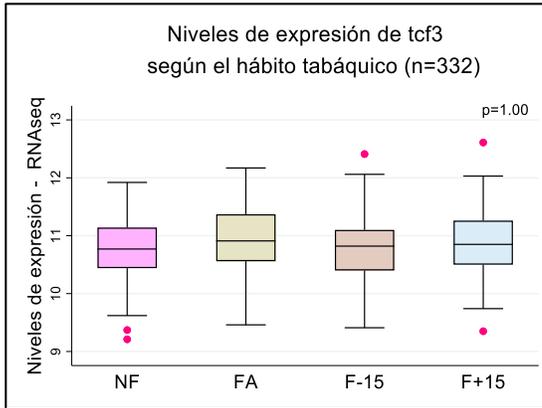
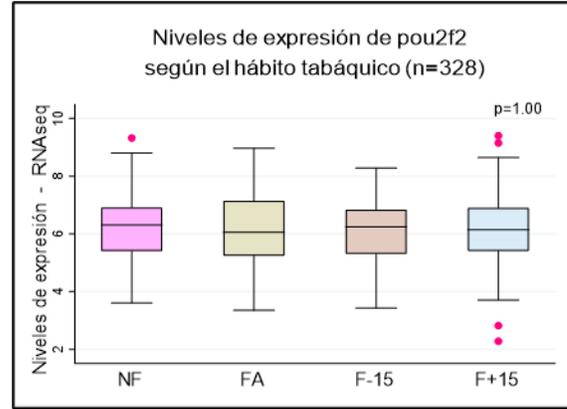
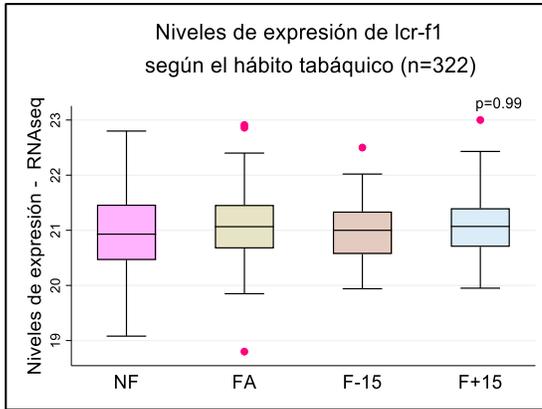
<i>pou2f2</i>	POU2F2	328	2.28	9.40	1.00
<i>tcf3</i>	E47	332	9.35	12.61	1.00
<i>foxa2</i>	HNF-3 β	279	0.35	8.13	0.99
<i>cux1</i>	CUTL1	292	8.38	12.15	0.98
<i>cbpa</i>	c/EBP α	286	5.82	12.36	0.99
<i>cebpβ</i>	c/EBP β	337	8.51	13.38	0.99
<i>edf1</i>	MBF1	337	10.10	15.55	0.99
<i>vdr</i>	VDR	316	13.48	19.37	1.00
<i>mzf-1</i>	MZF-1	368	8.49	10.99	0.99
<i>sp1</i>	SP1	337	8.78	12.05	0.98
<i>etfdh</i>	ETF	288	6.72	10.59	1.00
<i>ets1</i>	CETS1	328	7.90	13.65	1.00
<i>nkx3</i>	NKX3	307	6.10	11.73	0.99

Tabla 3. Niveles de expresión de los 23 FT en pacientes con COCE. Para cada gen candidato se muestra el número de participantes evaluados y los datos numéricos de expresión. Información extraída del programa Xena browser. El análisis estadístico se realizó en STATA/BE.

La cohorte de FA contempla pacientes que han fumado de 12 a 80 cajetillas de cigarrillos al año. La cohorte de F-15 está formada por ex fumadores que han consumido de 12 a 48 cajetillas de cigarrillos al año durante 2 a 15 años. La cohorte de F+15 está formada ex fumadores que han consumido de 15 a 97 cajetillas de cigarrillos al año de 15 a 61 años. Los análisis de correlación entre el historial tabáquico y los niveles de expresión génica para la cohorte de COCE categorías analizadas (**Figura 19**).







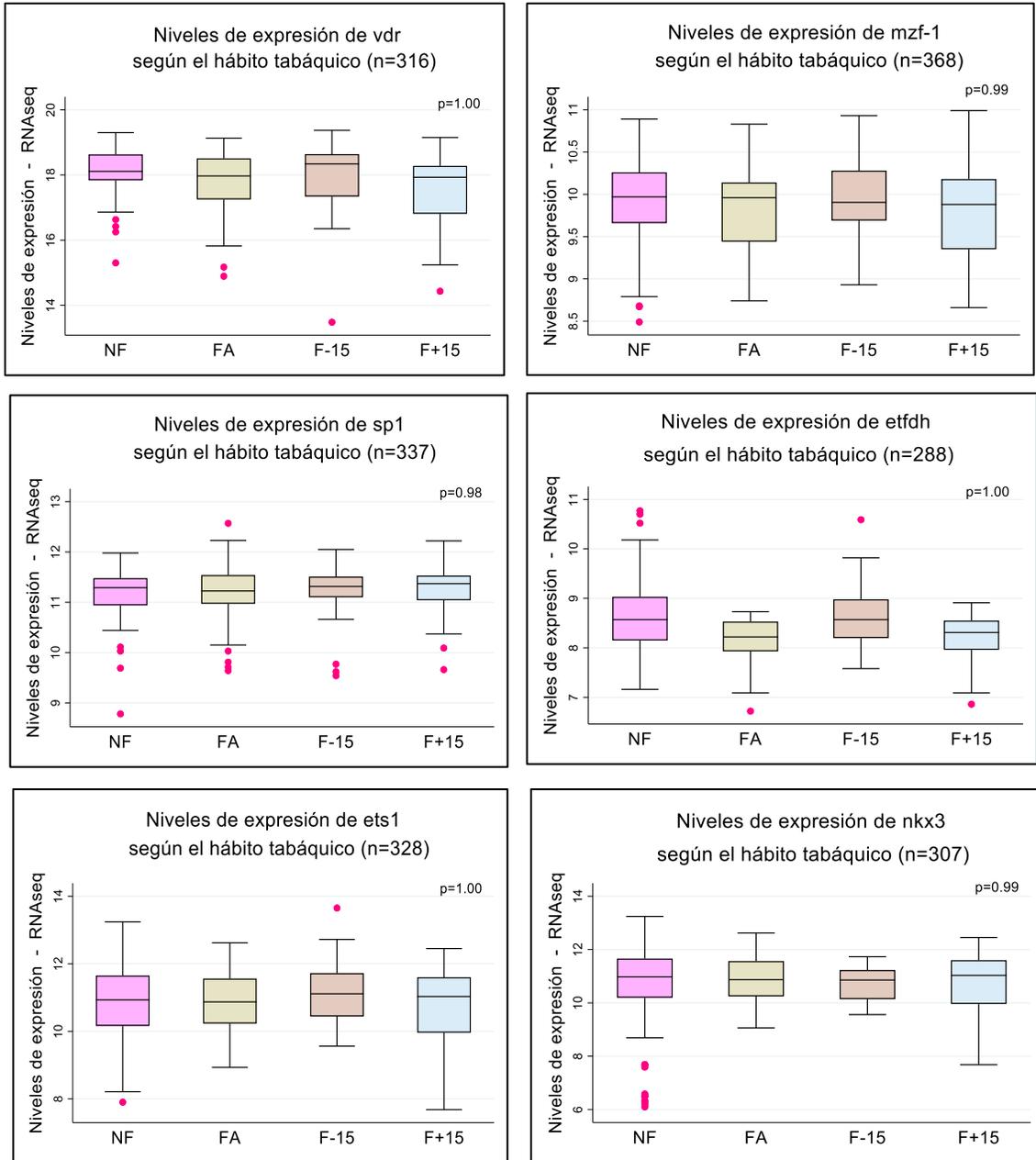


Figura 20. Correlación de individuos con COCE e historial tabáquico. En cada gráfico de caja se representan los niveles de transcritos de cada gen que codifica para cada FT candidato. Los pacientes con COCE fueron categorizados en cuatro grupos según su hábito tabáquico: no fumador (NF), fumador actual (FA), ex fumador por menos de 15 años (F-15), ex fumador por más de 15 años (F+15). Las líneas centrales de cada caja representan la mediana de los datos que dividen a los pacientes en un cuartil superior y un cuartil inferior (niveles altos y bajos de expresión, respectivamente). Los puntos rosas en los extremos de los cuartiles representan los datos que se alejan de la mediana. Los gráficos de caja se elaboraron en STATA/BE. El análisis estadístico entre las cohortes fue evaluado con el test de Fisher. El valor de p se indica en la esquina superior derecha.

2.3 Identificación de genes relacionados al hábito tabáquico en pacientes con LUAD

Dado que el cáncer pulmonar constituye un modelo de malignidad fuertemente asociada al hábito tabáquico, en esta tesis se decidió analizar una cohorte de pacientes con adenocarcinoma de pulmón (LUAD) constituida por 252 pacientes (151 con adenocarcinoma en el lóbulo superior, 79 en el lóbulo inferior, 10 en el lóbulo medio y 12 con adenocarcinoma en todo el pulmón) (**Tabla 4**). Se excluyeron 297 pacientes que no tuvieron datos de secuenciación o asignación de categoría de hábito tabáquico.

Pacientes con LUAD				
Lóbulo superior	Lóbulo inferior	Lóbulo medio	Pulmón completo	Total
151	79	10	12	252

Tabla 4. Categorización de pacientes con LUAD. La información del número de pacientes y sitio anatómico del pulmón afectado fue tomada del TCGA (atlas genómico del cáncer). Disponible en <https://portal.gdc.cancer.gov>.

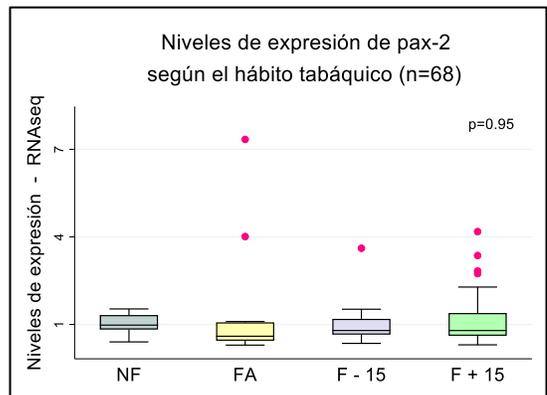
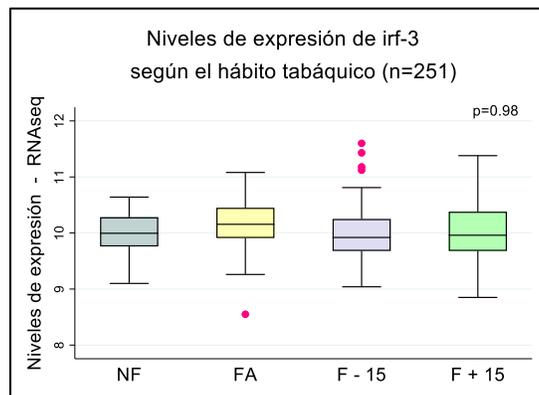
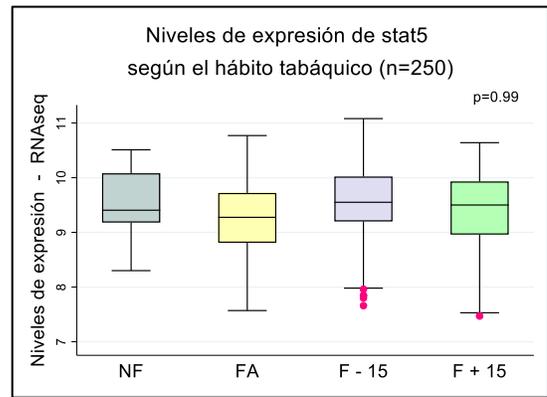
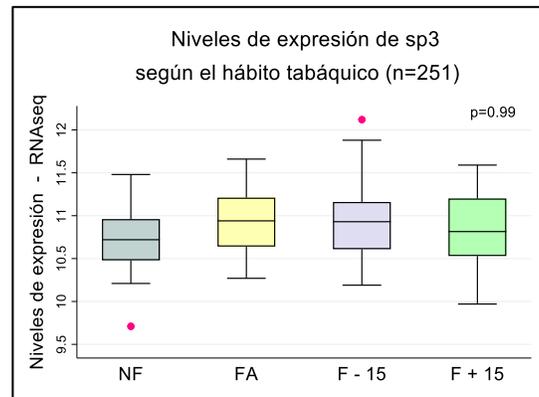
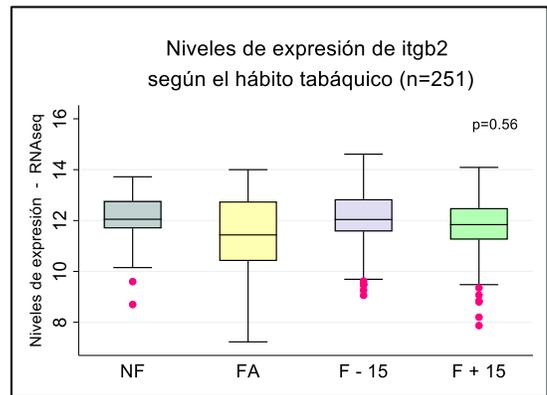
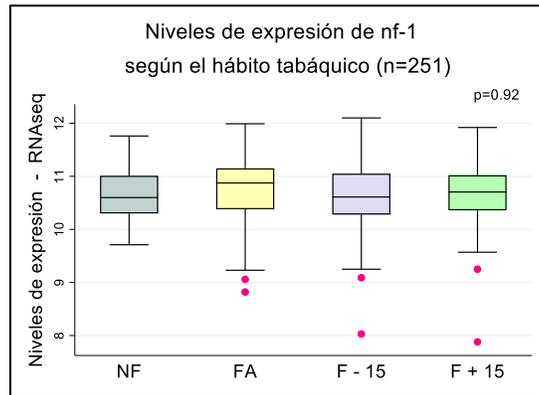
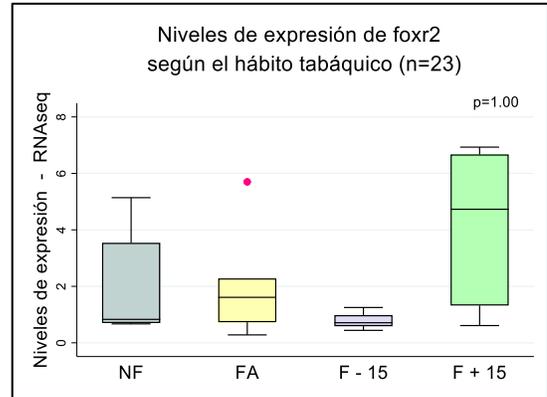
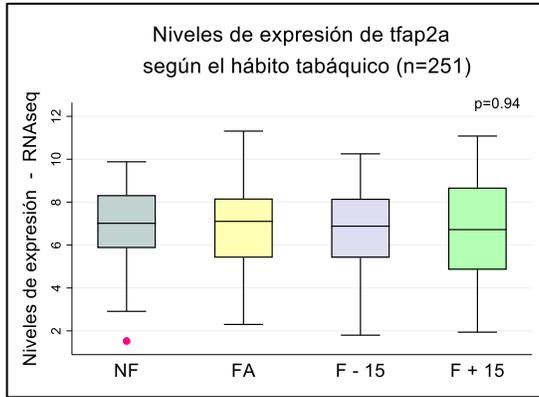
Los niveles de transcritos (RNAseq) de los genes que codifican para cada FT y el historial tabáquico de cada paciente se obtuvieron del programa Xena Browser (**Tabla 5**). Los pacientes y sus niveles de transcritos fueron agrupados por categorías: no fumadores NF (categoría 1), fumadores actuales FA (categoría 2), ex fumadores por menos de 15 años F-15 (categoría 3), ex fumadores por más de 15 años F+15 (categoría 4). Las variables continuas fueron transformadas en variables categóricas al agrupar a los pacientes dentro de niveles altos o bajos de expresión de los genes propuestos.

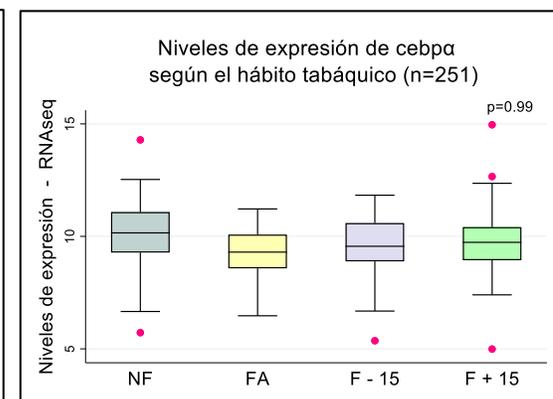
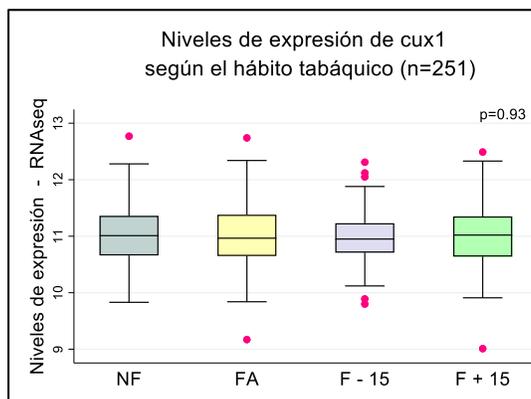
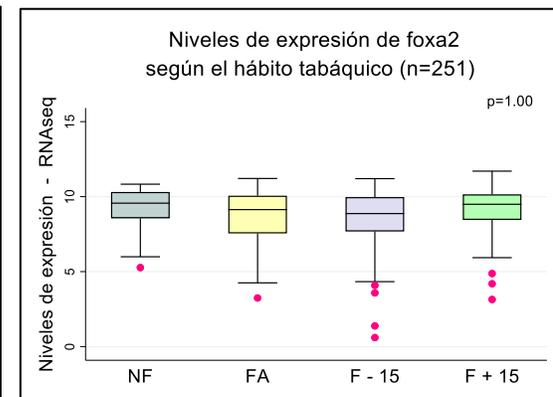
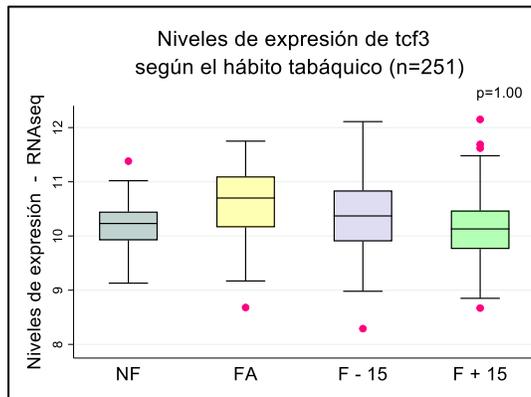
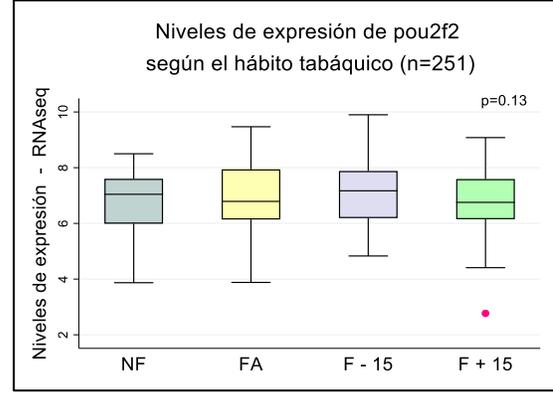
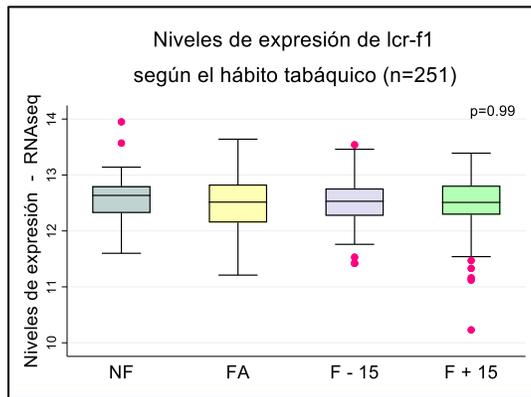
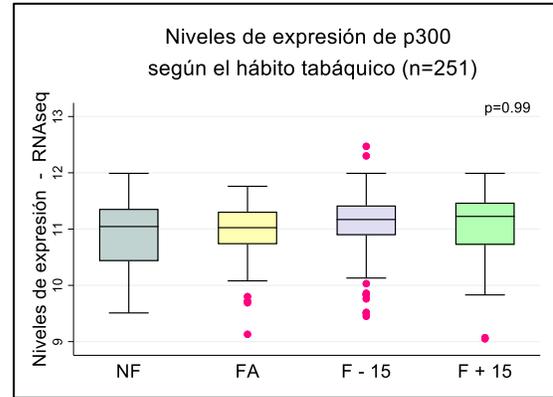
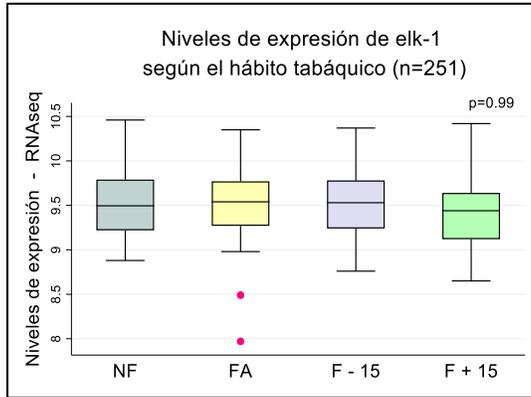
Gen	Proteína	Número total de muestras	Niv. mínimo de expresión	Niv. máximo de expresión	p valor
<i>tfap2a</i>	AP-2 α	251	1.53	11.31	0.94
<i>foxr2</i>	R2	23	0.28	6.93	1.00
<i>nf-1</i>	NF-1	251	7.88	12.10	0.92

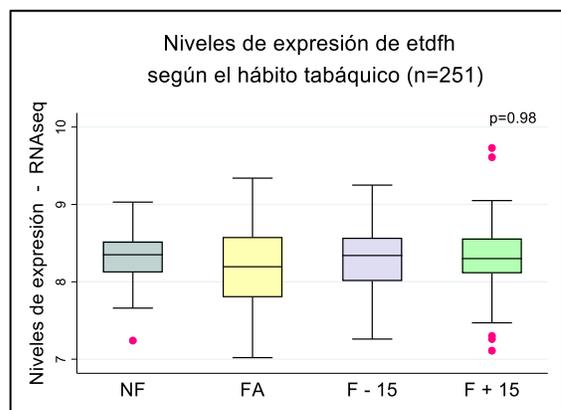
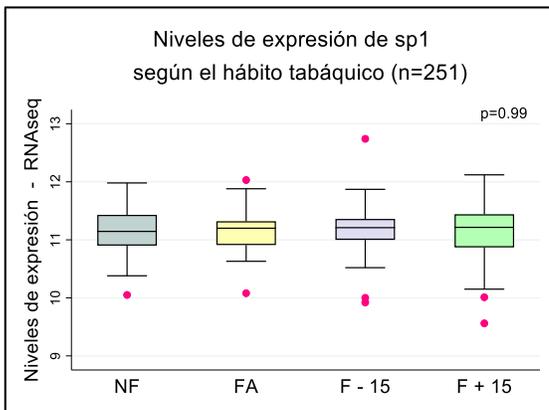
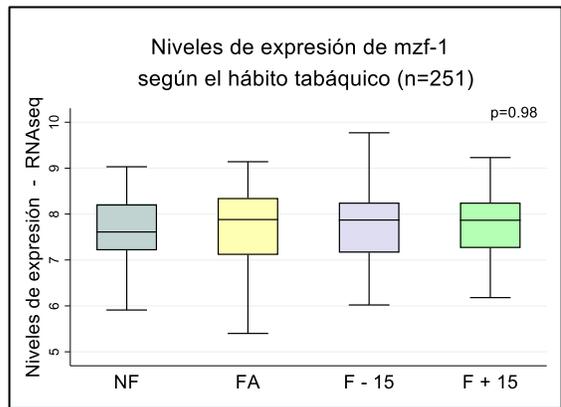
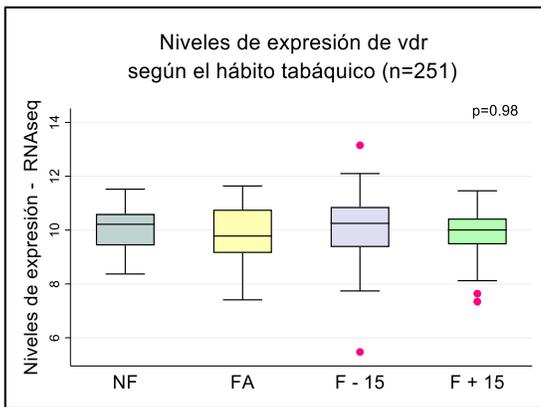
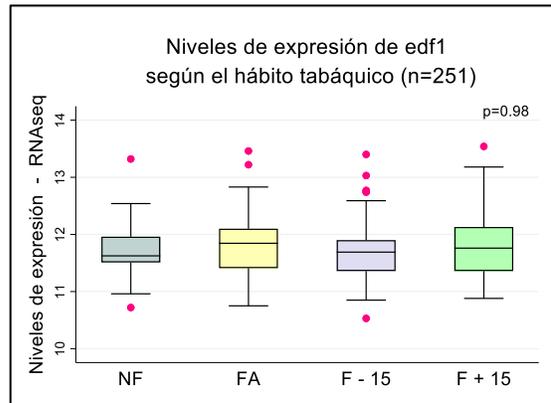
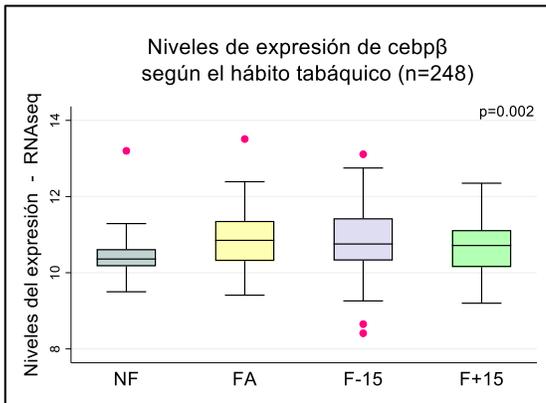
<i>itgb2</i>	LFA-1	251	7.23	14.61	0.56
<i>sp3</i>	SP3	251	9.71	12.12	0.99
<i>stat5</i>	STAT5	250	7.47	11.08	0.99
<i>irf-3</i>	IRF-3	251	8.55	11.60	0.98
<i>pax-2</i>	PAX-2	68	0.29	7.34	0.95
<i>elk-1</i>	ELK-1	251	7.97	10.46	0.99
<i>p300</i>	EP300	251	9.05	12.47	0.99
<i>lcr-f1</i>	NFE2L1	251	10.23	13.95	0.99
<i>pou2f2</i>	POU2F2	251	2.77	9.90	0.13
<i>tcf3</i>	E47	251	8.29	12.15	1.00
<i>foxa2</i>	HNF-3 β	251	0.60	11.70	1.00
<i>cux1</i>	CUTL1	251	9.01	12.77	0.93
<i>cbpa</i>	c/EBP α	251	4.99	14.96	0.99
<i>c/ebpβ</i>	c/EBP β	248	8.41	13.11	0.002
<i>edf1</i>	MBF1	251	10.72	13.54	0.98
<i>vdr</i>	VDR	251	7.34	13.15	0.98
<i>mzf-1</i>	MZF-1	251	5.40	9.77	0.98
<i>sp1</i>	SP1	251	9.56	12.74	0.99
<i>etfdh</i>	ETF	251	7.02	9.73	0.98
<i>ets1</i>	CETS1	251	8.86	14.01	0.98
<i>nkx3</i>	NKX3	251	1.72	9.20	0.99

Tabla 5. Niveles de expresión de los 23 genes que codifican para los 23 FT en pacientes con LUAD. Para cada gen candidato se muestra el número de participantes evaluados y los datos numéricos de expresión. Información extraída del programa Xena browser. El análisis estadístico se realizó en STATA/BE.

Se analizó estadísticamente el incremento en los niveles de transcritos de cada gen que codifica para cada FT en los pacientes fumadores vs las otras 3 categorías. La cohorte de FA contempla pacientes que han fumado de 10 a 147 cajetillas de cigarrillos al año. La cohorte de F-15 está formada por ex fumadores que han consumido de 15 a 120 cajetillas de cigarrillos al año durante 4 a 15 años. La cohorte de F+15 está formada por ex fumadores que han consumido de 15 a 98 cajetillas de cigarrillos al año durante 65 años.







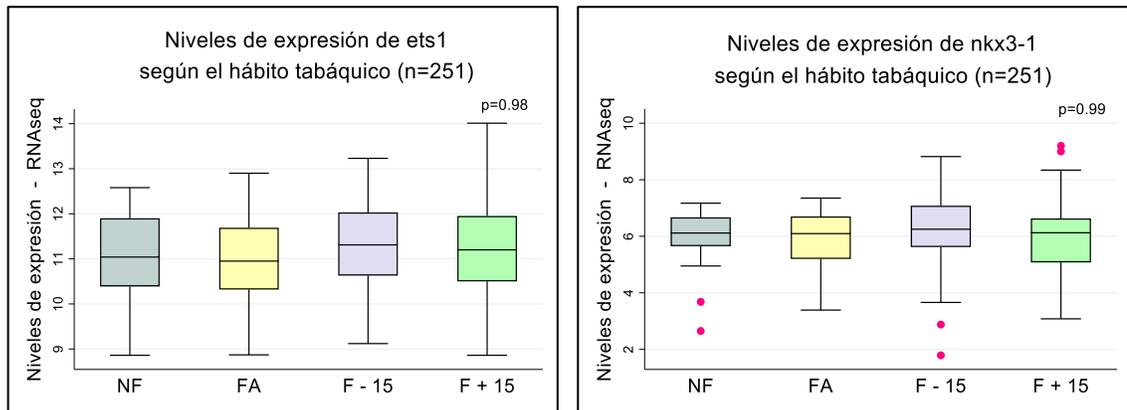


Figura 21. Correlación de individuos con LUAD e historial tabáquico. En cada gráfico de caja se representan los niveles de transcritos de cada gen que codifica para cada FT candidato. Los pacientes con LUAD fueron categorizados en cuatro grupos según su hábito tabáquico: no fumador (NF), fumador actual (FA), ex fumador por menos de 15 años (F-15), ex fumador por más de 15 años (F+15). Las líneas centrales de cada caja representan la mediana de los datos que dividen a los pacientes en un cuartil superior y un cuartil inferior (niveles altos y bajos de expresión, respectivamente). Los puntos rosas en los extremos de los cuartiles representan los datos que se alejan de la mediana. Los gráficos de caja se elaboraron en STATA/BE. El análisis estadístico entre las cohortes fue evaluado con el test de Fisher. El valor de p se indica en la esquina superior derecha.

Los análisis indicaron que existe una asociación positiva entre los transcritos del gen *c/EBPβ* (1/23) y el hábito tabáquico ($p=0.002$). Se observó, que *c/EBPβ* está sobreexpresado en individuos fumadores vs individuos no fumadores que desarrollaron LUAD (**Figura 21**).

OBJETIVO ESPECIFICO 3

3. Determinar el reclutamiento de (FT) candidatos en el promotor Z_p en células epiteliales orales expuestas a componentes del condensado de humo de cigarrillo.

3.1 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Según el análisis *in silico* del objetivo anterior, observamos que ningún gen asociado a los 23 FT se sobreexpresan en individuos fumadores vs no fumadores con COCE,

sin embargo, se observó que la proteína c/EBP β se correlaciona significativamente con el hábito tabáquico en individuos fumadores con LUAD.

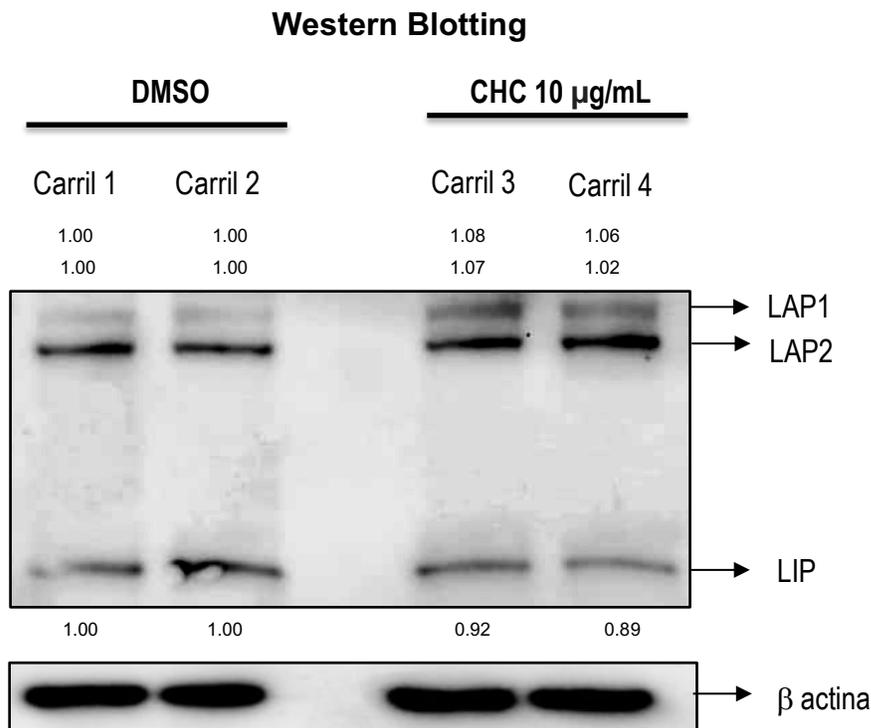


Figura 22. Expresión de la proteína c/EBP β en las células SCC-143 expuestas a DMSO y CHC. Expresión de las tres isoformas de proteína c/EBP β (38, 35, 21 kDa) en células SCC-143 detectadas con anticuerpo monoclonal anti c/EBP β (1:1000) y anticuerpo secundario anti conejo (1:4000). LAP 1 (proteína activadora del hígado, 38 kDa). LAP 2 (proteína activadora del hígado, 35 kDa). LIP (proteína inhibitoria enriquecida en hígado, 21kDa). Expresión de β actina (42kDa) detectada con anticuerpo monoclonal anti β actina (1:1000) y anticuerpo secundario anti ratón (1:1000). La proteína β actina fue usada como control de carga y gen normalizador. La isoforma LAP1 y LAP2 aumentan un 8% y 7% respectivamente post exposición a CHC. El tratamiento con CHC no induce incremento en la expresión de la isoforma LIP. El porcentaje de expresión de cada isoforma se determinó a través del análisis densitométrico de cada banda. Se cargaron 10 μ g de muestra por duplicado.

Para determinar si c/EBP β es detectado en las células orales, se realizó un ensayo de western blot. En la línea celular oral SCC-143, el anticuerpo anti c/EBP β permitió la detección de las tres isoformas (LAP1, LAP2, LIP) de esta proteína. Las tres isoformas se expresan de manera constitutiva cuando las células son tratadas con DMSO y los niveles de expresión de LAP1 y LAP2 aumentaron un 8% y 7% después del tratamiento con CHC (10 μ g/mL). En la isoforma LIP no se observan cambios después del tratamiento con CHC (**Figura 22**).

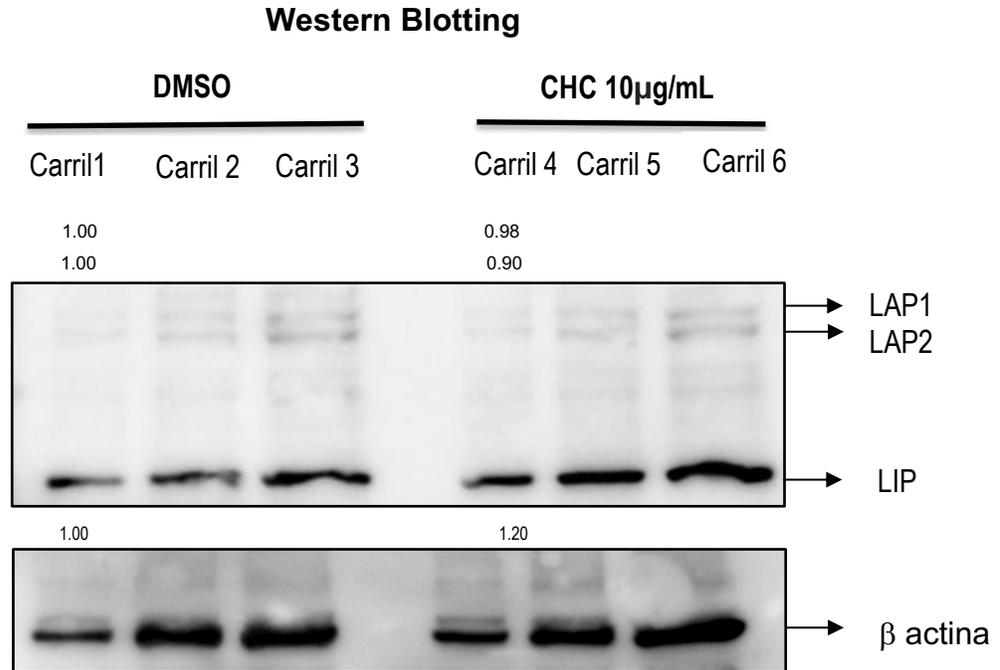


Figura 23. Expresión de la proteína c/EBPβ en las células CAL-27 expuestas a DMSO y CHC. Expresión de las tres isoformas de proteína c/EBPβ (38, 35, 21 kDa) en células SCC-143 detectadas con anticuerpo monoclonal anti c/EBPβ (1:1000) y anticuerpo secundario anti conejo (1:4000). LAP 1 (proteína activadora del hígado, 38 kDa). LAP 2 (proteína activadora del hígado, 35 kDa). LIP (proteína inhibitoria enriquecida en hígado, 21kDa). Expresión de β actina (42kDa) detectada con anticuerpo monoclonal anti β actina (1:1000) y anticuerpo secundario anti ratón (1:1000). La proteína β actina fue usada como control de carga y gen normalizador. La isoforma LIP aumenta un 20% post exposición a CHC. Se cargaron 10 µg de muestra (carril 1 y carril 4). El porcentaje de expresión de cada isoforma se determinó a través del análisis densitométrico las bandas 1 y 4. Se excluyeron los carriles 2-5, 3 y 6 que contienen 20 µg y 30 µg de proteína respectivamente.

En la línea celular CAL-27, el anticuerpo anti c/EBPβ también permitió la detección de las tres isoformas (LAP1, LAP2, LIP) de esta proteína. Aunque las isoformas LAP1 y LAP2 fueron débilmente detectadas por el anticuerpo, se observó que se expresan de manera constitutiva cuando las células son tratadas con DMSO, aunque solo los niveles de expresión de la isoforma LIP aumentó un 20% después del tratamiento con CHC (10 µg/mL) (**Figura 23**).

c/EBP β también se recluta en este dominio y existe un mayor enriquecimiento de esta proteína después del tratamiento con CHC (**Figura 25**).

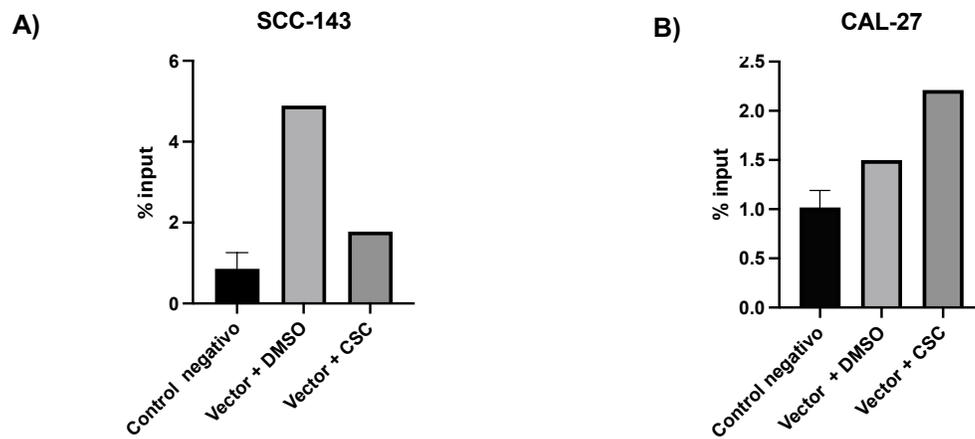


Figura 25. Reclutamiento de la proteína c/EBP β en el dominio ZV' del promotor Zp en células orales. Ensayo ChIP para detectar el reclutamiento de c/EBP β usando el anticuerpo específico para esta proteína. El ADN purificado para cada línea celular fue analizado mediante qPCR usando partidores que amplifican un segmento de 117 pb. El enriquecimiento de los fragmentos de ADN fue calculado como el porcentaje del input (ADN purificado de las muestras y ADN input). La región ZV' del promotor Zp muestra un enriquecimiento tanto en células tratadas con DMSO como con CHC. En las células **A)** SCC-143 el reclutamiento de c/EBP β es mayor cuando las células son expuestas a DMSO vs a CHC. En las células **B)** CAL-27 el reclutamiento de c/EBP β es mayor cuando estas células son expuestas a CHC. Los resultados son representativos de una réplica biológica independiente.

DISCUSIÓN

Los mecanismos fundamentales involucrados en la capacidad oncogénica del Virus-Epstein-Barr no son totalmente conocidos. En esta tesis se ha planteado que VEB puede cooperar con el humo de cigarrillo (HC) para promover un incremento en la actividad del promotor viral Zp, el cual dirige la expresión de la proteína Zebra, reguladora maestra del switch latente-lítico. El HC es un carcinógeno clase I que promueve el desarrollo de COCE y cáncer pulmonar, entre otros cánceres (90). El efecto de fumar tabaco en el ciclo replicativo de los herpesvirus no ha sido estudiado previamente. Sin embargo, se ha establecido que el título de anticuerpos IgA específico para el antígeno de la cápside mayor (VCA) de VEB en suero de pacientes fumadores se incrementa significativamente (102). Además, ciertos estudios han

evaluado el efecto de fumar cigarrillo a largo plazo sobre el riesgo de desarrollar cánceres epiteliales asociados a la infección por VEB como carcinoma nasofaríngeo o cáncer gástrico (103, 116). Dichos reportes han sugerido que el hábito tabáquico (HT) podría promover un incremento de la carga viral en sangre lo que se traduce en títulos elevados de anticuerpos para distintos componentes de VEB, en individuos que posteriormente desarrollan estos cánceres (103). Estos datos sugieren que los componentes del HC son capaces de regular el ciclo replicativo viral, aunque los mecanismos mediante los cuales esto ocurre, son desconocidos. VEB es un herpesvirus oncogénico y su genoma se ha detectado en COCE y LUAD (76, 115). Dado que VEB y el HC son carcinógenos y la cavidad oral es la fuente primaria de infección de VEB y de exposición a HC, es plausible una eventual cooperación entre estos agentes. En esta tesis se utilizó el CHC obtenido a partir de cigarrillos de referencia 3R4F como sustituto del HC. El HC contiene una mezcla compleja de compuestos químicos que al entrar en contacto con el organismo inducen la expresión de *cyp1b1*, una de las enzimas metabolizadoras del citocromo P450 (117, 118). Para estandarizar algunos métodos, primero se evaluó la funcionalidad del CHC mediante qPCR. Se observó que la exposición a 4 y 8 h de CHC en las células SCC-143 y CAL-27 promueve un incremento significativo en los niveles de transcritos de *cyp1b1*. Muñoz et al, observaron que el tratamiento con CHC en células cervicales durante diferentes períodos de tiempo produce un efecto similar (119). Estos resultados confirman que el CHC utilizado en esta tesis es biológicamente activo en el contexto de células orales. Los ensayos de proliferación celular demostraron que las células CAL-27 tienen una tasa proliferativa mas alta que las células SCC-143. Aunque las células orales CAL-27 no son metastásicas, un incremento en la proliferación celular es una característica importante de las neoplasias, lo cual forma parte de la promoción tumoral (120). Luego, se evaluó la viabilidad de células orales en presencia de CHC ya que el mismo contiene una mezcla compleja de carcinógenos y la exposición a altas concentraciones puede ser tóxico (117). Se demostró que las células SCC-143 y CAL-27 tratadas con CHC, no mostraron pérdida de viabilidad en un rango de 1 µg/mL a 50 µg/mL. Estos resultados concuerdan con los estudios de Allam, et al. al demostrar que las células orales SCC-25 y CAL-27 toleran hasta 100 µg/mL de exposición a CHC

(121). Estudios de Muñoz, et al. demostraron que el tratamiento con 10 µg/mL de CHC en células cervicales es la concentración máxima que no induce un efecto citotóxico, lo cual confirma que la toxicidad del CHC depende de la línea celular evaluada (119). El rango de concentraciones de CHC usado en esta tesis (50 µg/mL) es equivalente a 3.2 µg/mL de nicotina). Esta equivalencia se usa ya que la nicotina es uno de los componentes mayoritarios presentes en el HC y este compuesto es detectado en la saliva de los sujetos fumadores (122, 123). La saliva en la cavidad oral cumple un rol fundamental para diluir los CHC, situación que no puede ser evaluada *in vitro*. Por lo tanto, la concentración del CHC usada en este tesis es aproximada a la exposición real a HC de un fumador. Por otro lado, las células orales usadas en esta tesis son negativas para la infección por VEB, por lo que se usó un vector comercial (pmir-GLO) clonado con el promotor viral Zp de VEB (683 nucleótidos). Este vector incluye un sistema de genes reporteros (luciferasa de luciérnaga, luc y luciferasa de renilla, hrluc-neo). La expresión de luciferasa es dependiente de la activación del promotor Zp y la de renilla del promotor de SV40. El efecto del CHC sobre la activación del promotor Zp de VEB no ha sido evaluado previamente. Los resultados de este trabajo indican por primera vez que la exposición a 10 µg/mL y 50 µg/mL de CHC en las células SCC-143 y CAL-27 respectivamente, activan el promotor Zp *wild type* de VEB. Las consecuencias fisiológicas de tal activación necesitan ser evaluadas en estudios futuros. Sin embargo, es posible sugerir que la activación de Zp por el humo del cigarrillo en células orales podría traducirse en la activación del ciclo lítico viral. Hay evidencia que indica que la activación del *switch* latente-lítico es relevante durante el desarrollo de cánceres asociados a la infección por VEB (84, 85). En términos mas generales, la interacción entre humo de cigarrillo y virus persistentes es un tema que ha sido previamente abordado en otros contextos virales y celulares. En efecto, Peña, et al. determinaron que el CHC es capaz de activar el promotor temprano (p97) de virus papiloma humano tipo 16 (VPH-16), conduciendo a la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 en células epiteliales (101). En este sentido, Wei, et al. demostraron que la exposición a 0.5 µg/mL y 10 µg/mL de humo de cigarrillo de corriente principal (MSTS) aumentó los niveles de transcritos de E6, E7 y E-1/E-4 de VPH-16 de forma dosis dependiente en dos líneas células cervicales. Tomados en

conjunto, estos datos sugieren que el MST5 se comporta como activador transcripcional de estos promotores contribuyendo a la progresión de cáncer cérvico-uterino (124). Otros autores como Alam, et al. demostraron que la exposición a benzopireno en células neoplásicas, promueve la replicación de VPH-16 y VPH-18 expresado como un aumento en los títulos de estos genotipos virales, sugiriendo que la exposición a BaP modula la replicación de VPH. Este hallazgo indica que BaP potencialmente aumentaría la persistencia viral promoviendo la progresión a cáncer cervical (125). El promotor Zp tiene una longitud de 683 nucleótidos. Se ha identificado previamente que la región -117 a +15 está formada por 4 dominios *cis-acting* que son importantes para inducir el ciclo lítico de VEB (126, 127). Se han identificado una variedad de FT que activan transcripcionalmente este promotor. En particular, la proteína celular c/EBP, es un miembro de FT de la familia de cremallera de leucina (bZIP) que reconoce y se une a la secuencia consenso (A/G) TTGCTG (C/T) AA (C/T) ubicada en los dominios ZIIIB y ZV' del promotor Zp (128-130). Para determinar si los dominios antes mencionados tienen relevancia para la activación de Zp, se crearon tres mutantes que fueron evaluadas mediante ensayo de luciferasa. Como en el ensayo principal de activación del promotor Zp *wild type* en SCC-143 y CAL-27, en este ensayo con mutantes también se observa incremento significativo de Zp *wild type*. Sin embargo, este incremento es menor al observado inicialmente, lo cual podría ser ocasionado por el uso de un lote distinto de CHC. La concentración de los compuestos del CHC adquiridos de manera comercial pueden variar dependiendo del lote de fabricación. Estos cambios podrían introducir variaciones en los ensayos que afectan la reproducibilidad de los resultados. Estos eventos fueron previamente anticipados y el nuevo lote fue usado para realizar las tres réplicas biológicas tanto para las células SCC-143 y CAL-27. Con respecto a las mutantes de delección (MUT 1 y MUT 2) se observó una disminución en la actividad de luciferasa al transfectar las células SCC-143 y CAL-27 y exponerlas a 50 µg/mL y 10 µg/mL respectivamente de CHC. Los resultados en la MUT 1 reflejan que la delección desde el dominio ZIIIB hasta el dominio ZV' (posición -121 a +15) reconocido por la isoforma c/EBP α y c/EBP β , reduce la actividad de Zp. Un estudio de Wu, et al. reveló por medio de ensayos EMSA que c/EBP α tiene alta afinidad de unión a la secuencia TTGCTA en el dominio ZIIIB.

Cuando se realizaron ensayos de mutagénesis en ZIIIB, disminuyó la activación de Zp mediada por c/EBP α . El dominio ZIIIB tiene un rol clave en inducir el ciclo lítico de VEB. Además, mediante ensayos con genes reporteros se demostró que c/EBP α actúa como activador transcripcional de Zp (129). El dominio ZIA hasta el ZV' (posición -197 hasta +15) del promotor Zp contiene la mayoría de los sitios importantes reconocidos para su activación transcripcional (131). Para confirmar este hecho se hizo una delección en el promotor Zp en estas posiciones y se observó que en la MUT 2 también disminuye la actividad luciferasa en ambas líneas celulares. Estos resultados concuerdan con los ensayos de Macdonald, et al. en los cuales la introducción de mutaciones en diversos dominios del promotor Zp, alteró su activación (131). En la MUT 3 se sustituyó una C por una G en la posición +8 dentro del dominio ZV' del promotor Zp, ya que esta región es reconocida tanto por c/EBP α y c/EBP β . La mutación permitió discriminar qué isoforma es relevante dentro del contexto de Zp. En las células SCC-143 y CAL-27, también se observó disminución en la actividad de luciferasa. Este efecto puede deberse a que c/EBP α es capaz de interactuar con otras proteínas celulares o virales para aumentar la transcripción a partir de Zp. Según estudios realizados por Wu, et al. c/EBP α y Zta pertenecen a la misma familia de FT de cremallera de leucina (bZIP) y forman interacciones oligoméricas entre ellas tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*, lo que podría resultar en una acción sinérgica que potenciaría la activación de Zp (132). En los organismos eucariotas, la expresión génica se regula a través de la unión de una variedad de factores de transcripción a una secuencia regulatoria. Estas proteínas interactúan con la maquinaria de transcripción basal para definir la tasa relativa de transcripción para un gen específico (133). Por ello, se llevó a cabo la predicción bioinformática para conocer proteínas celulares candidatas (FT) y sus potenciales sitios regulatorios en la secuencia de Zp a través del programa PROMO. Las predicciones se generan en matrices de peso específico que resumen las coincidencias para cada nucleótido según los sitios de unión que ya han sido experimentalmente identificados (depositados en bases de datos como TRASFAC) (134). Como resultado, se identificaron 23 FT putativos que son reclutados en distintos sitios del promotor viral Zp. Uno de los FT candidato fue la proteína c/EBP. La isoforma c/EBP α reconoce la secuencia TTGCAC en el dominio

ZIIIB del promotor Zp y las isoformas c/EBP α y c/EBP β se superponen con la secuencia TTGCAC/C en el dominio ZV'. Además, para identificar genes relacionados con el tabaquismo, se examinó el incremento en los niveles de expresión de ARNm de cada gen candidato en pacientes con COCE y LUAD. Se incluyeron dos categorías de pacientes que habían fumado por más de 15 y por menos de 15 años para evaluar si el número de cigarrillos fumados y el tiempo influye sobre la expresión de cada gen. Como resultado, no hubo sobreexpresión a nivel de ARNm de estos genes (0/23) en individuos fumadores que desarrollaron COCE en comparación con individuos no fumadores. Sin embargo, en la cohorte de pacientes con LUAD se observó que la proteína c/EBP β (1/23) está incrementada en sujetos con hábito tabáquico (p=0.002). En la hipótesis planteamos que los componentes del condensado del humo del cigarrillo activan el promotor Zp de VEB a través del reclutamiento de factores de transcripción (FT) expresados en células epiteliales orales". Mediante el análisis *in silico* encontramos 23 proteínas candidatas, aunque solo una de ellas, c/EBP β es incrementada a nivel transcripcional en individuos fumadores. Nos enfocamos en LUAD ya que es una neoplasia altamente relacionada al hábito tabáquico y existe evidencia experimental de que el CHC induce la expresión de c/EBP β en individuos fumadores con esta neoplasia (135). A través de herramientas bioinformáticas y ensayos experimentales, se han identificado alteraciones transcripcionales en varios genes que están asociados con el historial tabáquico en LUAD (136, 137). Liu, et al. llevó a cabo estudios de expresión de genes en pacientes fumadores y no fumadores sugiriendo que la sobreexpresión de *ephA4*, *fgfr2* y *egfr* podrían estar implicados tanto en el desarrollo como en la progresión de LUAD asociado al hábito tabáquico (138). Landi, et al. demostró que el ARNm de los genes *nek2* y *ttk* está incrementado debido al hábito tabáquico y este efecto aumenta el riesgo de mortalidad en LUAD (139). Spira et al. demostraron que el hábito tabáquico altera el perfil transcripcional de varios genes involucrados en la regulación del estrés oxidativo (*gpx2*), el metabolismo de xenobióticos (*cyp1b1*), adhesión celular (claudina 10) así como de algunos oncogenes (*pirin*, *CA12*) etc en el epitelio del pulmón. Además, disminuyó la expresión de genes relacionados con la regulación de la inflamación (140). Estudios recientes han demostrado que los tumores pulmonares histológicamente similares tienen diferentes

mecanismos moleculares de carcinogénesis debido a diferentes hábitos de tabaquismo (141). Los resultados de esta tesis indican que los transcritos de *c/EBPβ* aumentaron en individuos fumadores independientemente del tiempo por el que se haya fumado en comparación con no fumadores. Wang, et al. determinaron una asociación positiva entre el aumento en los transcritos de *nme1* en fumadores actuales y en ex fumadores por < 15 años sugiriendo que el HC altera la expresión de estos genes a largo plazo incluso después de la cesación del hábito tabáquico (137). Para determinar la presencia de *c/EBPβ* en células orales se realizaron ensayos de Western Blotting. La expresión constitutiva de esta proteína y el aumento de la misma post exposición a 10 µg/mL de CHC fue observada en ambas líneas celulares. En células SCC-143 aumentó un 8% y 7% para LAP1 y LAP2. En CAL- 27 solo la isoforma LIP aumento un 20%. Huang, et al encontraron que las 3 isoformas de *c/EBPβ* se expresan constitutivamente en células de carcinoma nasofaríngeo. Además, demostraron que otros xenobióticos como el butirato de sodio y los ésteres de forbol inducen la expresión y el aumento de la proteína *c/EBPβ* en células epiteliales gástricas después de 6 y 12 horas de incubación con estos agentes (130). El aumento de *c/EBPβ* observado en lo western blots después del tratamiento con CHC en las dos líneas celulares difiere de la predicción bioinformática que realizamos en la cohorte de pacientes con COCE en los cuales el hábito tabáquico no altera los niveles de transcritos de este gen. Esos resultados pueden ser debido a que los sistemas bioinformáticos y las potenciales asociaciones establecidas son aproximaciones y no necesariamente reflejan los complejos mecanismos regulatorios de expresión génica que ocurren a nivel celular. Ghantous, et al. postularon que el HC produce alteraciones epigenéticas en COCE que derivan en cambios en los patrones de metilación de los genes (142). En particular, Shen, et al. propusieron que la nicotina del HC activa los receptores nicotínicos de la acetilcolina para la síntesis de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), un gen clave en la regulación de muchos genes (143). La proteína *c/EBPβ* es dependiente de la activación de cAMP (144). Para confirmar la predicción bioinformática de la unión de *c/EBPβ* al dominio ZV' del promotor Zp se realizó a cabo un ensayo de ChIP. En la línea CAL-27 se observó que *c/EBPβ* fue reclutado en la región ZV' del promotor Zp y que este efecto aumenta frente a la exposición a HC.

Hasta la fecha actual no se han publicado estudios que determinen la unión de c/EBP β en este dominio. Sin embargo, estudios previos de Yu, et al. demostraron que el FT ZEB 1 se une al dominio ZV (posición -17 a -12) y ZV' (posición +5 y +10) en el promotor Zp a través de sus dos dominios de dedos de zinc en células inmortalizadas (145). En las células SCC-143 se observó que c/EBP β es reclutada en el promotor, pero su expresión no aumenta frente a la exposición a CSC. Este efecto puede deberse a que la expresión de c/EBP β después de la exposición a xenobióticos en el contexto de otros carcinomas positivos para VEB es transiente y desaparece después de 24 horas de incubación (130). Dado que estos experimentos corresponden a una réplica biológica, se necesitan más ensayos para confirmar estos resultados.

En conclusión en esta tesis se encontró por primera vez que el promotor Zp de VEB es activado por el CHC, lo cual implica un hallazgo muy importante para entender como la activación del ciclo lítico viral influye en la carcinogénesis oral mediada por este virus. Los ensayos con mutantes de Zp determinaron que los dominios ZIIIB y ZV' reconocidos por la proteína c/EBP son relevantes para la activación de Zp. Existe evidencia previa de que esta proteína reconoce varios dominios del promotor Zp y contribuye a la activación del ciclo lítico mediante ensayos reporteros. Sin embargo, se necesita evaluar la contribución puntual a nivel transcripcional de c/EBP en la activación del ciclo lítico en células orales. Este modelo de estudio podría ser aplicable a otros tumores epiteliales asociados a la infección por VEB y a la exposición a HC.

REFERENCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021) Global Cancer Statistics 2020 GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 71:209-249.
2. Rivera C (2015) Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 8:11884-11894.
3. Speight PM, Farthing PM (2018) The pathology of oral cancer. *Br Dent J.* 225:841-847.
4. Montero PH, Patel SG (2015) Cancer of the oral cavity. *Sur Oncol Clin N Am.* 24:491-508.
5. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y (2010) Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol* 46:414-417.
6. Taghavi N, Yazdi I (2015) Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts. *Arch Iran Med.* 18:314-319.
7. Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C (2016) Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *J Cancer Res Ther.* 12:458-463.
8. Mello FW, Melo G, Pasetto JJ, Silva CAB, Warnakulasuriya S, Rivero ERC (2019) The synergistic effect of tobacco and alcohol consumption on oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral investig.* 23:2849-2859.
9. Jiang X, Wu J, Wang J, Huang R (2019) Tobacco and oral squamous cell carcinoma: A review of carcinogenic pathways. *Tob Induc Dis.* 17:29.
10. Mariano LC, Warnakulasuriya S, Straif K, Monteiro L (2022) Secondhand smoke exposure and oral cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Tob Control.* 31:597-607.
11. Subapriya R, Thangavelu A, Mathavan B, Ramachandran CR, Nagini S (2007) Assessment of risk factors for oral squamous cell carcinoma in Chidambaram, Southern India: a case-control study. *Eur J Cancer Prev.* 16:251-6.
12. Lee YC, Marron M, Benhamou S, Bouchardy C, Ahrens W, Pohlabeln H, Lagiou P, Trichopoulos D, Agudo A, Castellsague X, Bencko V, Holcatova I, Kjaerheim K, Merletti F, Richiardi L, Macfarlane GJ, Macfarlane TV, Talamini R, Barzan L, Canova C, Hashibe M (2009) Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case-control study. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 18:3353-3361.
13. Warnakulasuriya S, Chen THH (2022) Areca Nut and Oral Cancer: Evidence from Studies Conducted in Humans. *J Dent Res.* 101:1139-1146.
14. Zhuo X, Zhao H, Chang A, Ye H, Zhou Y, Song Y, Tan Y (2012) Cytochrome P450 1A1 Ile462Val polymorphism and oral carcinoma risk: an updated meta-analysis

including 1,515 cases and 2,233 controls. *Tumour Biol: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 33:2079-2089.

15. Kruse AL, Bredell M, Gratz KW (2010) Oral squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients. *Head Neck Oncol*. 2:24.
16. Gholizadeh P, Eslami H, Yousefi M, Asgharzadeh M, Aghazadeh M, Kafil HS (2016) Role of oral microbiome on oral cancers, a review. *Biomed Pharmacother = Biomedecine & pharmacotherapie*. 84:552-558.
17. Gupta K, Metgud R (2013) Evidences suggesting involvement of viruses in oral squamous cell carcinoma. *Patholog Res Int*. 642496.
18. Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T (2022) Association of Epstein-Barr virus with oral cancers. *Hum Pathol*. 608-614.
19. Germe R, Effantin G, Grossi L, Ruigrok RWH, Morand P, Schoehn G (2012) Three-dimensional structure of the Epstein-Barr virus capsid. *J Gen Virol*. 93:1769-1773.
20. Jean-Pierre V, Lupo J, Buisson M, Morand P, Germe R (2021) Main Targets of Interest for the Development of a Prophylactic or Therapeutic Epstein-Barr Virus Vaccine. *Front Microbiol*. 12:701611.
21. Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull J, Hudson JS, Satchwell SC, Seguin C (1984) DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*. 310:207-211.
22. Osorio JC, Blanco R, Corvalan AH, Munoz JP, Calaf GM, Aguayo F (2022) Epstein-Barr Virus Infection in Lung Cancer: Insights and Perspectives. *Pathogens*. 11:132.
23. Young LS, Yap LF, Murray PG (2016) Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nat Rev Cancer*. 16:789-802.
24. Dunmire SK, Verghese PS, Balfour HH, Jr (2018) Primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Virol: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 102:84-92.
25. Chen J, Longnecker R (2019) Epithelial cell infection by Epstein-Barr virus. *FEMS Microbiol Rev*. 43:674-683.
26. Miyashita EM, Yang B, Babcock GJ, Thorley-Lawson DA (1997) Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol*. 71:4882-4891.
27. Morgan DG, Niederman JC, Miller G, Smith HW, Dowaliby JM (1979) Site of Epstein-Barr virus replication in the oropharynx. *Lancet*. 2:1154-1157.
28. Laichalk LL, Thorley-Lawson DA (2005) Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol*. 79:1296-1307.
29. Balfour HH, Jr., Odumade OA, Schmeling DO, Mullan BD, Ed JA, Knight JA, Vezina H, Thomas W, Hogquist K (2013) Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of primary Epstein-Barr virus infection in university students. *J Infect Dis*. 207:80-88.

30. Sausen DG, Bhutta MS, Gallo ES, Dahari H, Borenstein R (2021) Stress-Induced Epstein-Barr Virus Reactivation. *Biomolecules*. 11:1380.
31. Ryon JJ, Hayward SD, MacMahon EM, Mann RB, Ling Y, Charache P, Phelan JA, Miller G, Ambinder RF (1993) In situ detection of lytic Epstein-Barr virus infection: expression of the NotI early gene and viral interleukin-10 late gene in clinical specimens. *J Infect Dis*. 168:345-351.
32. Smith NA, Coleman CB, Gewurz BE, Rochford R (2021) CD21 (Complement Receptor 2) Is the Receptor for Epstein-Barr Virus Entry into T Cells. *J Virol*. 94:428.
33. Wang HB, Zhang H, Zhang JP, Li Y, Zhao B, Feng GK, Du, Y, Xiong D, Zhong Q, Liu WL, Du H, Li MZ, Huang WL, Tsao SW, Hutt-Fletcher L, Zeng YX, Kieff E, Zeng MS (2015) Neuropilin 1 is an entry factor that promotes EBV infection of nasopharyngeal epithelial cells. *Nat Commun*. 6:6240.
34. Chen J, Sathiyamoorthy K, Zhang X, Schaller S, Perez White BE, Jardetzky TS, Longnecker R (2018) Ephrin receptor A2 is a functional entry receptor for Epstein-Barr virus. *Nat Microbiol*. 3:172-180.
35. Dohner K, Cornelius A, Serrero MC, Sodeik B (2021) The journey of herpesvirus capsids and genomes to the host cell nucleus. *Curr Opin Virol*. 50:147-158.
36. Holley-Guthrie EA, Quinlivan EB, Mar EC, Kenney S (1990) The Epstein-Barr virus (EBV) BMLF1 promoter for early antigen (EA-D) is regulated by the EBV transactivators, BRLF1 and BZLF1, in a cell-specific manner. *J Virol*. 64:3753-3759.
37. Kenney S, Holley-Guthrie E, Mar EC, Smith M (1989) The Epstein-Barr virus BMLF1 promoter contains an enhancer element that is responsive to the BZLF1 and BRLF1 transactivators. *J Virol*. 63:3878-3883.
38. Escalante GM, Mutsvunguma LZ, Muniraju M, Rodriguez E, Ogembo JG (2022) Four Decades of Prophylactic EBV Vaccine Research: A Systematic Review and Historical Perspective. *Front Immunol*. 13:867918.
39. Zavala-Vega S, Palma-Lara I, Ortega-Soto E, Trejo-Solis C, de Arellano IT, Ucharima-Corona LE, Garcia-Chacón G, Ochoa SA, Xicohtencatl-Cortes J, Cruz-Córdova A, Luna-Pineda VM, Jiménez-Hernández E, Vázquez-Meraz E, Mejía-Aranguré JM, Guzmán-Bucio S, Rembao-Bojorquez D, Sánchez-Gómez C, Salazar-García M, Arellano-Galindo J (2019) Role of Epstein-Barr Virus in Glioblastoma. *Crit Rev Oncog*. 24:307-338.
40. Church TM, Verma D, Thompson J, Swaminathan S (2018) Efficient Translation of Epstein-Barr Virus (EBV) DNA Polymerase Contributes to the Enhanced Lytic Replication Phenotype of M81 EBV. *J Virol*. 92:6.
41. Zhang Q, Hong Y, Dorsky D, Holley-Guthrie E, Zalani S, Elshiekh NA, Kiehl A, Le T, Kenney S (1996) Functional and physical interactions between the Epstein-Barr virus (EBV) proteins BZLF1 and BMLF1: Effects on EBV transcription and lytic replication. *J Virol*. 70:5131-5142.

42. Thierry E, Brennich M, Round A, Buisson M, Burmeister WP, Hutin S (2015) Production and characterisation of Epstein-Barr virus helicase-primase complex and its accessory protein BBLF2/3. *Virus genes*. 51:171-181.
43. Hammerschmidt W, Sugden B (1988) Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell*. 55:427-343.
44. Tsurumi T (1991) Primer terminus recognition and highly processive replication by Epstein-Barr virus DNA polymerase. *Biochem J*. 280:703-708.
45. Murata T (2018) Encyclopedia of EBV-Encoded Lytic Genes: An Update. *Adv Exp Med Biol*. 1045:395-412.
46. Aubry V, Mure F, Mariame B, Deschamps T, Wyrwicz LS, Manet E, Gruffat H (2014) Epstein-Barr virus late gene transcription depends on the assembly of a virus-specific preinitiation complex. *J Virol*. 88:12825-12838.
47. Laichalk LL, Hochberg D, Babcock GJ, Freeman RB, Thorley-Lawson DA (2002) The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. *Immunity*. 6:745-754.
48. Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT (1984) Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Nat Acad Sci USA*. 81:4510-4514.
49. Li Q, Spriggs MK, Kovats S, Turk SM, Comeau MR, Nepom B, Hutt-Fletcher LM (1997) Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virology*. 71:4657-4662.
50. Thorley-Lawson DA (2015) EBV Persistence--Introducing the Virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 390:151-209.
51. Al Tabaa Y, Tuailon E, Bollore K, Foulongne V, Petitjean G, Seigneurin JM, Duperray C, Desgranges C, Vendrell JP (2009) Functional Epstein-Barr virus reservoir in plasma cells derived from infected peripheral blood memory B cells. *Blood*. 113:604-611.
52. Richardo T, Prattapong P, Ngernsombat C, Wisetyaningsih N, Iizasa H, Yoshiyama H, Janvilisri H (2020) Epstein-Barr Virus Mediated Signaling in Nasopharyngeal Carcinoma Carcinogenesis. *Cancers*.12:2441.
53. Guidry JT, Birdwell CE, Scott RS (2018) Epstein-Barr virus in the pathogenesis of oral cancers. *Oral diseases*. 24:497-508.
54. El-Sharkawy A, Al Zaidan L, Malki A (2018) Epstein-Barr Virus-Associated Malignancies: Roles of Viral Oncoproteins in Carcinogenesis. *Front Oncol*. 8:265.
55. Choi S, Myers JN (2008) Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *Journal of dental research*. 87:14-32.
56. Wurdemann N, Wagner S, Sharma SJ, Prigge ES, Reuschenbach M, Gattenlohner S, Klusmann JP, Wittekindt C (2017) Prognostic Impact of AJCC/UICC 8th Edition New Staging Rules in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol*. 7:129.

57. Field JK (1992) Oncogenes and tumour-suppressor genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 28:67-76.
58. von Zeidler SV, Miracca EC, Nagai MA, Birman EG (2004) Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. *Int J Mol Med* 14:807-811
59. Munro J, Stott FJ, Vousden KH, Peters G, Parkinson EK (1999) Role of the alternative INK4A proteins in human keratinocyte senescence: evidence for the specific inactivation of p16INK4A upon immortalization. *Cancer Res.* 59:2511-2521.
60. Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, Correo R, Ruppert JM, Sidransky D (1993) The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res.* 53:4477-4480.
61. Rousseau A, Lim MS, Lin Z, Jordan RC (2001) Frequent cyclin D1 gene amplification and protein overexpression in oral epithelial dysplasias. *Oral Oncol.* 37:268-275.
62. Shao X, Tandon R, Samara G, Kanki H, Yano H, Close LG, Parson R, Sato T (1998) Mutational analysis of the PTEN gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 77:684-688.
63. Bian Y, Hall B, Sun ZJ, Molinolo A, Chen W, Gutkind JS, Waes CV, Kurkarni Ab (2012) Loss of TGF-beta signaling and PTEN promotes head and neck squamous cell carcinoma through cellular senescence evasion and cancer-related inflammation. *Oncogene.* 31:3322-3332.
64. Vedham V, Divi RL, Starks VL, Verma M (2014) Multiple infections and cancer: implications in epidemiology. *Technol Cancer Res Treat.* 13:177-194.
65. Epstein MA, Achong BG, Barr YM (1964) Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet.* 1:702-703.
66. Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8 (1997) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 70:1-492.
67. Tsao SW, Tsang CM, To KF, Lo KW (2015) The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies. *J Pathol.* 235:323-333.
68. zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, Santesson L (1970) EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature.* 228:1056-1058.
69. Cickusic E, Mustedanagic-Mujanovic J, Iljazovic E, Karasalihovic Z, Skaljic I (2007) Association of Hodgkin's lymphoma with Epstein Barr virus infection. *Bos J Basic Med Sci.* 7:58-65.
70. Crombie JL, LaCasce AS (2019) Epstein Barr Virus Associated B-Cell Lymphomas and Iatrogenic Lymphoproliferative Disorders. *Front Oncol.* 9:109.
71. Vranic S, Cyprian FS, Akhtar S, Al Moustafa AE (2018) The Role of Epstein-Barr Virus in Cervical Cancer: A Brief Update. *Front Oncol.* 8:113.
72. Arias-Calvachi C, Blanco R, Calaf GM, Aguayo F (2022) Epstein-Barr Virus Association with Breast Cancer: Evidence and Perspectives. *Biology.* 11:799.

73. Hui AB, Or YY, Takano H, Tsang RK, To KF, Guan XY, Sham JS, Hung KW, Lam CN, van Hasselt C.A, Kuo WL, Gray JW, Huang DP, Lo KW (2005) Array-based comparative genomic hybridization analysis identified cyclin D1 as a target oncogene at 11q13.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 65:8125-8133.
74. Tsang CM, Yip YL, Lo KW, Deng W, To KF, Hau PM, Lau VM, Takada K, Lui VW, Lung ML, Chen H, Zeng M, Middeldorp JM, Cheung AL, Tsao S (2012) Cyclin D1 overexpression supports stable EBV infection in nasopharyngeal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:E3473-3482.
75. Farrell PJ (2019) Epstein-Barr Virus and Cancer. *Annu Rev Pathol.* 14:29-53.
76. de Lima MAP, Teodoro IPP, Galiza LE, Filho P, Marques FM, Pinheiro Junior RFF, Macedo GEC, Facundo HT, da Silva CG L, Lima MVA (2019) Association between Epstein-Barr Virus and Oral Carcinoma: A Systematic Review with Meta-Analysis. *Crit Rev Oncog.* 24(4):349-368.
77. Acharya S, Ekalaksananan T, Vatanasapt P, Loyha K, Phusingha P, Promthet S, Kongyingoes B, Pientong C (2015) Association of Epstein-Barr virus infection with oral squamous cell carcinoma in a case-control study. *J Oral Pathol Med: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 44:252-257.
78. Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM (2002) Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. *Oral Sug Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 93:586-592.
79. Horiuchi K, Mishima K, Ichijima K, Sugimura M, Ishida T, Kiritani T (1995) Epstein-Barr virus in the proliferative diseases of squamous epithelium in the oral cavity. *Oral Sug Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 79:57-63.
80. Kobayashi I, Shima K, Saito I, Kiyoshima T, Matsuo K, Ozeki S, Ohishi M, Sakai H (1999) Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 189:34-39.
81. Rahman R, Poomsawat S, Juengsomjit R, Buajeeb W (2019) Overexpression of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 (LMP-1) in oral squamous cell carcinoma. *BMC oral health.* 19:142.
82. Hsu JL, Glaser SL (2000) Epstein-barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. *Crit Rev Oncol Hematol.* 34:27-53.
83. Plaza G, Manzanal AI, Fogue L, Santon A, Martinez-Montero JC, Bellas C (2002) Association of Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma in Caucasian patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 111:210-216.
84. Munz C (2019) Latency and lytic replication in Epstein-Barr virus-associated oncogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 17:691-700.
85. Ma SD, Yu X, Mertz JE, Gumperz JE, Reinheim E, Zhou Y, Tang W, Burlingham WJ, Gulley ML, Kenney SC (2012) An Epstein-Barr Virus (EBV) mutant with enhanced

BZLF1 expression causes lymphomas with abortive lytic EBV infection in a humanized mouse model. *J Virol* 86:7976-7987.

86. Germini D, Sall FB, Shmakova A, Wiels J, Dokudovskaya S, Drouet E, Vassetzky Y (2020) Oncogenic Properties of the EBV ZEBRA Protein. *Cancers*. 12:1479.

87. Yu X, Wang Z, Mertz JE (2007) ZEB1 regulates the latent-lytic switch in infection by Epstein-Barr virus. *PLoS pathogens*. 3:194.

88. Bhende PM, Dickerson SJ, Sun X, Feng WH, Kenney SC (2007) X-box-binding protein 1 activates lytic Epstein-Barr virus gene expression in combination with protein kinase D. *J Virol*. 81:7363-7370.

89. Flemington E, Speck SH (1990) Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J Virol*. 64:1227-1232.

90. Hecht SS (2006) Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms. *Langenbeck's archives of surgery*. 391:603-613.

91. Hecht SS (2022) Hatsukami DK. Smokeless tobacco and cigarette smoking: chemical mechanisms and cancer prevention. *Nat Rev Cancer*. 22:143-155.

92. Tobacco smoke and involuntary smoking (2004) IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 83:1-1438.

93. Jha P (2009) Avoidable global cancer deaths and total deaths from smoking. *Nat Rev Cancer*. 9:655-664.

94. Port JL, Yamaguchi K, Du B, De Lorenzo M, Chang M, Heerdt PM, Kopelovich L, Marcus CB, Altorki NK, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ (2004) Tobacco smoke induces CYP1B1 in the aerodigestive tract. *Carcinogenesis*. 25:2275-2281.

95. Leanderson P, Tagesson C (1992) Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: role of hydroxyl radicals and endonuclease activation. *Chem Biol Interact*. 81:197-208.

96. Montesano R (1981) Alkylation of DNA and tissue specificity in nitrosamine carcinogenesis. *J Supramol Struct Cell Biochem*. 17:259-273.

97. Nath RG, Ocando JE, Guttenplan JB, Chung FL (1998) 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts: potential new biomarkers of smoking-induced DNA damage in human oral tissue. *Cancer Res*. 58:581-584.

98. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ (1995) Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl Med*. 332:712-717.

99. Chakraborty S, Mohiyuddin SM, Gopinath KS, Kumar A (2008) Involvement of TSC genes and differential expression of other members of the mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. *BMC cancer*. 8:163.

100. Krishna A, Singh S, Singh V, Kumar V, Singh US, Sankhwar SN (2018) Does Harvey-Ras gene expression lead to oral squamous cell carcinoma? A clinicopathological aspect. *J Oral Maxillofac Pathol: JOMFP*. 22:65-72.

101. Pena N, Carrillo D, Munoz JP, Chnaiderman J, Urzua U, Leon O, Tornesello M, Corvalán A, Soto-Rifo R, Aguayo F (2015) Tobacco smoke activates human papillomavirus 16 p97 promoter and cooperates with high-risk E6/E7 for oxidative DNA damage in lung cells. *PLoS one*. 10:e0123029.
102. Hsu WL, Chien YC, Huang YT, Yu KJ, Ko JY, Lin CY, Tsou, Y. A., Leu YS, Liao LJ, Chang YL, Su JY, Liu Z, Wang CP, Terng SD, Hua CH, Lee JC, Yang TL, Kate Hsiao CH, Wu MS, Tsai MH (2020) Cigarette smoking increases the risk of nasopharyngeal carcinoma through the elevated level of IgA antibody against Epstein-Barr virus capsid antigen: A mediation analysis. *Cancer Med*. 9:1867-1876.
103. Hu T, Lin CY, Xie SH, Chen GH, Lu YQ, Ling W, Huang QH, Liu Q, Cao SM (2019) Smoking can increase nasopharyngeal carcinoma risk by repeatedly reactivating Epstein-Barr Virus: An analysis of a prospective study in southern China. *Cancer Med*. 8:2561-2571.
104. Yang QY, He YQ, Xue WQ, Zhou T, Liao Y, Zheng MQ (2019) Association Between Serum Cotinine Level and Serological Markers of Epstein-Barr Virus in Healthy Subjects in South China Where Nasopharyngeal Carcinoma Is Endemic. *Front Oncol*. 9:865.
105. Zhao L, Xie F, Wang TT, Liu MY, Li JL, Shang L, Deng ZX, Zhao PX, Ma XM (2015) Chlorpyrifos Induces the Expression of the Epstein-Barr Virus Lytic Cycle Activator BZLF-1 via Reactive Oxygen Species. *Oxid Med Cell Longev*. 2015:309125.
106. Hutchinson BD, Shroff GS, Truong MT, Ko JP (2019) Spectrum of Lung Adenocarcinoma. *Semin Ultrasound, CT, and MR*. 40:255-264.
107. Myers DJ, Wallen JM (2022) Lung Adenocarcinoma. *StatPearls*. Treasure Island
108. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE (2007) Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 75:56-63.
109. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V (2011) Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes & cancer*. 2:466-474.
110. Larsen JE, Minna JD (2011) Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med*. 32:703-740.
111. Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ, Ro JY, Broxson A, Yu R, Morice RC, Kemp BL, Khuri FR, Walsh GL, Hittelman WN, Hong WK (1997) Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Nat Cancer Inst*. 89:857-862.
112. Scoccianti C, Vesin A, Martel G, Olivier M, Brambilla E, Timsit JF, Tavecchio L, Brambilla C, Field JK, Hainaut P (2012) Prognostic value of TP53, KRAS and EGFR mutations in nonsmall cell lung cancer: the EU-ELC cohort. *Eur Respir J*. 40:177-814.
113. Boffetta P, Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Darby SC, Ferro G, Fortes C, Gonzalez CA, Jöckel KH, Krauss M, Kreienbrock L, Kreuzer M, Mendes A, Merletti F, Nyberg F, Pershagen G, Pohlmann H, Riboli E, Schmid G, Saracci R

- (1998) Multicenter case-control study of exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer in Europe. *J Nat Cancer Inst.* 90:1440-5140.
114. Gomez-Roman JJ, Martinez MN, Fernandez SL, Val-Bernal JF (2009) Epstein-Barr virus-associated adenocarcinomas and squamous-cell lung carcinomas. *Mod Pathol: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 22:530-537.
115. Jafarian AH, Omid-Ashrafi A, Mohamadian-Roshan N, Karimi-Shahri M, Ghazvini K, Boroumand-Noughabi S (2013) Association of Epstein Barr virus deoxyribonucleic acid with lung carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol.* 56:359-364.
116. Camargo MC, Koriyama C, Matsuo K, Kim WH, Herrera-Goepfert R, Liao LM, Eurgast-EPIC Group, Y, J, Carrasquilla G, Sung JJ, Alvarado-Cabrero I, Lissowska J, Meneses-Gonzalez F, Yatabe Y, Ding T, Hu N, Taylor PR, Morgan DR, Gulley ML, Torres J, Rabkin CS (2014) Case-case comparison of smoking and alcohol risk associations with Epstein-Barr virus-positive gastric cancer. *Int J Cancer.* 134:948-953.
117. Jaccard G, Djoko DT, Korneliou A, Stabbert R, Belushkin M, Esposito M (2019) Mainstream smoke constituents and in vitro toxicity comparative analysis of 3R4F and 1R6F reference cigarettes. *Toxicol Rep.* 6:222-2231.
118. Nagaraj NS, Beckers S, Mensah JK, Waigel S, Vigneswaran N, Zacharias W (2006) Cigarette smoke condensate induces cytochromes P450 and aldo-keto reductases in oral cancer cells. *Toxicol Let.* 165:182-194.
119. Munoz JP, Carrillo-Beltran D, Aedo-Aguilera V, Calaf GM, Leon O, Maldonado E, Tapia JC, Boccardo E, Ozbun MA, Aguayo F (2018) Tobacco Exposure Enhances Human Papillomavirus 16 Oncogene Expression via EGFR/PI3K/Akt/c-Jun Signaling Pathway in Cervical Cancer Cells. *Front Microbiol* 9:3022.
120. Gavish A, Krayzler E, Nagler R (2016) Tumor Growth and Cell Proliferation Rate in Human Oral Cancer. *Arch Med Res.* 47:271-274.
121. Allam E, Zhang W, Al-Shibani N, Sun J, Labban N, Song F, Windsor LJ (2011) Effects of cigarette smoke condensate on oral squamous cell carcinoma cells. *Arch Oral Biolo.* 56:1154-1161.
122. Silva D, Caceres M, Arancibia R, Martinez C, Martinez J, Smith PC (2012) Effects of cigarette smoke and nicotine on cell viability, migration and myofibroblastic differentiation. *J Periodontol Re.* 47:599-607.
123. Zhang W, Fang M, Song F, Windsor LJ (2011) Effects of cigarette smoke condensate and nicotine on human gingival fibroblast-mediated collagen degradation. *J Periodontol.* 82:1071-1079.
124. Wei L, Griego AM, Chu M, Ozbun MA (2014) Tobacco exposure results in increased E6 and E7 oncogene expression, DNA damage and mutation rates in cells maintaining episomal human papillomavirus 16 genomes. *Carcinogenesis.* 35:2373-2381.

125. Alam S, Conway MJ, Chen HS, Meyers C (2008) The cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene enhances human papillomavirus synthesis. *J Virol.* 82:1053-1058.
126. Daibata M, Speck SH, Mulder C, Sairenji T (1994) Regulation of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus by second messengers in anti-immunoglobulin-treated B cells. *Viol.* 198:446-454.
127. Flemington E, Speck SH (1990) Identification of phorbol ester response elements in the promoter of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J Virol.* 64:1217-1226.
128. Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science.* 240:1759-1764.
129. Wu FY, Wang SE, Chen H, Wang L, Hayward SD, Hayward GS (2004) CCAAT/enhancer binding protein alpha binds to the Epstein-Barr virus (EBV) ZTA protein through oligomeric interactions and contributes to cooperative transcriptional activation of the ZTA promoter through direct binding to the ZII and ZIIIB motifs during induction of the EBV lytic cycle. *J Virol.* 78:4847-4865.
130. Huang J, Liao G, Chen H, Wu FY, Hutt-Fletcher L, Hayward GS, Hayward SD (2006) Contribution of C/EBP proteins to Epstein-Barr virus lytic gene expression and replication in epithelial cells. *J Virol.* 80:1098-1109.
131. Jenkins PJ, Binne UK, Farrell PJ (2000) Histone acetylation and reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *J Virol.* 4:710-720.
132. Wu FY, Chen H, Wang SE, ApRhys CM, Liao G, Fujimuro M, Farrell CJ, Huang J, Hayward SD, Hayward GS (2003) CCAAT/enhancer binding protein alpha interacts with ZTA and mediates ZTA-induced p21(CIP-1) accumulation and G(1) cell cycle arrest during the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J Virol.* 77:1481-1500.
133. Jones N. (1990) Structure and function of transcription factors. *Sem Cancer Biol* 1:5-17.
134. Messeguer X, Escudero R, Farre D, Nunez O, Martinez J, Alba MM (2002) PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics.* 18:333-334.
135. Xi S, Yang M, Tao Y, Xu H, Shan J, Inchauste S S, Zhang M, Mercedes L, Hong JA, Rao M, Schrupp DS (2010) Cigarette smoke induces C/EBP-beta-mediated activation of miR-31 in normal human respiratory epithelia and lung cancer cells. *PloS one.* 5:e13764.
136. Karlsson A, Ringner M, Lauss M, Botling J, Micke P, Planck M, Staaf J (2014) Genomic and transcriptional alterations in lung adenocarcinoma in relation to smoking history. *Clin Cancer Res: an official journal of the American Association for Cancer Research.* 20:4912-4924.

137. Wang J, Chen T, Yu X, N OU, Tan L, Jia B, Tong J, Li J (2020) Identification and validation of smoking-related genes in lung adenocarcinoma using an in vitro carcinogenesis model and bioinformatics analysis. *J Transl Med.* 18:313.
138. Liu Y, Ni R, Zhang H, Miao L, Wang J, Jia W, Wang Y (2016) Identification of feature genes for smoking-related lung adenocarcinoma based on gene expression profile data. *OncoTargets Ther.* 9:7397-7407.
139. Landi MT, Dracheva T, Rotunno M, Figueroa JD, Liu H, Dasgupta A, Mann FE, Fukuoka J, Hames M, Bergen AW, Murphy SE, Yang P, Pesatori A C, Consonni D, Bertazzi PA, Wacholder S, Shih JH, Caporaso NE, Jen J (2008) Gene expression signature of cigarette smoking and its role in lung adenocarcinoma development and survival. *PLoS one.* 3:e1651.
140. Spira A, Beane J, Shah V, Liu G, Schembri F, Yang X, Palma J, Brody JS (2004) Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:10143-10148.
141. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nature reviews Cancer.* 2007;7(10):778-90. Epub 2007/09/21.
142. Ghantous Y, Schussel JL, Brait M (2018) Tobacco and alcohol-induced epigenetic changes in oral carcinoma. *Curr Op Oncol* 30:152-158.
143. Shen JX, Yakel JL (2009) Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol Sin.* 30:673-680.
144. Tae HJ, Zhang S, Kim KH (1995) cAMP activation of CAAT enhancer-binding protein-beta gene expression and promoter I of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.* 270:21487-21494.
145. Yu X, Wang Z, Mertz J. E (2007) ZEB1 regulates the latent-lytic switch in infection by Epstein-Barr virus. *PLoS pathogens.* 3:e194.